

## 4. Bases genéticas del cáncer y principales síndromes de predisposición hereditario al cáncer

### GENETIC BASIS OF CANCER AND MAIN SYNDROMES OF HEREDITARY PREDISPOSITION TO CANCER

**Manuel Ruiz Artero**

Analista clínico en un laboratorio de análisis clínicos como encargado de los equipos automatizados de bioquímica, sedimentos de orina y andrología.

#### RESUMEN

El cáncer es una enfermedad genética, por lo que hay algunos tipos de cáncer que se pueden heredar de los progenitores. En este tema vamos a desarrollar las principales bases genéticas del cáncer, el tipo de mutaciones que se producen, los mecanismos de reparación celular, de proliferación etc. También vemos los síndromes de predisposición hereditaria al cáncer más importantes, como pueden ser: síndrome predisposición hereditaria al cáncer de mama y al cáncer de ovario, síndrome de Lynch, cáncer colorrectal, melanoma familia o neurofibromatosis entre otros. Las manifestaciones clínicas de estos síndromes, la incidencia en nuestra sociedad, los genes principales genes implicados como pueden ser BRCA1, PALB2 APC o NF1 y las técnicas instrumentales por las que se diagnostican estas alteraciones en los genes, en esta nos encontramos la reacción en cadena la polimerasa PCR, secuenciación masiva, MLPA o microarray.

**Palabras clave:** Bases genéticas, diagnóstico, clasificación, aspectos moleculares, melanoma, neurofibromatosis.

#### ABSTRACT

*Cancer is a genetic disease, so there are some types of cancer that can be inherited from parents. In this topic we will develop the main genetic bases of cancer, the type of mutations that occur, the mechanisms of cell repair, proliferation etc. We also see the most important syndromes of hereditary predisposition to cancer, They can be: hereditary predisposition syndrome to breast cancer and ovarian cancer, Lynch syndrome, colorectal cancer, family melanoma or neurofibromatosis among others. The clinical manifestations of these syndromes, the incidence in our society, the main genes involved genes such as BRCA1, PALB2 APC or NF1 and the instrumental techniques by which these alterations in genes are diagnosed, In this we find the PCR*

*polymerase chain reaction, massive sequencing, MLPA or microarray.*

**Keywords:** Genetic basis, diagnosis, classification, molecular aspects, melanoma, neurofibromatosis.

#### INTRODUCCIÓN

La etiología del cáncer es multifactorial, con factores genéticos, ambientales, médicos y de estilo de vida que interactúan para producir una determinada malignidad. El conocimiento de la genética del cáncer está mejorando rápidamente nuestra comprensión de la biología del cáncer, ayudando a identificar a las personas en riesgo, fomentando la capacidad de caracterizar neoplasias malignas, estableciendo un tratamiento adaptado a la huella molecular de la enfermedad y conduciendo al desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas. Como consecuencia, esta base de conocimientos en expansión tiene implicaciones para todos los aspectos del manejo del cáncer, incluida la prevención, la detección y el tratamiento.

El cáncer es una enfermedad genética, así pues, el cáncer es originado por ciertos cambios que nuestros genes que chequean cómo funcionan nuestras células, en particular la forma como crecen y se dividen. Los genes son los encargados de dar las instrucciones necesarias para producir las proteínas, estas proteínas están involucradas en multitud de funciones de la célula. Algunos cambios génicos pueden originar proteínas defectuosas que no hagan su función como regular el crecimiento celular, la apoptosis, adhesión, reparación del ADN etc. Estas alteraciones genéticas se pueden adquirir durante el transcurso de la vida como resultado de errores en el ADN que se producen al dividirse las células o por exposición a sustancias carcinógenas que dañan el ADN como pueden ser tabaco o radiaciones a estas se les denomina cambios somáticos o adquiridos. También los cambios genéticos se pueden heredar de nuestros progenitores si las alteraciones están presentes en las células germinales.

Entre el 5-10% de todos los cánceres, tienen una mutación genética que ha sido heredada. Según la bibliografía disponible nos encontramos con más de 50 síndromes hereditarios de cáncer que se han asociado a genes específicos, lo cual son enfermedades que predisponen a las personas a sufrir algún tipo de cáncer.

Existen pruebas genéticas para detectar si una persona dentro de una familia con signos de un síndrome puede tener la mutación que lo origina. Estas pruebas también pueden mostrar si hay más miembros de una familia que han heredado la misma mutación que un miembro que tiene la mutación. Hay cánceres que no son causados por mutaciones genéticas heredadas, pero dan la sensación de que "son de familia". Pero esto sucede porque hay un estilo de vida parecido como consumo de tabaco o se comparan ambientes, sin embargo, no se deben confundir con cáncer hereditario ya que no existe ninguna mutación germinal.

El tener la mutación germinal no implica que se padezca cáncer al 100% sino que es más probable que a lo largo de la vida lo pueda desarrollar que en la población normal. Por lo que los pacientes que tengan una mutación germinal se les realiza un seguimiento más exhaustivo a lo largo de la vida para poder diagnosticar en estadios más tempranos y así tener mejor pronóstico. Dependiendo del tipo de síndrome que se sospeche, hay diferentes genes que pueden tener alguna alteración, por ejemplo, si se sospecha de un síndrome con predisposición hereditaria de cáncer de mama u ovario uno de los genes implicados es el BCRA1 y el BCRA2, pero no son los únicos.

## OBJETIVOS

Con este trabajo se presenta una serie de objetivos principales y otros objetivos específicos.

Comprender las principales bases genéticas del cáncer y como se producen

- Tipo de mutaciones
- Modificaciones epigenéticas mas importantes como la modificación de histonas o metilación del ADN.

Identificar los genes de predisposición hereditaria al cáncer

Conocer las técnicas de diagnóstico molecular más importantes y utilizadas

- Técnicas de extracción del ADN y ARN
- Técnicas para el análisis genético como endonucleasas de restricción, Taq polimerasa o electroforesis
- Principios de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes como RT-PCR, PCR a tiempo real o PCR digital.
- Técnicas para la identificación de variantes por ejemplo la secuenciación Sanger o la secuenciación masiva o Multi-plex ligation dependent probe amplification (MLPA)
- Tecnología de Micro Arrays y sus variantes

Clasificación de las variantes genéticas

- A través de la secuencia de ADN, clínico-moleculares y funcionales.

Aspectos moleculares de predisposición hereditaria al cáncer de mama y al cáncer de ovario

- Conocer los genes de susceptibilidad de alta penetrancia, por ejemplo, BRCA1, BRCA2, TP53, CDH1 etc.
- Genes de susceptibilidad con moderada penetrancia, por ejemplo, ATM, CHEK2, PALB2, etc.

Aspectos moleculares del síndrome de Lynch y de otros síndromes de predisposición a cáncer colorrectal no polipósico

- Mecanismo MMR y genes implicados
- Características de los tumores del síndrome de Lynch
- Identificación molecular del síndrome de Lynch a través de Estudio inmunohistoquímico de las proteínas MMR, de

inestabilidad de microsatélites y metilación del promotor de MLH1.

- Síndrome de la deficiencia constitutiva de la reparación de errores de apareamiento de nucleótidos
- Síndrome Lynch-like
- Cáncer colorrectal hereditario no polipósico sin inestabilidad de microsatélites

Aspectos moleculares de los síndromes polipósicos.

- Poliposis adenomatosa
- Poliposis hamartomatosas
- Poliposis serradas
- Poliposis mixtas

Aspectos moleculares del melanoma familiar y genodermatosis

- Melanoma familiar y Genes de alta susceptibilidad: CDKN2A y CDK4; TERT; BAP1
- Genodermatosis
- Síndrome de Gorlin
- Xeroderma Pigmentoso
- Síndrome de Werner

Aspectos moleculares de la neurofibromatosis y la Schwannomatosis

- Neurofibromatosis tipo 1, aspectos clínicos y patogénesis
- Neurofibromatosis tipo 2, aspectos clínicos y patogénesis
- Schwannomatosis, aspectos clínicos y patogénesis

## DESARROLLO

### BASES GENÉTICAS DEL CÁNCER

El cáncer se define como el crecimiento exagerado y descontrolado de una agrupación celular que pueden invadir y dañar tejidos y órganos. Es la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados solo después de las enfermedades coronarias o cardiovasculares. En las últimas décadas se ha incrementado la incidencia del cáncer pero también es verdad que se ha disminuido la mortalidad por los avances que se han producido tanto en el diagnóstico precoz como a nivel de tratamientos.(1)

El cáncer es el producto de dos procesos consecutivos. El incremento del crecimiento descontrolado de un grupo de células y después la adquisición de migrar a otros tejidos u órganos. Es considerada una enfermedad genética ocasional e inusualmente hereditaria.

Hay dos posibles grupos de alteraciones genéticas:

- Cambios en la secuencia del ADN en este grupo están incluidas las deleciones de zonas cromosómicas que

conlleva a la pérdida de información genética, mutaciones génicas que pueden aumentar o disminuir la producción de alguna proteína, o la ganancia o pérdida de algún cromosoma

- Los cambios epigenéticos se pueden dar en genes supresores, oncogenes o factores de transcripción y son cambios heredables en las histonas y ADN que no conlleva modificaciones en la secuencia de nucleótidos y cambian la estructura y condensación de la cromatina.(2) (3) Los cambios epigenético más importantes son:

### Modificación de las histonas

Las histonas son proteínas que tienen un bajo peso molecular que contiene una gran cantidad de lisina y arginina, y forman la cromatina junto al ADN. Estas proteínas sufren una gran cantidad de cambios postraduccionales como acetilación, fosforilación, metilación o ubiquitinación. Estas modificaciones tienen un papel muy importante en la regulación de la expresión génica. Cuando se modifican la estructura de las histonas se regula la expresión de genes y si esta alterada esta estructura puede llevar a la formación de cáncer.(4)(3)

### Metilación del ADN

La metilación del ADN tiene efectos evidentes en la expresión génica. Es un proceso que en el que se incorporan grupos metilo normalmente en las citosinas del ADN. Esta metilación del ADN hace que se modifique la estructura del material genético por lo que ejerce como represor de la transcripción.

También puede ocurrir que haya una hipermetilación, esto hace que genes relacionados con el ciclo celular, la apoptosis y la reparación celular se inactive y provoque cáncer.

Un objetivo de la epigenética es reconocer el modelo de metilación hereditaria para poder mejorar en el tratamiento y en el diagnóstico.

### ARN pequeño no codificante

Son secuencias de ARN que se relacionan con la expresión génica pero que no se traducen a proteínas. Normalmente cumplen funciones regulatorias y están implicados en procesos de apagado de genes o silenciamiento genético(5) actualmente se sabe que casi todo el genoma se expresa bajo forma de ARNs no codificantes. Entre dichos ARNs se encuentran los ARNs no codificantes largos (lncRNAs)(6). El miRNA es causa de debate porque según algunos estudios puede tener un papel oncogénico otros autores dice que tiene una función supresora de tumores.

Todo esto se puede resumir en que hay diferentes procesos moleculares para la formación y avance tumoral:

- Activación de oncogenes
- Inhibición de genes supresores
- Modificación en los genes que reparan el ADN
- Cambios de genes que regulan la apoptosis

e. Activación de telomerasa

f. Reparación de la oxidación mediada por radicales libres

g. Desequilibrio genético (microsatélites y cromosómica)

### SUCESTIBILIDAD GENÉTICA AL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad que ocurre en personas que están genéticamente predisuestas. Hay varios estudios que dicen que los familiares de personas afectas por un cáncer tienen 2-3 veces más posibilidades de tener un cáncer que el resto de la población. Lo que hace pensar que hay una predisposición genética al cáncer que son compatibles con otros factores ambientales o infecciosos.(1).

En el 2000 se vio la importancia que tenían los factores genéticos o ambientales como causantes de cáncer.(7) Los investigadores definieron la Heredabilidad "como la proporción de la variabilidad fenotípica observada en una población que puede atribuirse a una variabilidad genética en dicha población". Por lo que una Heredabilidad de 1 equivale a que el fenotipo está totalmente determinado genéticamente y una Heredabilidad de 0 es que no hay presencia de componente genético (1).

### SÍNDROMES HEREDITARIOS DE CÁNCER

Existen genes de alta penetrancia y son estos lo que explican que existan síndromes hereditarios de cáncer. Se han descrito unos 200 genes que pueden ser hereditarios. La alteración de alguno de estos 200 genes pueden explicar alrededor del 5-10% de casos de cáncer(8). Se pueden determinar porque aparecen en edades tempranas, hay varios cánceres en un individuo o antecedentes familiares(1)

La mayoría tienen un patrón de herencia autosómica dominante y están causados por mutaciones que producen una disfunción de genes supresores de tumores. Al tener la gran mayoría un patrón de herencia dominante es muy importante estudiar las familias y la descendencia porque hay un 50% de posibilidades de que sea portador de esta mutación. Y los individuos portadores tienen más posibilidades de desarrollar algún tipo de cáncer a lo largo de su vida. Algunos ejemplos son la poliposis adenomatosa familiar que el gen afectado es el APC, el Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario que se produce por mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 o Síndrome de Li-Fraumeni en el gen TP53.

### GENES DE PREDISPOSICIÓN HEREDITARIA AL CÁNCER Y RIESGO POLIGÉNICO

#### Introducción

En los genes que regulan el ciclo celular o reparan el ADN se producen mutaciones. Si estas mutaciones son malignas se le denomina que es una variante patogénica. Por lo que en todos los tumores se producen porque hay alguna variante patogénica de los genes implicados, pero esto no quiere decir que sean heredadas por su progenitor o que las vaya a transmitir. Lo más frecuente es que aparezcan en células somáticas y en una minoría pueden aparecer estas

Patología	Incidencia	Gen
Síndrome de Lynch Cáncer de mama/ovario Hereditario (CMOH)	1/200-1000	MSH2 MLH1 MSH6 PMS2
Neoplasia Endocrina Multiple 1 (MEN1)	1/500-2.500	BRCA1 BRCA2
Neoplasia Endocrina Multiple 2 (MEN2)	2-10/100.000	MEN1
Poliposis adenomatosa de colon familiar (PAF)	1/25.000	RET
Síndrome de PTEN - hamartomas	1/8.000-13.000	APC
Síndrome de von Hippel-Lindau Retinoblastoma hereditario	1/200.000	PTEN
	1/36.000-45.000	VHL
	1/13.500-25.000	Rb1

*Síndromes de predisposición hereditaria al cáncer. Alonso Sánchez M. et al. Cáncer Hereditario. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2019.*

variantes patogénicas de novo en las células germinales o en las primeras fases de la embriogénesis(9) (1). En el desarrollo de tumores tiene mucha importancia la carga génica del individuo al igual que otros factores ambientales o infecciosos y todos en combinación promueven el desarrollo de neoplasias. Se calcula que entre el 5 y 10% del todos los cánceres diagnosticados son hereditarios por lo que esto representa alrededor de 1.4 millones de nuevos casos en el mundo(10).

Los sujetos que tienen una mutación en cualquier gen de predisposición al cáncer poseen un riesgo mayor a desarrollar cáncer en su vida y probablemente a una edad más corta que la población que no la tiene. Estos genes de predisposición al cáncer son de alta penetrancia y tienen una herencia autosómica dominante, pero pueden existir otros con herencia ligada a X o autosómica recesiva.

Se ha visto que en hay una agregación familiar en ciertas familias. Ya que en este grupo de personas tenían un tipo de tumor con más frecuencia que la población general, pero sin tener un patrón de herencia. En estos casos se cree que hay una mezcla de alteraciones genéticas en genes de baja penetrancia mas las causas ambientales que tiene la familia(1).

Es muy importante el diagnóstico de síndromes predisposición hereditaria al cáncer porque permite poner en practica estrategias de prevención, diagnóstico precoz en personas que no tienen cáncer. También es importante en las personas que tienen diagnosticados cáncer porque cada vez hay más tratamientos que tienen como diana estos tipos de tumores.

### Diagnóstico de cáncer mediante secuenciación masiva y paneles multigenes

Se han descrito alrededor de 100 genes que están involucrado en la formación de neoplasias. Esto ha sido posible gracias a las nuevas tecnologías como es la secuenciación masiva (NGS) para el estudio genético. Antes se realizaba por la secuenciación Sanger que es muy costosa y laboriosa,

estaba considerada el gold estándar para el estudio. Ahora con la NGS permite estudiar mayor cantidad de genes con menor coste y se está implementando en un gran número de laboratorios de rutina(11).

Nos encontramos con más de 50 síndromes con predisposición hereditaria al cáncer. Es más, un síndrome o síndromes semejantes pueden tener una variante patogénica en más de un gen por ejemplo estos genes ATM, PALB2, BARD1, NBN en el cáncer de mama hereditario o TP53, CHEK2 en el síndrome de Li-Fraumeni.

Se pueden usar paneles multigenes para realizar un screening de genes de alta penetrancia y genes de riesgo moderado para la predisposición hereditaria. Así se aumenta el número de individuos diagnosticados con predisposición hereditaria(12). El problema del uso de paneles multigenes es que se encuentra una gran cantidad de variantes de significado incierto y no tenemos la suficiente información. Por lo que se debe ser muy cuidadoso con la interpretación y comunicación.

### Síndromes de predisposición hereditaria al cáncer y genes responsables

Síndromes de predisposición hereditaria al cáncer	Herencia	Gen
CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO	AD	BRCA1, BRCA2
CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO	AD	ATM, PALB2, BARD1, NBN
CÁNCER DE OVARIO HEREDITARIO	AD	BRIP, RAD51C, RAD51D
SÍNDROME DE LYNCH	AD	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM
POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR (FAP)	AD	APC

NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO 1	AD	MEN1	ENFERMEDAD DE DUNCAN	LIGADA AL X	SH2D1A
NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO 2	AD	RET	SÍNDROME DE SOTOS	AD	NSD1
NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO 4	AD	CDKN1B	SÍNDROME DE CURRARINO	AD	HLXB9
POLIPOSIS ASOCIADA A MUTYH (MAP)	AR	MUTYH	SÍNDROME CHEDIAK-HIGASHI	AR	LYST
SÍNDROME DE COWDEN	AD	PTEN	SÍNDROME DE TUMORES ASOCIADOS A BAP-1	AD	BAP1
VON HIPPEL - LINDAU	AD	VHL	SÍNDROME DE ROTHMUND-THOMSON	AR	RECQL4
RETINOBLASTOMA HEREDITARIO	AD	RB1	SÍNDROME DICER1	AD	DICER1
SÍNDROME PEUTZ-JEGHERS	AD	STK11	TUMORS DE WILMS FAMILIAR	AD	WT1
SÍNDROME DE LI-FRAUMENI	AD	TP53, CHEK2	SÍNDROME DE BECKWITH-WIEDEMAN	AD	KIP2 (CDKN1C)
SÍNDROME GORLIN	AD	PTCH1, SUFU, PTCH2	SÍNDROME DE COSTELLO	AD	HRAS
ESCLEROSIS TUBEROSA	AD	TSC1, TSC2	GIST FAMILIAR	AD	KIT, PDGFRA
MELANOMA FAMILIAR	AD	CDKN2A, CDK4, TERT, MITF	SÍNDROME NIJMEGEN	AR	NBS1
NEUROFIBROMATOSIS 1	AD	NF1	PANCREATITIS HEREDITARIA	AD	PRSS1
NEUROFIBROMATOSIS 2	AD	NF2	SÍNDROME POLE/POLD	AD	POLE, POLD
SCHWANOMATOSIS	AD	SMARCB1	SÍNDROME SIMPSON-GOLABI-BEHMEL	LIGADA AL X RECESIVA	GPC3
PARAGANGLIOMA/FEOCROMOCITOMA FAMILIAR	AD	SDHB, SDHC, SDHB, SDHAF2	CANCER DE TIROIDES NO-MEDULAR FAMILIAR	AD	HABP2
CÁNCER GÁSTRICO DIFUSO HEREDITARIO	AD	CDH1			
POLIPOSIS JUVENIL	AD	SMAD4, BMPR1A			
SÍNDROME BIRT-HOGG-DUBÉ	AD	FLCN			
ANEMIA FANCONI	AR	FANCA-FANCM			
SÍNDROME BLOOM	AR	RECQL3			
COMPLEJO DE CARNEY	AD	PRKRA1A			
DISQUERATOSIS CONGÉNITA	AD, LIGADA AL X	DKC1			
CÁNCER DE PRÓSTATA HEREDITARIO	AD	HOXB13			
SÍNDROME WERNER	AR	RECQL2			
XERODERMA PIGMENTOSUM	AR	XPA-XPG, DDB2			
ATAXIA TELEANGIECTASIA	AR	ATM			
DÉFICIT CONSTITUCIONAL DEL MISS-MATCH REPAIR	AR	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2,			
SÍNDROME CARNEY-STRATAKIS	AD	SDHB, SDHC, SDHD			
CARCINOMA RENAL PAPILAR FAMILIAR	AD	MET			
LEIOMIOMATOSIS CUTÁNEA Y UTERINA HEREDITARIA	AD	FH			

*Alonso Sánchez M. et al. Cáncer Hereditario. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2019.*

### Genes de penetrancia intermedia en la práctica clínica

Con el uso de NGS también se ha descubierto variantes genéticas que dan al paciente que las porta un riesgo intermedio de tener predisposición hereditaria padecer cáncer.

En estos momentos hay un debate sobre la idoneidad de utilizar paneles que incluyan genes con riesgos intermedio. Por una parte, es técnicamente factible, económico y fácil, pero por otra parte grandes dudas del manejo de estas variantes en los portadores.

El inconveniente en nuestro entorno es la falta de pruebas que manifiesten mejores resultados tras la intervención clínica en los portadores de la variante. Porque no hay una validez clínica a las variantes de genes de penetrancia intermedia.

Así, una de las agrupaciones científicas más importantes como la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) piensa que en paneles que se utilizan solo en la clínica solo se deben incluir genes que tengan utilidad clara para el manejo de pacientes que porten esa variante y las otras variantes o genes solo se deben incorporar la practica una vex estén estudiadas y validadas clínicamente(13).

En conclusión, aunque la utilización de paneles grandes es

TIPO DE CÁNCER	GEN	RIESGO RELATIVO MEDIO
CÁNCER DE MAMA	ATM	2,8 (90% CI 2,2-3,7)
	CHEK2 (TRUNCANTE)	3 (90% CI 2,6-3,5)
	CHEK2 (I157T)	1,58 (95% CI 1,42-1,78)
	NBN (C.657DEL5)	2,8 (90% CI 1,9-3,7)
	PALB2	5,3 (90% CI 3-9,4)
CÁNCER DE OVARIO	BRIP 1	3,41 (95% CI 2,12-5,54)
	RAD51C	5,2 (95% CI 1,1-24)
	RAD51D	12 (95% CI 1,5-90)
CÁNCER DE COLÓN	APC(I130K)	2,17 (95% CI 1,64-2,86)
	CHEK2 (I100DEL3)	1,88 (95% CI 1,29-2,73)
	MUTYH (MONOALÉLICA)	1,18 (95% CI 1,01-1,34)

Ejemplo de genes de moderada penetrancia y tipo de cáncer. Alonso Sánchez M. et al. *Cáncer Hereditario. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2019.*

posible a un precio económico lo más importante es la interpretación de los resultados obtenidos y no dañar al paciente con acciones o intervenciones inapropiadas que causen ansiedad en el paciente por un descubrimiento casual de una variante de significado incierto o de un gen de moderada penetrancia.

Por todo esto es muy importante un buen asesoramiento genético tanto antes de la realización del test como después para transmitir la información al paciente.

### Riesgo poligénico

Hasta el momento el cribado de cáncer de colon o mama solo se apoyaba en la edad de los pacientes, por ejemplo, para el cáncer de mama se empiezan a realizar mamografías cada dos años a partir de los 50 años de edad. Por lo que solo considerar la edad para calcular el riesgo de padecer cáncer es insuficiente. Ya que este riesgo se ve influenciado por factores genéticos de susceptibilidad, factores ambientales y estilo de vida.(1)

Hay otras maneras de calcular el riesgo como pueden ser mediante historia familiar (modelo BOADICEA) o modelos matemáticos como el modelo Gail. Ahora se están incluyendo en los modelos de predicción las variantes genéticas comunes. Los estudios de asociación de todo el genoma han posibilitado revelar múltiples SNP de bajo riesgo. Por ejemplo, en el cáncer de mama se han publicado numerosos polimorfismos de solo un nucleótido que parece que explica el 15-20% de riesgo de cáncer hereditario de mama(14) particularly in women age 40 to 49 years. One potential solution is risk-based screening, where decisions around the starting age, stopping age, frequency, and modality of screening are based on individual risk to maximize the early detection of aggressive cancers and minimize the harms of screening through optimal resource utilization. We present a novel approach to risk-based screening that integrates clinical risk factors, breast density, a polygenic risk score representing the cumulative effects of genetic variants, and sequencing for moderate- and high-penetrance germline mutations. We demonstrate how thresholds of absolute risk estimates generated by our prediction tools can be used to stratify women into different screening strategies (biennial mammography, annual mammography, annual mammography with

adjunctive magnetic resonance imaging, defer screening at this time.

El uso de forma conjunta del efecto de múltiples SP puede alcanzar un grado de discriminación del riesgo que puede ser de utilidad en las acciones de prevención del cáncer. Y en un futuro próximo implementarse junto a modelos basados en la historia familiar.

## TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### Introducción

El diagnóstico molecular es un campo activo y que está continuamente desarrollándose. En los últimos años, está siendo muy importante para la rama de la medicina las técnicas de diagnóstico molecular. Estas están avanzando muy rápidamente y ha transformado el diagnóstico molecular en una parte fundamental para el médico, y como consecuencia el beneficio para el paciente(15).

La especie humana tiene 46 cromosomas un par de ellos son cromosomas sexuales y el resto autosómicos. En estos cromosomas son donde esta empaquetada la información genética de la especie en forma de ADN. Aunque en las mitocondrias también tienen ADN en su interior el ADN mitocondrial. Los cromosomas se encuentran en el núcleo de todas las células y contienen la, mayor parte de los genes. Los genes están organizados en zonas codificantes denominadas exones estos fragmentos se transcriben a ARNm y a continuación se traducen a proteína y regiones no codificantes que son los intrones.

Por esto es importante hacer un diagnóstico estudiando el ADN porque se tiene información de los genes y se pueden observar si hay alteraciones que afecten a la función.

En el laboratorio es muy importante conocer cuál es la muestra biológica mas apta para obtener la molécula que queremos estudiar para proceder al diagnóstico. Por ejemplo, para si lo que queremos es saber si un paciente tiene alteraciones germinales con una muestra de sangre periférica es suficiente para saber si tiene la alteración. Pero si la alteración es somática solo se puede estudiar cogiendo muestra del tejido u órgano afectado (1).

### **Extracción de ADN y ARN en muestras biológicas**

Nos encontramos con una gran variedad de muestras de las que se puede obtener ADN y ARN. Las más utilizadas son la sangre, células bucales, médula ósea, líquido amniótico o tejido tumoral. La que más se utiliza es la sangre periférica porque facilita obtener ADN de alta calidad y en cantidad abundante. Se debe trabajar con 10 ml de sangre total, que no estén separados los componentes y la sangre no este coagulada. En la sangre las células que tienen el ADN son las células nucleadas como los leucocitos.

Si lo que se quiere estudiar son alteraciones somáticas, el ADN se extrae directamente del tejido afectado.

Para el diagnóstico prenatal se necesita obtener muestras fetales. Estas se obtienen a través de técnicas invasivas como la biopsia de vellosidades coriales, amniocentesis o cordocentesis. Dependiendo de la edad gestacional se realiza una u otra técnica. En los últimos años se ha avanzado en el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) y siempre que se pueda se utiliza. La extracción de ADN en DGP se hace a partir de una células del embrión, preferentemente cuando esta está en estado de blastocisto D+5. Es un procedimiento muy delicado y complejo(1).

Cuando se extrae ARN es muy importante saber que se degradan enzimáticamente por ribonucleasas (RNAasas). Estas enzimas están presentes en multitud de sistemas biológicos, y son enzimas muy activas y estables por lo que hay que tener unas precauciones extremas a la hora de extraer el ADN. El material que se usa debes estar completamente esterilizado y libre de RNAasas(1).

#### **Extracción del ADN**

El ADN se puede obtener de una cantidad muy grande de fuentes por lo que existen diferentes protocolos de extracción. Pueden ser automáticos o manuales y son normalmente sencillas y similares para todo tipo de muestras. EL objetivo es conseguir la cantidad máxima de ADN y de excelente calidad. Hay numerosos métodos para obtener ADN:

- Extracción orgánica
- Separación magnética
- Intercambio iónico
- Gradiente de densidad
- Precipitación por sales

La mayoría tienen las siguientes etapas:

1. Rotura celular que se puede producir métodos químicos, mecánicos u osmóticos.
2. Incubación enzimática, la que más se utiliza es la proteínasa K y es para separar el ADN de las proteínas.
3. Separación del ADN de los distintos componentes de la célula, se utilizan una disolución de fenol, soluciones salinas o bolas magnéticas.
4. Precipitación del ADN con etanol, sales y bajas temperatura para eliminar las sustancias que puedan interferir. Se

centrifuga y el ADN forma el sedimento, se quita el sobrenadante y se deja secar para que se evapore el etanol

5. Resuspender el ADN, se disuelve con un volumen de agua o tampón para el posterior estudio(16).

#### **Extracción del ARN**

El que se obtenga un ARN de calidad es primordial para la realización de diferentes técnicas moleculares, si no tenemos ARN de calidad se pueden complicar los procedimientos posteriores.

La extracción del ARN es complicada, porque es poco estable ya que hay presencia de RNAsas, polisacáridos o proteínas que dificultan la obtención. También se ha visto que la presencia de estos contaminantes interfieren en la amplificación(17) su obtención no es sencilla debido a la susceptibilidad de esta molécula a la presencia de contaminantes como RNAsas, proteínas y polisacáridos. Adicionalmente, debido a la diversa composición de la pared celular de los hongos se requiere optimizar los procesos de extracción de ARN para organismos específicos. Este estudio evalúo el uso de diferentes metodologías de homogeneización de tejido (nitrógeno líquido y liofilización).

La diferencia que tiene la extracción de ARN con respecto a la de ADN es que hay que tener más precaución, para poder evitar contaminaciones con RNAasas. Hay una serie de pautas para la extracción de ARN como.

- La zona de trabajo de ADN tiene que ser diferente de donde se trabaja con ARN para evitar contaminaciones.
- Las superficies de la zona de trabajo tienen que estar tratadas con productos específicos y etanol al 70%.
- Usar guantes estériles durante todo el proceso
- Todo el material, agua, soluciones de trabajo deben estar certificado como libre de nucleasas

Después de seguir estas precauciones, la técnica consiste en conseguir células lo más limpias posibles. Una vez obtenidas las células los protocolos siguen prácticamente las mismas etapas:

1. Lisis celular y desnaturalización, se utilizan una mezcla de detergente con tiocianato de guanidina que inhibe a las RNAasas y se queda el ARN aislado de proteínas.
2. Inactivación de ribonucleasas que se realiza con el tiocianato de guanidina y b-mercaptoetanol
3. Precipitación de las proteínas y el ARN está en suspensión.
4. Eliminación de ADN contaminante
5. Dilución de ARN con agua libre de RNAsas

Ahora el ARN está preparado para que se pueda realizar cualquier técnica analítica(1).

## Técnicas para el análisis genético

### Endonucleasas de restricción

Son enzimas que su característica principal es que cortan el ADN en zonas que tienen unas secuencias muy específicas y habitualmente son secuencias palindrómicas. Estas enzimas cortan los enlaces fosfodiéster de ADN bicatenario.

Las endonucleasas de restricción se encuentran en muchas bacterias y se nombran a partir de la bacteria de origen, por ejemplo, Eco RI o BamHI. Las enzimas de restricción cortan el ADN en partes iguales y previsibles por lo que un cambio en la zona altera ese corte y el tamaño del fragmento(1).

Las aplicaciones de las endonucleasas son muy variadas, como descubrimiento de muchos genes, estudios de metilación del promotor de varios genes etc.

### La Taq polimerasa

En 1988 se publicó la utilización de una enzima termoestable para la amplificación del ADN, se aisló la enzima Taq polimerasa a partir de *Thermus aquaticus* que es una bacteria que se encuentra en ambientes acuáticos y temperaturas que rondan los 100 °C(18)

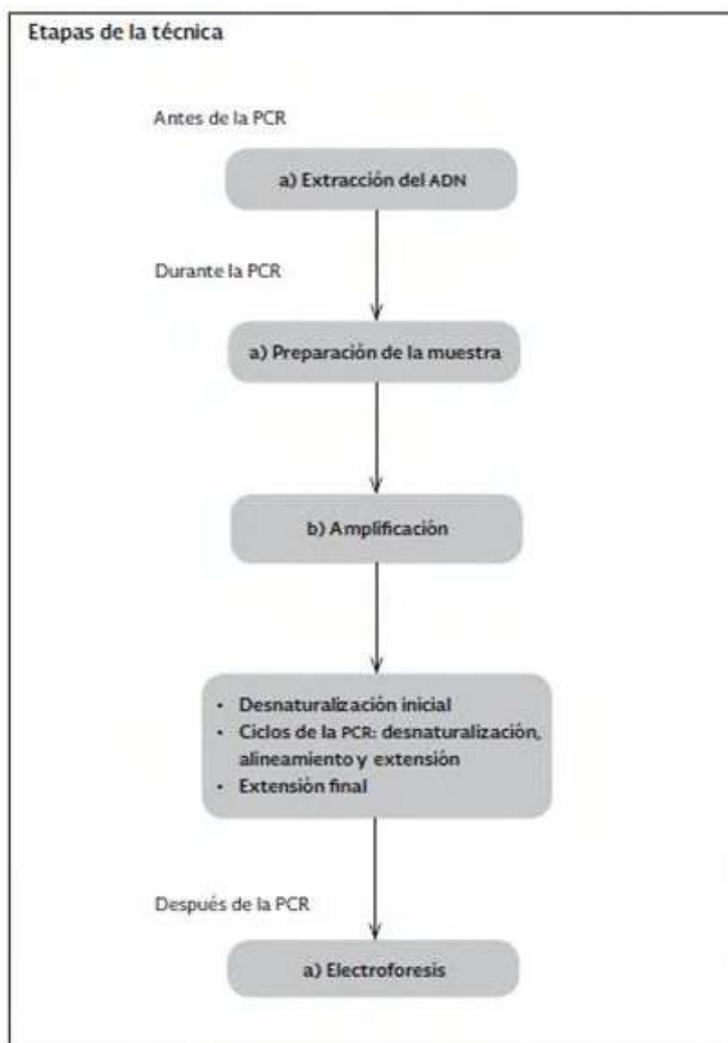
La Taq polimerasa es la enzima principal que se utiliza para amplificar el ADN. Permite la automatización y la simplificación de la PCR sin tener que añadir polimerasas en cada ciclo. Esta enzima tiene una desventaja y es que no tiene actividad correctora por lo que durante la copia del ADN puede cometer errores. Pero hoy en día se han encontrado ADNpolimerasas con actividad correctora que además son termoestables y termoactivas(19).

### Electroforesis

Como el ADN tiene carga negativa puede migrar mediante electroforesis colocándolo en el lado del cátodo y aplicando un voltaje que haga que se mueva hacia el ánodo.

La electroforesis se ha ido automatizando con el desarrollo de otras metodologías que se basan sobre todo en la introducción de capilares, aunque el gel de agarosa sigue siendo de los más utilizados. Hay varios factores que afectan a la migración del ADN

1. Concentración de agarosa, cuanto mayor es la concentración mayor dificultad tienen los fragmentos para migrar.
2. El tamaño de los fragmentos de ADN, los de peso molecular más bajo migran más rápidamente.



(Serrato Díaz, A. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. 2014).

3. El voltaje empleado, a mayor voltaje más velocidad de migración.

A continuación, se le añade un colorante que suele ser el azul de bromofenol, esto permite ver el avance del ADN en el gel. Los fragmentos de ADN se visualizan después con luz ultravioleta ya que se le han añadido compuestos que se intercalan con las moléculas de ADN y producen fluorescencia(1)

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

Desde la invención de la reacción en cadena de la polimerasa en el año 1985 por K. Mullis y sus colaboradores se ha revolucionado la biología molecular. La PCR es una técnica para amplificar una zona del ADN que esta situada entre dos regiones de ADN de secuencia conocida. Antes solo se podía obtener pequeñas cantidades de un genes específicos, ahora a partir de un único gen se puede amplificar hasta millones en unas horas(20)(19).

#### Principios de la PCR

La PCR se basa en el mecanismo de replicación de ADN *in vivo*: En el que el ADN se desenrolla y pasa a una sola hebra de ADN, esta se duplica y se vuelve a enrollar. Por lo que esta técnica consiste en ciclos repetitivos de lo que ocurre en la replicación de ADN.

En primer lugar, es necesario que se desnaturalice el ADN es decir que se desenrolle la doble hélice y esto se lleva a cabo elevando la temperatura a 93-96 °C. En esta primera fase las dos cadenas complementarias del ADN se separan por el aumento de la temperatura que lo que hace es romper los puentes de hidrogeno y aumenta el número de bases desapareadas. La reacción se completa cuando todo el ADN bicatenario está en dos cadenas de ADN monocatenario. Este proceso de desnaturalización depende del tipo de disolvente, del pH y de la concentración salina.

La segunda etapa de la reacción es disminuir la temperatura entre 35-60 °C para permitir que los cebadores se unan por

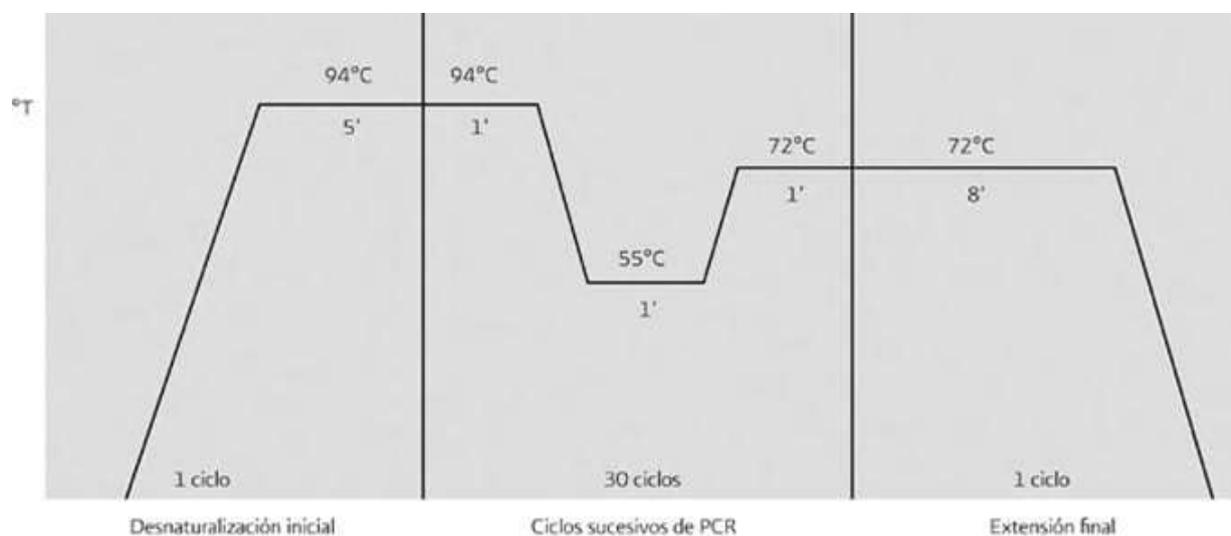
complementariedad al ADN molde. Esta segunda fase se conoce como hibridación.

Por ultimo en la fase de extensión o elongación la enzima Tac polimerasa actúa sobre los primers y empieza su función catalítica a una gran velocidad en la que va incorporando nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. Dependiendo de la enzima polimerasa que se use la temperatura varia, si se utiliza la Taq polimerasa la temperatura de elongación es de 72 °C.

Estas tres fases constituyen un ciclo de PCR, una vez terminado el primer ciclo tenemos dos hebras de ADN por lo que se debe realizar más ciclos para poder producir una banda visible en el gel. Por cada ciclo se duplica la cantidad de fragmento a amplificar. Al final del proceso se obtiene una cantidad aproximadamente a  $2^n$  siendo n el número de ciclos realizado.

#### Componentes de la PCR

- ADN diana Se podría realizar la amplificación por PCR siempre que este presente al menos un ejemplar intacto del gen. La cantidad de ADN que se usa aproximadamente para la realización de la PCR es 0.05-1.0 µg.
- Cebadores Generalmente se utilizan cebadores de 16 a 30 nucleótidos de longitud y Deben evitarse las secuencias repetidas invertidas y las secuencias complementarias.
- ADN polimerasa Solo pueden incorporar nucleótidos al extremo 3' de un polinucleótido. La primera ADN polimerasa termoestable utilizada fue la ADN polimerasa Taq, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima es la más utilizada pero hay otras ADN polimerasas que se pueden usar como por ejemplo estas Vent, Deep-Vent, Pfu y UITma.
- Tampones y  $MgCl_2$  La técnica de la PCR necesita un tampón apropiado, y su composición varía según el tipo y las características de la enzima usada.



(Serrato Díaz, A. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. 2014).

- **Desoxirribonucleósido-trifosfatos** Para la síntesis de ADN hacen falta desoxirribonucleósido-trifosfatos libres (dNTP) La cantidad de dNTP para la realización de la PCR tiene que estar comprendido entre 20-200  $\mu$ M, y los cuatro dNTP tienen que usarse en las mismas concentraciones para minimizar los errores de incorporación(20).

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

Es un método sensible y versátil que se usa para obtener ADNc libre a partir de ARN. Por lo que primero se debe hacer una extracción de ARN de la muestra. La RT-PCR se realiza de forma similar a como los virus RNA hacen la replicación. Utilizan ARNm como molde y la enzima que sintetiza el ADNc es una transcriptasa reversa o inversa. Esta enzima es la que utilizan los retrovirus para transcribir a ADN su información genética y que se pueda introducir en el genoma del huésped. Una vez obtenido el ADNc se realiza una PCR clásica. Por lo tanto la diferencia es que se utiliza la transcriptasa inversa como paso previo, para pasar el ARN a ADNc(1).

### PCR a tiempo real

Los que empezaron a vislumbrar la PCR a tiempo real fueron Higuchi y colaboradores en 1992. Estos grabaron la incorporación de bromuro de etidio al ADN en cada ciclo de PCR. Es un método que permite simultáneamente cuantificar y amplificar el ADN. El término tiempo real quiere decir que la detección de ocurre en cada ciclo de reacción. También es posible cuantificar la cantidad de ADN que contiene la muestra. Para esto se usa un marcaje fluorescente que se inserta en las cadenas de ADN que se están formando y modifican las sondas de oligonucleótidos de ADN que emiten fluorescencia cuando se hibridan(1).

La PCR a tiempo real tiene varias ventajas con respecto a la PCR convencional, una de ellas es que se va monitoreando la amplificación del ADN conforme va ocurriendo la reacción y otra ventaja es que se cuantifica la cantidad de ADN sin necesidad de manipularla después(21)se tiene la noción de que parte de la explicación de los diferentes fenómenos biológicos se encuentra escondida en lo más recóndito del genoma celular y que una de las claves para entender dichos fenómenos es el estudio de los genes. Uno de los descubrimientos más importantes de la historia que marcó el inicio de una nueva era en el estudio y conocimiento de los ácidos nucleicos fue el de Watson y Crick, al descifrar la estructura del ADN (ácido desoxirribonucleico).

Hoy en día, la PCR a tiempo real es el método más sensible para cuantificar y detectar ácidos nucleicos. Ya que tiene una alta sensibilidad y especificidad.

### PCR digital

Es un método de cuantificación absoluta que tiene utilidad de describir variantes genéticas que están en porcentajes bajos. La PCR digital consiste en dividir la muestra en multitud de fracciones, de manera que cada fracción contenga una única molécula de ADN. El producto obtenido se detecta gracias a los primers que están marcados con fluorocromos. De esta forma se consigue una amplificación no sesgada de la totalidad de moléculas de ADN y se obtiene una medi-

da exacta de la proporción existente entre las moléculas minoritarias y mayoritarias. Tiene una sensibilidad mayor que la PCR cuantitativa. Se considera un método que tiene un potencial enorme en la detección de CNVs, variantes genéticas en mosaico, grandes reordenaciones y variantes somáticas que están en baja proporción(22)emulsion, amplification, and magnetics.

### Técnicas para la detección de variantes

#### Secuenciación Sanger

Este tipo de secuenciación la ideó Sanger y colaboradores en 1977, y se basa en usar la ADN polimerasa y terminadores de cadenas llamados didesoxinucleótidos. Es una síntesis enzimática en la que actúa la ADN polimerasa y partir de un primer que tiene una secuencia complementaria a la molécula de ADN que vamos a estudiar. Se van añadiendo al extremo 3' de la cadena 2'-didesoxinucleótidos y 2',3'-didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos. Los 2',3'-didesoxinucleótidos (ddNTPs) difieren de 2'-didesoxinucleótidos (dNTPs) en que no tienen el grupo hidroxilo en el carbono 3', por lo que su incorporación evita que se forme el enlace fosfodiéster entre la cadena en crecimiento y el próximo nucleótido. Esto hace que no se añaden más nucleótidos a la cadena y la síntesis se detiene. Con esto lo que se quiere conseguir es que se produzcan fragmentos de diferentes tamaños de ADN al azar. Estos fragmentos se saben cuáles son por el último nucleótido de cada fragmento que tiene una molécula fluorescente asociada. A continuación se realiza la separación electroforética y la detección de los productos(1).

#### Secuenciación masiva

La tecnología de secuenciación comenzó después del éxito del proyecto genoma humano en 2005 y ha ido reduciendo el costo de ADN por cada base. La secuencia inicial del genoma costó alrededor de 350 000 000 dólares. Esta reducción del precio ha estimulado diversas iniciativas internacionales para secuenciar los genomas enteros de miles de individuos. La abundante información genética resultante y el costo siempre decreciente de la secuenciación de DNA genómico están incrementando de manera notoria la capacidad para diagnosticar y, finalmente, tratar, enfermedad en seres humanos. Obviamente, cuando la secuenciación del genoma personal se haga común, habrá cambios notorios en la práctica de la medicina, porque finalmente se harán terapias a la medida para la conformación genética exacta de cada individuo(23).

Básicamente, se fundamenta en la secuenciación en paralelo y en una reacción de gran cantidad de secuencias de ADN diferentes. Hay varios sistemas que tienen diferencias entre sí, como la tecnología de secuenciación, tamaño de los fragmentos que es capaz de secuenciar, la cobertura que alcanza o el número de lecturas que logra hacer en una carrera.

La secuenciación masiva tiene un gran potencial a la hora de descubrir todos las clases de variación genómica en un solo experimento, incluyendo variantes de un solo nucleótido, pequeñas inserciones o deleciones, mutaciones pun-

tuales o variantes estructurales tanto desequilibradas como equilibradas(24) gracias al auge de la medicina de precisión, el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de gran parte de estas patologías está basado en la detección de alteraciones en el genoma. Las técnicas de secuenciación masiva paralela del ADN, conocida también como secuenciación de segunda generación (next-generation sequencing o NGS).

### **Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)**

Esta técnica permite revelar cambios en el número de copias de la secuencia del genoma, es decir proporciona información de si hay inserciones, duplicaciones y deleciones de porciones pequeñas o grandes del genoma(1).

Esta técnica usa muy poca cantidad de ADN y permite amplificar hasta 60 secuencias específicas.

El fundamento de la técnica consiste en el análisis de diferentes regiones de ADN mediante sondas que hibridan en puntos concretos.

Esta sonda compuesta por 2 secuencias de hibridación, complementarias al ADN de interés. Una de ellas tiene en el extremo 3' una secuencia espaciadora con un tamaño diferente para cada sonda y la vez esta secuencia espaciadora tiene en su extremo 3' una secuencia complementaria al primer. Y la otra secuencia de hibridación en su extremo 5' tiene una región y que va a ser complementaria al primer. De esta forma los primers son idénticos para todas las sondas y lo que las diferencia es el tamaño del fragmento espaciador

#### *Etapas*

En primer lugar, se desnaturaliza el ADN que pasa de ser una bicatenario a monocatenario esto se produce por un aumento de la temperatura a 96°.

A continuación, se produce una hibridación con las sondas.

En tercer lugar, mediante una ligasa termoestable se une las dos partes de la sonda. Para que esto se produzca es necesario que la sonda se haya unido al ADN correcto.

Llegados a este momento se realiza una PCR con los primers universales para amplificar las sondas. Estos primers están marcados con fluorocromos por lo que permite ver los resultados mediante electroforesis capilar.

Como resultado de la electroforesis se obtienen una serie de picos que se ordenan según el tamaño de las sondas. La intensidad de cada pico nos dice la cantidad de ADN que se ha amplificado, que es proporcional a la cantidad de ADN. Se comparan muestras frente a controles y donde se ve un pico más alto significa que había una duplicación, y donde se ve un pico más bajo una deleción(25).

### **Tecnología de Micro Arrays**

El array-CGH proporciona información de cambios en el número de copias de nuestro genoma con rapidez, una alta resolución y puede ser automatizada. En los últimos años se han desarrollado sistemas de detección de alteraciones en el

número de copias ADN presentes en una muestra a lo largo de todo su genoma mediante la técnica de hibridación genómica comparada(26).

La CGH se basa en la hibridación competitiva de dos ADN (ADN problema y ADN control) que están marcados con distintos fluorocromos. Se mezclan en cantidades equimolares y se realiza una hibridación in situ sobre segmentos de ADN mucho más pequeño que un cromosoma. Estos segmentos se le denominaron sondas y su secuencia y coordenadas son conocidas. Ambos ADN compiten por hibridar en los mismos lugares. En condiciones normales, la cantidad de ADN marcado en rojo (control) y verde (problema) era la misma, el resultado final segmentos de ADN marcados en color amarillo por contener una mezcla en proporción 1:1 de ambos fluorocromos (rojo + verde = amarillo).

En condiciones patológicas, puede existir alguna ganancia o pérdida de ADN. Si lo que sucede es una ganancia, hay más cantidad de ADN disponible para hibridar, por lo que la hibridación en esa zona tiene más proporción de fluorocromo (verde). Por el contrario si lo que ocurre es una pérdida, la zona delecionada aparece en rojo porque hay más cantidad de ADN con fluorocromo rojo para hibridar.

La CGH permitía, por tanto, la detección de ganancias y pérdidas de regiones del ADN en todo el genoma del caso problema por la comparación de las intensidades de las señales de hibridación(27).

#### *Microarrays de BAC*

Fue el primer sistema empleado de arrays-CGH en la clínica y en la investigación. En este tipo de microarrays, cada sonda que se coloca en el soporte físico es ADN obtenido de un único BAC. Los primeros *arrays* de BAC que estuvieron a nuestra disposición contenían unos 3.000 clones y poseían una resolución de 1 Mb. Posteriormente, los sistemas de impresión de *arrays*-CGH de BAC se mejoraron, alcanzando un máximo de resolución de 30.000 clones, con una cobertura casi completa del genoma(28).

#### *Microarrays de oligonucleótidos*

Los *microarrays* de oligonucleótidos se desarrollaron a partir de la tecnología de *arrays*-CGH. Los oligonucleótidos son moléculas que contienen unos 60-80 pares de bases sintetizados de forma exclusiva para su inclusión en el *microarray*. Estos segmentos de ADN tienen unas secuencias genómicas de localización definida en el genoma y con un contenido genético conocido.

Estos tienen una serie de ventajas con respecto a los arrays BAC como que pueden incluir en un solo ensayo cientos de miles de sondas y esto aumenta enormemente su resolución. Otras dos grandes ventajas son que hay una gran cantidad de sondas posibles y tiene una cobertura que permite cubrir por completo la secuencia del genoma(28).

#### *Microarrays de SNP*

Son una variante de los *arrays* de oligonucleótidos, pero contienen variantes de tipo SNP. Por lo que son capaces de

reconocer cualquier alteración (duplicación, delección) de los *loci* representado en el microarray sino que además detectan en una muestra problema la presencia o ausencia de un SNP determinado (28).

Por tanto, estos *arrays* permiten conocer simultáneamente la secuencia de cientos de miles de variantes génicas presentes en la muestra. Como consecuencia esto nos permite examinar el origen de cada copia y vislumbrar disomias uniparentales y pérdida de heterocigosidad.

La gran ventaja que tiene los microarrays de SNP es que realiza una visión general del genoma.

## CLASIFICACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS

Para el diagnóstico de los síndromes de cáncer hereditario se estudian una serie de variantes patogénicas en los genes de predisposición al cáncer. Esto es muy útil para familias y pacientes que tienen alguna variante, ya que se disponen de información adicional y pueden tomar medidas preventivas para el diagnóstico, tratamiento o seguimiento. Pero los estudios genéticos a menudo encuentran variantes que no tienen una interpretación clínica precisa. Estas se llaman variantes de significado clínico incierto o desconocido. Por lo que es muy importante una clasificación adecuada de las variantes.

### Evidencias basadas en la secuencia de DNA

La naturaleza de una variante y la zona dentro de la secuencia da información muy importante. Por ejemplo, en los genes supresores de tumores las variantes que interrumpen la zona funcional de la proteína tienen altas posibilidades de ser patogénica. Pero el efecto de otras variantes es más complicado de predecir.

#### Evidencias clínico-moleculares

- **Fenotipo** Es de ayuda cuando existe una asociación entre la variante y la características clínicas. Algunos síndromes hereditarios de cáncer tienen una penetrancia casi completa y el fenotipo es característico (Neurofibromatosis, poliposis adenomatosa familiar...). En estos casos la información clínica es muy importante para la evaluación de la patogenicidad de la variante, aunque no debería ser el único criterio (1).
- **Cosegregación** Compara los resultados del estudio genético en una familia que tenga la misma variante. Identifica que la variante genética es la causa de la enfermedad. Esto no siempre es fácil, porque la penetrancia no es completa en algunos síndromes.  
Es muy importante la selección del individuo por el que se comienza el estudio genético en la familia (29).
- **Frecuencia alélica** Si la frecuencia alélica de una variante es alta en la población tiene menos probabilidad de ser patogénica. Puede ocurrir que algunas variantes patogénicas tengan una frecuencia alta en algunas poblaciones esto se debe a un efecto fundador o son hotspots (puntos calientes de mutación).

- **Características anatomopatológicas** Algunos tumores se producen con más asiduidad en portadores de variantes patogénicas en algunos genes. Por ejemplo, portadores BRCA1 se dan tumores de mama triple negativos.
- **Co-ocurrencia** Para las variantes que se descubren junto a una variante patogénica en el mismo gen el estudio de la fase alélica es importante porque con la información fenotípica del portador es útil a la hora de la clasificación. Este tipo de análisis es muy importante para variantes de genes BRCA2, ATM, MMR, porque los síndromes asociados a variantes bialelicas es diferente a portadores de monoalélicos (1).

### Evidencias funcionales

Describen los efectos moleculares de una variante e incorpora las predicciones *in silico* o el resultado de ensayos experimentales del efecto de la variante en la función. Son importantes en experimentación, pero su uso debe ser cauteloso para clasificación de variantes.

- **Resultado de las predicciones *in silico*** Hay numerosos predictores *in silico* del probable efecto de una variante a nivel de proteínas o RNA. Como la sensibilidad y especificidad de estas predicciones es moderada se tienen que considerar como evidencias adicionales. Si existe una coincidencia alta entre distintos programas, aumenta el valor de la predicción. Es importante decir que los predictores son útiles para priorizar las variantes que se van a estudiar a nivel funcional (30).
- **Resultados experimentales** Este tipo de ensayos incluyen el análisis a nivel de RNA y de proteína, determinan el impacto de una variante en diferentes niveles moleculares. Sin embargo, la importancia clínica de los resultados experimentales es con frecuencia escasa. Esto se debe a que no hay ensayos estandarizados y robustos que se puedan replicar en distintos contextos (1).

### Categorías de clasificación

La International Agency for Research on Cancer (IARC) ha diseñado un sistema de clasificación que tiene una importancia crucial para la categorización estandarizada de variantes. Hay 5 clases de variantes:

- Patogénicas
- Probablemente patogénicas
- Significado desconocido
- Probablemente benignas
- Benignas

A cada una de estas clases de variantes se le da una medida cuantitativa de probabilidad de patogenicidad. Así, los estudios predictivos y seguimiento de alto riesgo se aconseja a portadores de variantes patogénicas y probablemente patogénicas, los portadores de variantes de significado desconocido no deben usarse para estudios predictivos, y los portadores de variantes benignas y probablemente benignas son no informativas.

Clase	Probabilidad de patogenicidad	Estudio predictivo de familiares en riesgo	Recomendaciones de seguimiento en familiares portadores
5. Patogénica	>0,99	Sí	Seguimiento de alto riesgo
4. Probablemente patogénica	0,95-0,99	Sí*	Seguimiento de alto riesgo
3. De significado incierto	0,05-0,949	No*	Basado en historia familiar y otros factores de riesgo
2. Probablemente benigna	0,001-0,049	No*	Tratado como individuo sin variantes responsables detectadas para el síndrome
1. Benigna	<0,001	No*	Tratado como individuo sin variantes responsables detectadas para el síndrome

(Alonso Sánchez M. et al. *Cáncer Hereditario. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2019*).

## ASPECTOS MOLECULARES DE PREDISPOSICIÓN HEREDITARIA AL CÁNCER DE MAMA Y AL CÁNCER DE OVARIO

### Introducción

El cáncer de mama es el más común en la mujer en los países desarrollados y subdesarrollados. En España, el riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida es de un 12%. Esta incidencia es similar a la de otros países del mediterráneo.

Por otro lado, en el mundo se diagnostican alrededor de 200.000 casos cáncer de ovario al año, es el cáncer ginecológico que tiene más mortalidad, esto es debido a que se diagnostica en estadios avanzados. Se han realizado estudios epidemiológicos en los que se han identificado múltiples factores de riesgo como pueden ser genéticos, hormonales o ambientales. En el cáncer de mama se da la gran mayoría en mujeres premenopáusicas, que hayan tenido antecedentes previos pero sobre todo antecedentes familiares(31).

### Genes de susceptibilidad con alta penetrancia

#### BRCA1 y BRCA2

##### Estructura y función

El gen BRCA1 es un gen que está localizado en 17q21, y es de gran tamaño. Con sus 5592 nucleótidos genera una proteína de más de 1800 aminoácidos que tienen numerosas actividades celulares(32).

La proteína BRCA1 consta de 4 dominios que son

- RING Se localiza en el extremo N-terminal, está muy conservado filogenéticamente y es abundante en cisteínas. Favorece la degradación de otras proteínas
- P300/CBP Regula la transcripción
- coiled-coil Colabora en la reparación por recombinación homóloga
- BRCT4 Pueden activar la transcripción de ciertos genes

En conclusión, la proteína BRCA1 interactúa con otras proteínas de oncogenes, genes supresores de tumores, reguladores del ciclo celular, activadores o represores de la transcripción, así como detección y reparación del ADN, remodelación de la cromatina, ubiquitinación, replicación del ADN etc. con el fin de proteger la estabilidad genómica(1).

El gen BRCA2 se encuentra en 13q12, tiene unos 11.000 nucleótidos que se traducen a una proteína de 3418 aminoácidos que tiene residuos fosforilables y tiene diversos dominios(33).

Las funciones de BRCA2 son más escasas que las de BRCA1. BRCA2 interviene en la reparación de ADN mediante recombinación homóloga y en el avance del ciclo celular.

##### Expresión de BRCA1 y BRCA2 y características tumorales

En la fase G1 del ciclo celular, la transcripción de BRCA 1 y BRCA2 es máxima aun también permanece elevada durante la fase S. Las proteínas BRCA 1 y BRCA2 se expresan en casi todos los tejidos y células que se han estudiado. Hay varias hipótesis para definir la especificidad tumoral, que queda limitada al tejido mamario y ovárico. Presencia de un factor específico que permite a las células seguir proliferándose incluso habiendo perdido dichos genes, que la reparación del ADN en estos tejidos dependa exclusivamente de BRCA 1 y BRCA2 y otros tejidos tenga mecanismos compensatorios o que en la mama y el ovario sufran una pérdida de heterocigosidad en BRCA1/2 con más rapidez y esto provoca defectos en la reparación del ADN.

En el humano si una célula no tiene BRCA1/2 funcionales, la reparación por recombinación homóloga es defectuosa y esto implica que se empleen mecanismos más propensos a errores, lo que crea inestabilidad cromosómica y acumulación de modificaciones en otros genes. Por esto BRCA 1 y BRCA2 son genes supresores de tumores. Habitualmente se pierde el alelo sano en los tumores de ovario y mama que portan una variante patogénica lo que reafirma esta hipótesis(1).

Los tumores BRCA1 tienen un alto grado histológico e índice mitótico, márgenes continuos expansivos, infiltración linfocítica y más áreas necróticas. Estos son normalmente triples negativos (ER-, PR- y HER3-). A menudo muestran una sobreexpresión de proteínas del ciclo celular y defecto de la expresión de genes asociados a ER

Los tumores BRCA2 se caracterizan por una mayor presencia tubular menores márgenes continuo expansivos e índices mitóticos. En este tipo de tumores es más frecuente la expresión citoplasmática de RAD51.

Los dos genes no se presentan en tumores esporádico de mama, pero el silenciamiento de BRCA1 por metilación del promotor se ha detallado en un 10-30% de cáncer de mama esporádicos.

#### *Variantes patogénicas en BRCA1 y BRCA2*

Se ha creado una base de datos con más de treinta mil familias y alrededor de 1700 variantes patogénicas distintas en cada gen, viendo variaciones en el tipo y la frecuencia de las variantes según la etnia o la zona geográfica. Se ha observado la existencia de mutaciones fundadoras en determinados grupos étnicos como por ejemplo en la población judía asquenazi que el 2% tiene una de estas dos variantes c.68\_69delAG (187delAG) y c.5266dupC (5385insC) en BRCA1 o c.5946delT (6174delT) en BRCA2.

La mayoría de variantes patogénicas consiste en pequeñas inserciones o deleciones que producen una alteración en el marco de lectura de la secuencia de ADN produciendo un codón de parada prematuro. También se han descrito sustituciones que causan directamente codones de parada. Ambas alteraciones producen proteínas no funcionales.

También se ha visto pero en menor proporción grandes deleciones o duplicaciones que abarcan uno o más exones del gen. Además de las numerosas variantes de significado incierto que son frecuentes en la población(1).

#### **TP53**

La proteína TP53 tiene numerosas funciones celulares y es imprescindible en el control del ciclo celular posponiendo su progresión o favoreciendo la apoptosis. Las variantes patogénicas heredadas son raras y producen el síndrome de Li-Fraumeni. Este está caracterizado por tumores en edad temprana como sarcoma, o glioma y cáncer de mama en mujeres jóvenes. Las variantes patogénicas en TP53 tienen un riesgo superior a la población de mujeres menores de 45 años de edad. Los cánceres de mama en los que esta proteína está alterada suelen presentarse avanzados, y en la mayoría con receptores HER2/neu positivos(34).

#### **CDH1**

Este gen produce la proteína E-cadherina que es una glicoproteína transmembrana del tejido epitelial, encargada de la adhesión intercelular y de eliminar la invasión celular. Las alteraciones en E-cadherina incrementa la movilidad celular y la capacidad metastásica. Las variantes patogénicas de CDH1 son las responsables del cáncer gástrico difuso here-

ditario. También se han detectado variantes de CDH1 en mujeres con cáncer de mama lobulillar aunque la asociación es extremadamente baja.

#### **PTEN**

El gen PTEN origina una proteína fosfatasa lipídica que su función es regular la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa. La pérdida de esta función produce una mayor proliferación celular y supervivencia. Las variantes patogénicas de PTEN se localizan en múltiples tumores como mama, melanoma o endometrio y también producen el síndrome de Cowden. En este síndrome aumenta el riesgo de cáncer de mama, tiroides, colon, endometrio y renales en mujeres adultas y también aumenta el riesgo de enfermedad mamaria benigna. La neoplasia más común en el síndrome de Cowden es el cáncer de mama aunque del total de cáncer de mama solo es responsable de <1%(34).

#### **SKT11**

El gen SKT11 produce una serina-treonina quinasa y su función es participar en las uniones de membranas celulares y apoptosis. También regula negativamente la vía mTOR. Las variantes patogénicas producen el síndrome de Peutz-Jeghers que se caracteriza por múltiples pólipos hamartomatosos gastrointestinales, y pigmentaciones mucocutáneas en la mucosa bucal, labios y dedos. Aumenta el riesgo de cáncer colorrectal, pancreático, gástrico, intestino delgado, ovárico y de mama que suele aparecer de forma temprana. Las variantes patogénicas se descubre en más del 70% de los pacientes con síndrome de Peutz-Jeghers pero su contribución al cáncer de mama es escaso(34).

#### **Genes de susceptibilidad con moderada penetrancia**

##### **ATM**

El gen ATM se encuentra en 11q22-23 y tiene 66 exones. Este gen produce la proteína ATM que es una PI3K-serina/treonina quinasa que es esencial para comenzar la respuesta celular contra roturas de la cadena de ADN, inducidas por radiación, estrés oxidativo, o quimioterapia. Cuando el ADN sufre una lesión, la ATM fosforila numerosos sustratos que a su vez fosforilan a RAD51, BRCA1, CHEK1, CHEK2 o p53 que son los encargados de la reparación del ADN, control de la apoptosis o del ciclo celular.

Los pacientes que son portadores de alteraciones de ATM en homocigosis sufren ataxia telangiectasia que es un síndrome autosómico recesivo que produce ataxia cerebelosa, inmunodeficiencia, telangiectasias oculocutáneas y un mayor riesgo de sufrir leucemia, linfoma u otros tipos de cáncer como el cáncer de mama.

Se calcula que entre el 3-8% de todos los cánceres de mama se puede achacar a ATM, sobretodo lo casos familiares(35).

##### **CHEK2**

El gen CHEK2 se encuentra en 22q12.1 y tiene 14 exones. Cuando se producen lesiones en el ADN, ATM fosforila a

CHEK2 y empieza su actividad quinasas. Fosforila a otras proteínas como BRCA1, BRCA2, p53, CDC25C y a otras quinasas que se relacionan con el control del ciclo celular o apoptosis.

En la población española se ha visto que hay familias portadoras y se ha calculado que c.1100delC produce aproximadamente una duplicación del riesgo de cáncer de mama.

Además de c.1100delC, se han descrito otras variantes del gen, como la p.Ile157Thr. Este cambio disminuye la actividad(1).

## **PALB2**

El gen PALB2 tiene 13 exones, produce una proteína de 1186 aminoácidos y está localizado en 16p12. La proteína se une por el extremo N-terminal con BRCA1. Además, PALB2 tiene dos regiones de unión al ADN. En la región C-terminal tienen un dominio denominado WD40 que interactúa con RAD51 y BRCA2. Por lo que PALB2 interviene mediando interacciones proteicas y está implicada en la localización nuclear y proporciona estabilidad BRCA2.

Se observó que las variantes patogénicas de PALB2 contribuyen a un riesgo de entre 2 y 30 veces mayor de incidencia de cáncer de mama.

Las variantes patogénicas de PALB2 se asocian a tumores mamarios con un fenotipo más agresivo, marcador Ki-67 de proliferación y alrededor del 40% de los cáncer de mama tienen un fenotipo triple negativo(1).

## **RAD51C**

Es de la familia RAD51 y es un gen parálogo. Está implicado en la reparación del ADN por recombinación homóloga. La proteína se acumula en las zonas lesionadas del ADN junto con RAD51, interviene en algunas etapas del proceso de reparación y además colabora en la activación de CHEK2. Por lo que RAD51C ayuda a preservar la integridad del genoma.

En las mujeres portadoras de alguna variante patogénica, la edad media de diagnóstico del cáncer de ovario es aproximadamente 60 años, mayor que para BRCA1 y muy parecido a la población general. Las familias con variantes patogénicas en RAD51C suelen presentar también una gran variedad de tumores en diferentes órganos. La mayoría de cáncer ovario son adenocarcinomas serosos de alto grado.

## **RAD51D**

El gen RAD51D tiene 10 exones, codifica una proteína de 328 aminoácidos y pertenece a la familia de proteínas RAD51. Forma un complejo con RAD51B, RAD51C y XRCC2 que es responsable de la atracción o estabilización de RAD51 a zonas dañada del ADN. También contribuye en la protección de los telómeros. La identificación de variantes patogénicas en RAD51c en familias con cáncer de ovario y mama provocó el estudio de RAD51D en la susceptibilidad al cáncer(34).

## **RAD51B, XRCC2 y XRCC3**

En estudios recientes estudiaron la existencia de variantes patogénicas monoalélicas en línea germinal en los otros pa-

rálogos de RAD51 implicado en la misma vía de reparación del ADN. Se han visto variantes deletéreas en RAD51B en algunos casos de cáncer de mama y ovario, y las variantes missense raras son más comunes que en controles, lo que insinúa que una proporción de estas variantes es deletérea.

Sin embargo, es poco probable que RAD51B contribuya al riesgo de cáncer ovario.

También se han visto en casos familiares variantes deletéreas en XRCC2 pero estudios poblacionales no confirman la asociación con el riesgo de cáncer de mama(36)RAD51C, RAD51D, XRCC2, and XRCC3.

## **BRIP1**

Este gen contiene 20 exones y produce la proteína BRCA1-interacting protein 1 (BRIP1) y tiene alrededor de 1200 aminoácidos. Está implicada en multitud de procesos sobre todo en la replicación del ADN y reparación por recombinación homóloga. Durante la replicación se une al ADN y así evita que se pliegue y lo mantiene desenrollado para que pueda intervenir la polimerasa. Las células que no tienen BRIP1 son más sensibles a la radiación y a agentes que producen enlaces cruzados en el ADN. Este gen se describió como un gen de riesgo intermedio para el cáncer de mama. Pero estudios posteriores no revelan ninguna asociación. Lo que si se ha visto que BRIP1 podría ser un gen de alto riesgo para cáncer de ovario seroso de inicio tardío porque el promedio de la edad a la que diagnosticado es de 61 años, algo superior que las pacientes con historia familiar de cáncer de ovario(1).

## **BARD1**

Este gen produce una proteína de 777 aminoácidos que tiene un dominio RING, tres repeticiones de anquirina y dos dominios BRCT. BRCA1 y BARD1 forman un heterodímero a través de los dominios N-terminales, fundamental para la estabilidad de BRCA1 y para su pronta reubicación en sitios dañados del ADN. Este heterodímero trabaja como una ubiquitina ligasa de la ARN polimerasa II, evitando la transcripción del ADN dañado. Se han descubierto variantes deletéreas asociadas a cáncer de mama, ovario y de útero y se ha visto una mayor frecuencia de estas variantes en mujeres con cáncer de ovario(37).

## **ASPECTOS MOLECULARES DEL SÍNDROME DE LYNCH Y DE OTROS SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN A CÁNCER COLORRECTAL NO POLIPÓSICO**

### *Síndrome de Lynch*

#### **Generalidades**

El síndrome de Lynch, es un síndrome genético, con un patrón de herencia autosómico dominante, heterogéneo y con penetrancia incompleta. El síndrome de Lynch predispone al desarrollo principalmente de cáncer colorrectal, y de otras neoplasias como endometrio, ovario, estomago, páncreas o próstata entre otros(38). Este síndrome se produce por mutaciones en línea germinal de los genes que intervienen en

el mecanismo de reparación de errores en el apareamiento de nucleótidos (MMR mismatch repair) que se producen en la replicación del ADN: MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2(39).

Existen dos situaciones que son poco frecuentes y muy particulares de síndrome de Lynch donde la causa no se relaciona con mutaciones en los genes MMR, aunque directamente sí, ya que se produce un bloqueo de su función. Una de ellas es la epimutación de MLH1. Lo que se produce es una inactivación constitutiva de MLH1 a consecuencia de la hipermetilación del promotor del gen en la fase embrionaria. Otra de estas alteraciones estructurales en línea germinal que afecta al gen EPCAM que se encuentra muy cerca al gen MSH2 y como consecuencia se produce la metilación y afecta al promotor de MSH2(39.)

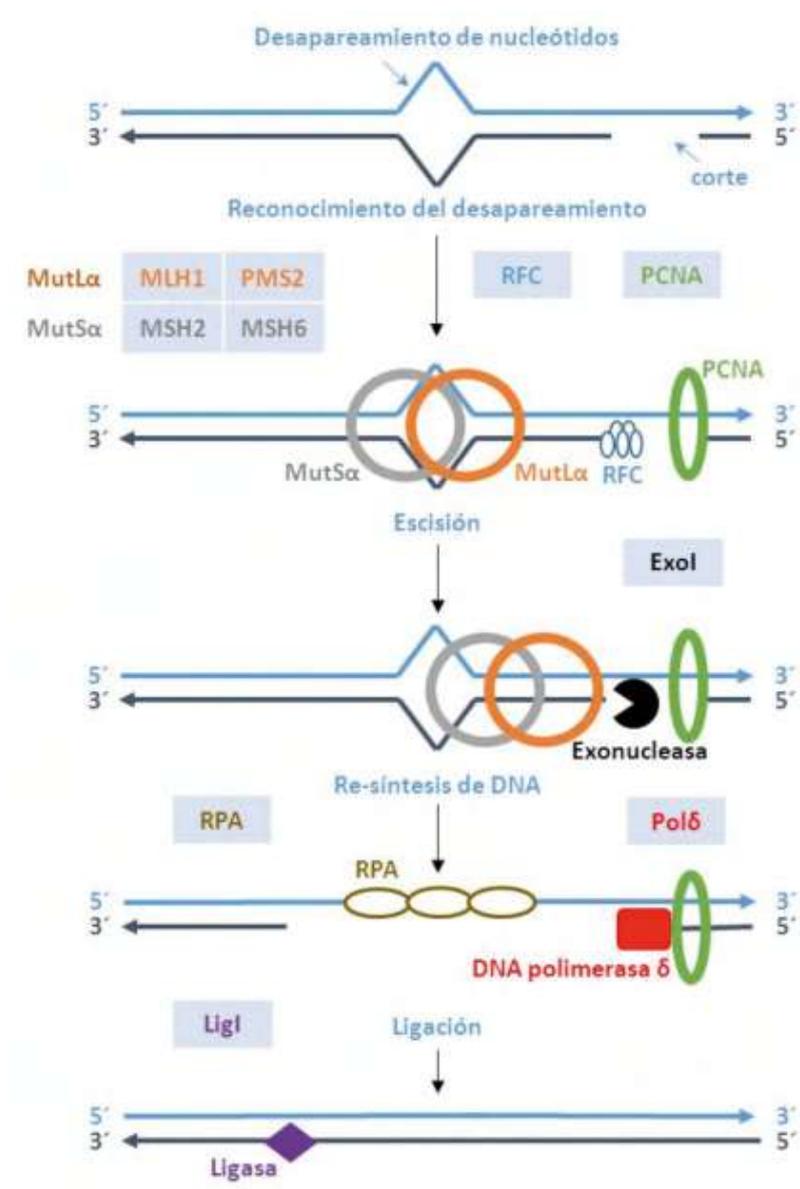
### Mecanismo MMR

Los genes que colaboran en el mecanismo MMR codifican para las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 y estos genes son los responsables del síndrome de Lynch. Estas proteínas

forman heterodímeros para realizar su función de reparar el ADN. Los heterodímeros MSH2-MSH6 (MutSa) reconocen y se juntan a los apareamientos erróneos de nucleótidos o alteraciones de tipo inserción-delección. Después un segundo heterodímero que está formado por MLH1-PMS2 (MutLa) se une al MutSa (MSH2-MSH6) junto con unos cofactores como el factor de replicación C y el antígeno nuclear de celular de proliferación reclutan a la exonucleasa -1 que escinde una porción de ADN que tiene el error detectado. Las proteínas que reparan los errores se liberan y se une la proteína de replicación A al ADN abierto que lo mantiene desenrollado para que actúe la polimerasa- $\delta$  que resintetiza el fragmento escindido. Por último se produce la ligación del trozo reparado y el error queda subsanado(40)

### Características de los tumores del síndrome de Lynch

Los tumores del síndrome de Lynch se caracterizan por tener un déficit en la función del sistema MMR. Este sistema de reparación del ADN es el encargado de corregir los



errores de apareamiento que se producen durante la replicación del ADN en la fase S del ciclo celular.

Cuando el sistema MMR no funciona correctamente se van acumulando errores en la secuencia de replicación del ADN en las células hijas. La mayoría de estos errores se producen en secuencias repetidas de uno o varios nucleótidos que se llaman microsatélites y son abundantes y están dispersos por todo el genoma. Debido a la deficiencia del sistema MMR y tras múltiples mitosis, los tumores pueden acumular varios miles de mutaciones a lo largo del genoma, a este fenómeno se le denomina inestabilidad de microsatélites (MSI)(41)

Entre el 15-25% de los cánceres de endometrio y el 10-20% de los cánceres colorrectales tienen inestabilidad de microsatélites. En el cáncer colorrectal los tumores que están causados por MSI tienen un mayor nivel de metilación en el ADN, normalmente son diploides o pseudodiploides, presentan mutación en BRAF pero o en KRAS y muestran baja frecuencia de mutaciones en los genes APC y TP53(1)

Entre un 80-90% de los tumores MSI son de tipo esporádico y se producen por inactivación somática bialélica de los genes MMR. Los mecanismos de inactivación más frecuentes son mutaciones puntuales, pérdida de heterocigosidad, grandes reordenamientos e hipermetilación de la región promotora de los genes.

Hay un 10-20% de los tumores MSI que son hereditarios y producen el síndrome de Lynch. En estos casos, los sujetos tienen una mutación patogénica en uno de los genes MMR. Esta mutación puede ser transmitida a su descendencia y la mayoría lo han heredado de sus progenitores, aunque se

han descrito casos de mutaciones de novo pero son poco frecuentes.

Los pacientes que tienen síndrome de Lynch, tienen un alelo no mutado (funcional) y otro mutado (no funcional) de uno de los genes del sistema MMR que están en todas las células del organismo. En un principio el alelo funcional tiene la capacidad de reparar los errores que se producen en la replicación, aunque estos sujetos tienen más riesgo de desarrollar tumores asociados a este síndrome. Pero para que esto ocurra debe producirse la inactivación del alelo a nivel somático.

Las consecuencias fisiopatológicas que tienen estas alteraciones depende del lugar donde se produzcan. Si los errores que no se corrigen se producen en regiones alejadas de secuencias codificantes lo más posible es que sea irrelevante. Pero si estas alteraciones afectan a regiones codificantes o reguladoras si pueden tener efecto inactivante de estos genes.

La acumulación de estas alteraciones que son normalmente inactivantes en genes reparadores de ADN o supresores de tumores tienen un potencial oncogénico importante. Se han descrito dianas de tumores MSI como: Factores de transcripción (TCF4), receptores de factores de crecimiento (TGFB2, IGFR2, ACTR2), proapoptóticos (BAX, CASP5, BCL10, FAS, APAF1), reguladores del ciclo celular (PTEN, PA2G4, RIZ), reparadores de DNA (MLH3, MSH3, MSH6), de respuesta a daño del DNA (BLM, CHK1, RAD50), etc. Los genes dianas más frecuentes que nos encontramos en el síndrome de Lynch son TGFB2, MSH6, TCF4 y BAX.(42).

Gen	Función	Microsatélite codificante	CCR (%)	CG (%)	CE (%)	SL (%)
TGFB2	Receptor del factor de crecimiento	[A <sub>10</sub> ]	81	69	12	76
IGFR2		[G <sub>8</sub> ]	17	21	13	7
ACTR2		[A <sub>8</sub> ]	58			
TCF4	Factor de transcripción	[A <sub>1</sub> ]	39	9	0	50
PTEN	Regulador del ciclo celular	[A <sub>6</sub> ]*2	19			
PA2G4		[A <sub>8</sub> ]	21			
RIZ		[A <sub>2</sub> ], [A <sub>7</sub> ]	27	45	33	37
BAX	Proapoptótico	[G <sub>8</sub> ]	45	37	33	49
CASP5		[A <sub>10</sub> ]	48	44	28	
BCL10		[A <sub>8</sub> ]	13	10		
FAS		[T <sub>2</sub> ]	10	10		
APAF1		[A <sub>8</sub> ]	13	15		
BLM	Respuesta a daño de DNA	[A <sub>1</sub> ]	9	25		
CHK1		[A <sub>1</sub> ]	10		28	
RAD50		[A <sub>1</sub> ]	28	28		
MLH3	Reparador de DNA	[A <sub>1</sub> ]	9			15
MSH3		[A <sub>8</sub> ]	38	39	25	51
MSH6		[C <sub>8</sub> ]	22	38	11	24
AXIN2	Vía de señalización Wnt	[A <sub>8</sub> ]*2, [G <sub>1</sub> ], [C <sub>1</sub> ]	24			

Alonso Sánchez M. et al. Cáncer Hereditario. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2019.

## Cribado molecular para la identificación de síndrome de Lynch

Estudiar el tejido tumoral da información rápida y fácil para seleccionar los casos para el diagnóstico genético. Como cribado en la sospecha de síndrome de Lynch se utiliza el diagnóstico de la deficiencia MMR en tejido tumoral. Esto se puede realizar mediante el estudio inmunohistoquímico de las proteínas MMT y MSI.

*Estudio inmunohistoquímico de las proteínas MMR (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2).*

Se trata de estudiar la presencia o ausencia de expresión proteica en los núcleos de las células tumorales. Se usan cortes histológicos y se realizan técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales contra las proteínas MMR. La sensibilidad y especificidad para la detección de déficit MMR por inmunohistoquímica son del 83% y 89% respectivamente. La falta de expresión de alguna de las proteínas reparadoras en las células tumorales es orientativa de deficiencia MMR. Los patrones que más se observan son pérdida de expresión MLH1-PMS2 y MSH2-MSH6 porque los anticuerpos reconocen proteínas en su conformación heterodimérica. Las pérdidas aisladas de las proteínas es poco frecuente pero da información igualmente. Una de las ventajas del estudio inmunohistoquímico es que nos orienta hacia el estudio genético posterior. Por ejemplo si se pierde MSH2-MSH6 podemos esperar encontrar la mutación en alguno de esos genes(1).

*Estudio de inestabilidad de microsatélites*

Se quiere ver si el sistema MMR funciona, para esto se estudia la longitud de los fragmentos de ADN que contienen microsatélites en ADN de tejido tumoral. Los tumores MSI tienen alteraciones en el patrón de estos marcadores, normalmente son deleciones, pero en algunos casos también nos encontramos inserciones. El estudio de inestabilidad de microsatélites tiene una especificidad del 90% y una sensibilidad del 85% en la detección de deficiencia del sistema MMR. Entre el 77-89% de los cáncer colorrectales de personas con síndrome de Lynch tienen MSI, mientras que el 10-15% de cáncer colorrectal esporádicos tienen este fenotipo(1).

El análisis de MSI se hace con PCR multiplex y estudio de fragmentos en electroforesis capilar. Los marcadores de microsatélites más usados son mononucleótidos repetidos, monomórficos o quasimonomórficos, que son de un tamaño de repetición semejante prácticamente en todas las poblaciones comunes de diferentes grupos étnicos. Estos son: BAT26, BAT25, NR21, NR24 y NR27. Cuando hay dos o más marcadores con patrón alterado se considera MSI. Si solo tiene un marcador alterado se aconseja estudiar otros marcadores alternativos.

No hay diferencias significativas entre los resultados de inmunohistoquímica y estudio de inestabilidad de microsatélites, pero hay ocasiones en los que una técnica puede resultar más útil. Por ejemplo, en tumores mucinosos es recomendable el estudio por inmunohistoquímica, ya que el estudio por MSI es subóptimo. Se recomienda el estudio con

MSI en familias que tengan gran cantidad de tumores asociados al síndrome de Lynch y la inmunohistoquímica sea normal ya que pueden presentar las proteínas pero que no sean funcionales(43).

*Metilación del promotor de MLH1.*

La metilación del promotor MLH1 en tejido tumoral es un marcador que nos sirve para filtrar mejor para un posterior diagnóstico genético del síndrome de Lynch. Esta metilación produce el bloqueo de la expresión génica de MLH1 y como consecuencia la pérdida de función.

## **Síndrome de la deficiencia constitutiva de la reparación de errores de apareamiento de nucleótidos (CMMRD)**

Las mutaciones heredadas monoalélicas en genes MMR son responsables del síndrome de Lynch. Personas con mutaciones bialélicas en unos de los genes MMR desarrollan tumores en la infancia. El CMMRD es una condición hereditaria autosómica, recesiva y poco frecuente. La mutación bialélica en línea germinal se puede producir como doble heterocigotos o en homocigosis. En el caso de la homocigosis se puede producir a causa de consanguinidad entre los progenitores.

El tipo de mutaciones en CMMRD es diferente al que se presenta en el síndrome de Lynch. La mayoría están implicados los genes PMS2 y MSH6 y las mutaciones bialélicas en MLH1 MSH2 son poco frecuentes(44).

Un paciente con CMMRD, sus progenitores son obligatoriamente portadores de una mutación en el mismo gen MMR, por lo que se podría pensar que hubiese una carga familiar de cáncer. Pero esto es poco frecuente, precisamente por la baja penetrancia de las mutaciones heterocigotas de los genes PMS2 y MSH6.

El diagnóstico genético es muy complicado debido al elevado número de variantes de significado clínico incierto en los genes MMR y la dificultad para estudiar el gen PMS2. Si bien una gran cantidad de mutaciones que vemos en el síndrome CMMRD son truncantes y por tanto con inactivación completa de la función del gen.

Se han desarrollado herramientas para ayudar al diagnóstico de este síndrome. Son estudios funcionales que utilizan linfoblastos inmortalizados del paciente y se evalúa la MSI y la tolerancia a la metilación. Si dan resultados positivos tienen una sensibilidad y especificidad del 100%(45)MSH2, MSH6, or PMS2.

El reconocimiento de las alteraciones patogénicas bialélicas en los genes MMR significa el diagnóstico genético definitivo. Si se encuentran variantes de significado desconocido, entonces los estudios funcionales permiten confirmar o no el diagnóstico de CMMRD.

## **Síndrome lynch-like**

En este síndrome se incluyen aquellos sujetos que tienen tumores del tipo síndrome de Lynch con deficiencia MMR, si una mutación patogénica en línea germinal y en ausen-

cia de metilación de MLH1. Es un grupo muy diverso. Las posibles causas dan lugar a este síndrome de Lynch-like se agrupan en dos apartados:

**Alteraciones (epi)genéticas somáticas bialelicas en genes MMR**

Son casos esporádicos donde la deficiencia MMR ocurre por la inactivación bialelica por alteraciones somáticas. Normalmente no tienen historia familiar de cáncer y así el riesgo de los familiares directos se considera el de la población general.

**Alteraciones genéticas en línea germinal**

Son casos que tienen predisposición hereditaria a cáncer y suelen tener historia familiar que lo insinúe.

**Cáncer colorrectal hereditario no polipósico sin inestabilidad de microsatélites**

El termino cáncer colorrectal familiar tipo X (FCCTX) denominado así porque no se conoce su etiología genética, ha sido propuesto para llamar a un conjunto de familias con alta agregación familiar de cáncer colorrectal hereditario no polipósico que tiene el sistema MMR intacto. Alrededor del 40% de las familias que cumplen los criterios de Amsterdam para el diagnóstico de cáncer colorrectal hereditario no polipósico no tienen anomalías en el sistema MMR. Por lo que no se pueden clasificar como síndrome de Lynch, ni derivados. Los datos que tenemos proponen que el cáncer colorrectal familiar tipo X es una entidad muy heterogénea desde un punto de vista genético.

La edad a la que se diagnostica el cáncer colorrectal es más tardía, se sitúa entre los 50-60 años, y tiene menor riesgo de producir tumores extracolónicos. Cuando se compara con el síndrome de Lynch, hay diferencias moleculares importantes. Los tumores FCCTX tienen como características: Ausencia de inestabilidad de microsatélites, ausencia de fenotipo metilador de islas CpG, presencia de inestabilidad cromosómica, hipometilación global del genoma y los telómeros son más largos.

Hasta el día de hoy no se han encontrado genes candidatos de FCCTX con la suficiente evidencia para poder incluirlo de rutina en el diagnóstico genético(1).

**ASPECTOS MOLECULARES DE LOS SÍNDROMES POLIPÓSICOS**

**Introducción**

En España cada año se diagnostican más de 34.000 casos de cáncer colorrectal y en más del 95% se desarrollan a partir de un pólipo adenomatoso, que es un descubrimiento común en las colonoscopias y la prevalencia aumenta con la edad y sobretodo en hombres. Los sujetos que tiene varios pólipos tienen un riesgo mayor para para desarrollar cáncer colorrectal y dentro de estos algunos pueden tener un síndrome hereditario de poliposis. Estos síndromes hereditarios son muy poco frecuentes y clínicamente como genéticamente son heterogéneos con unas características que en ocasiones se solapan con uno o más síndromes. Los pólipos gastrointestinales se clasifican en 4 grupos:

- Poliposis adenomatosa
- Poliposis hamartomatosas
- Poliposis serradas
- Poliposis mixtas

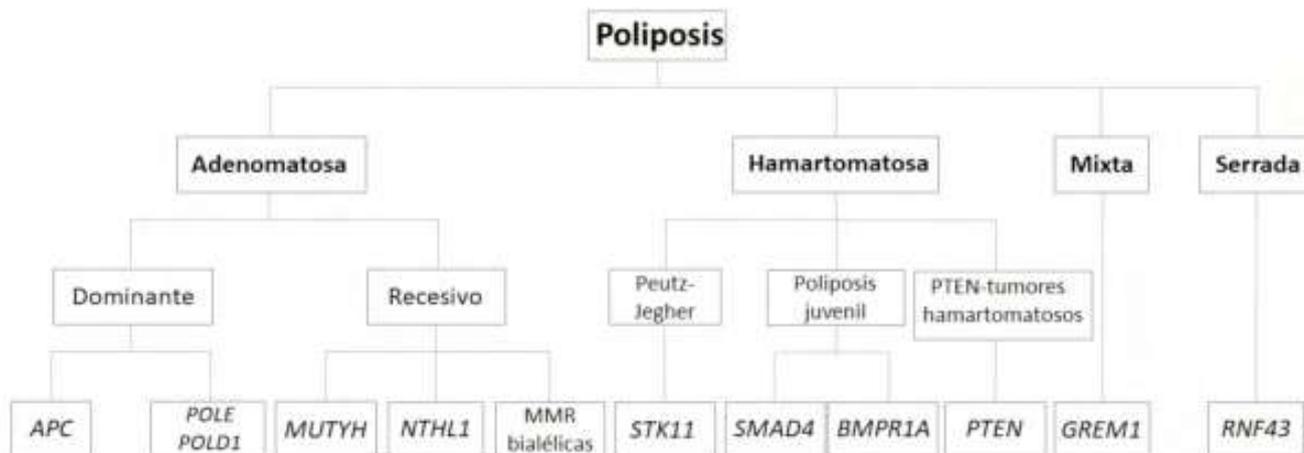
Los genes que producen estos síndromes pertenecen a diferentes familias y actúan en rutas moleculares distintas. Estas diferencias de rutas y genes hacen que el riesgo de evolucionar a cáncer so sea igual el cada uno.

**Poliposis adenomatosas**

**Poliposis adenomatosa familiar**

Después del síndrome de Lynch, la poliposis adenomatosa familiar (FAP) es el segundo síndrome con más frecuencia. Se da en el 1% de todos los cánceres colorrectales.

En la forma clásica de la enfermedad aparecen desde una edad temprana cientos de adenomas por todo el colon y el riesgo de sufrir cáncer colorrectal es del 100% si no se



(Valle L. Recent Discoveries in the Genetics of Familial Colorectal Cancer and polyposis. Clin Gastroenterol Hepatol 2017).

toman medidas de prevención como puede ser una colectomía. También hay una forma atenuada de la enfermedad en la que las manifestaciones clínicas son más leves, aparecen adenomas, pero en menor medida y los pólipos son más tardíos.

#### Gen APC y la ruta canónica Wnt/b-catenina.

Las primeras familias reconocidas que tenían poliposis adenomatosa familiar seguían un patrón de herencia autosómico dominante. A principios de los años 90 se encontró el locus de APC en el cromosoma 5 concretamente en el brazo largo en pacientes con poliposis adenomatosa y deleciones en la zona cromosómica 5q21, un tiempo después se asociaron mutaciones en el gen APC con desarrollo de poliposis adenomatosa familiar(46).

El gen APC tiene 21 exones de los cuales son codificantes 15, codifica una proteína de 2843 aminoácidos y es un gen supresor. La proteína APC tiene funciones importantes en la vía de señalización Wnt que actúa en procesos celulares como diferenciación neuronal, apoptosis, adhesión y migración celular(47)(48)most notably colorectal cancer (CRC).

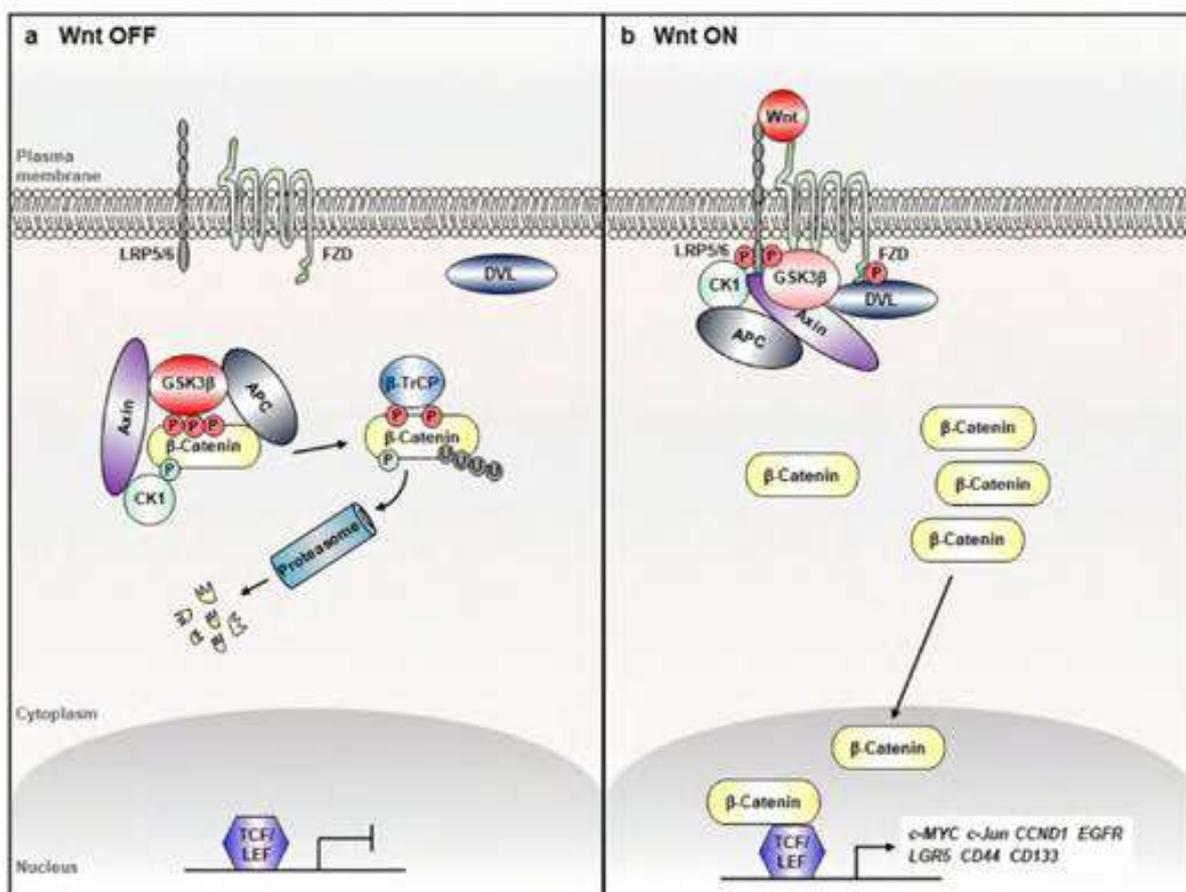
La ruta de señalización Wnt/b-catenina se ha conservado a lo largo de la evolución y realiza funciones fundamentales durante el desarrollo embrionario y a lo largo de la vida. Tiene 3 vías distintas, y la principal es la vía canónica, en la que APC ejerce un papel esencial.

APC unido a AXIN2 y GSK3- $\beta$  forma el "complejo de destrucción de la b-catenina" señalándola para su degradación por el proteosoma. Si APC está mutado, la b-catenina se aglomera en el citoplasma en exceso y esta pasa al núcleo. Una vez en el núcleo, la b-catenina crea un complejo con el TCF(factor de transcripción de las células T) o con LEF (lymphoid enhancer factor) que promueve la expresión de varios genes que están implicados en la proliferación y transformación(48)most notably colorectal cancer (CRC).

Las mutaciones en el gen APC aclaran un gran porcentaje de los casos de poliposis adenomatosa familiar, existiendo una desigualdad entre la forma clásica y la atenuada. Sin embargo, gracias a las nuevas tecnologías existe una mayor capacidad de detección y se ha visto que algunos casos de pacientes que se clasificaron como APC-negativos tienen mutaciones heterocigotas en APC, mutaciones en áreas intrónicas, alteraciones de las secuencias promotoras, reordenamiento genómico, mutaciones somáticas o mosaicismos. En más del 90% de las alteraciones en APC producen codones de parada que originan productos truncados y la mayoría estables(49).

#### Otras funciones de APC

El gen APC es un regulador negativo fundamental en la ruta canónica de señalización Wnt, que controla la proliferación y diferenciación celular. Pero cuando se produce una alteración se produce la desregulación de distintos



(Jeong WJ. Interaction between Wnt/b-catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of b-catenin and RAS by targeting the Wnt/ b-catenin pathway. NPJ Precis Oncol 2018).

procesos celulares como pérdida de adhesión celular, defectos del control del ciclo celular, daños en los mecanismos de reparación por escisión de bases y todo esto conlleva a mala segregación e inestabilidad cromosómica.

### **Variante de la poliposis adenomatosa familiar: Adenocarcinoma gástrico y poliposis proximal gástrica**

En 2016 se descubrió una entidad que tenía un patrón de herencia autosómica dominante de poliposis múltiple de las glándulas del estómago y una elevada predisposición al cáncer gástrico, pero no al colorrectal. Esto se vio en 6 familias en las que se identificaron tres mutaciones en el promotor 1B del gen APC que segregaban con la enfermedad(50).

### **Poliposis asociada a MUTYH**

La poliposis asociadas a MUTYH se producen por mutaciones bialelicas en el gen MUTYH, tiene un patrón de herencia autosómico recesivo y se caracteriza por un elevado riesgo de cáncer colorrectal debido a la existencia de pólipos adenomatosos, la edad de diagnóstico es aproximadamente 50 años y el número de pólipos suele ser inferior a 100. Además, existe un riesgo alto para desarrollar otros tipos de tumores como cáncer de vejiga u ovario.

El gen MUTYH es una parte importante de la ruta de reparación BER que repara el ADN de cadena sencilla. Esta ruta es esencial para que la célula mantenga su integridad genómica. La ruta localiza y corrige bases alteradas como resultado del daño oxidativo. La reparación se inicia con glicosilasas del ADN que reconocen y eliminan las bases dañadas o que no se ha añadido correctamente. MUTYH es una glicosilasa que corrige los emparejamientos anormales entre las guaninas y con las adeninas. Cuando falla el mecanismo se produce una acumulación de transversiones G:C>T:A.

Los pacientes con poliposis asociada a MUTYH presentan mutaciones missense como nonsense por la frecuencia de estas varían según los diferentes grupos étnicos. Por ejemplo en la población caucásica, el 80% del total de mutaciones la representa las variantes Y165C y G382D que reducen la función proteica(51).

### **Otros síndromes de Poliposis Adenomatosa**

#### *Poliposis asociadas a las Polimerasas Proofreading (PPAP)*

En pacientes que, con más de 10 adenomas, diagnosticados antes de los 60 años de edad y que se habían descartado otros genes de predisposición genética al cáncer colorrectal se identificaron por análisis de ligamento y secuenciación del genoma mutaciones germinales en las ADN polimerasas épsilon y delta.

En estas dos polimerasas, las mutaciones heterocigotas son altamente penetrantes y pueden elevar el riesgo para otros tumores.

#### *Poliposis adenomatosa asociada a NTHL1 (PAAN)*

NTHL1 es la otra glicosilasa del ADN de la ruta de reparación BER, y las mutaciones bialelicas le atribuye una elevada pre-

disposición para desarrollar adenomas y posteriormente cáncer colorrectal. La poliposis adenomatosa asociada a NTHL1 tiene un patrón de herencia recesivo.

NTHL1 tiene las más funciones que MUTYH ya que también tiene actividad endonucleasa. Las dianas de NTHL1 son las citosinas oxidadas que tienen tendencia a emparejarse de forma anómala con adeninas. Esto explica que los tumores relacionados con mutaciones NTHL1 muestren una elevación de transiciones C:G>T:A, y no de transversiones C:G>A:T que son típicas de los portadores de mutaciones en MUTYH(52).

### **Síndromes de poliposis hamartomatosa**

Los pólipos hamartomatosos están constituidos por células normales del tracto intestinal, pero muestra una arquitectura muy distorsionada. Son tumores que están formados por tejido conectivo, musculo liso, cubierto por mucosa y es específica del aérea donde se encuentra el pólipo. A diferencia con los adenomas se consideran lesiones que tienen un carácter benigno, no son neoplásicos. Sin embargo, los sujetos que padecen poliposis hamartomatosa tienen un riesgo elevado para desarrollar cáncer colorrectal. Estos síndromes son un conjunto heterogéneo que tienen un patrón de herencia autosómico dominante y los más representativos son el síndrome de PTEN-tumores hamartomatosos, la poliposis juvenil y por último el síndrome de Peutz-Jeghers.

### **Síndrome de PTEN-Tumores Hamartomatosos (PHTS)**

Incluye un grupo de entidades clínicas originadas por mutaciones germinales en el gen PTEN entre estas se hallan el síndrome de Cowden, Bannayan-Riley-Ruvalcaba, la enfermedad de Lhermitte-Duclos, el síndrome Proteus-like y trastornos del espectro autista asociados a macrocefalia. El síndrome de Cowden es inusual, muy complicado de reconocer, y multisistémico. Se caracteriza por la existencia de tumores benignos unido a la predisposición a desarrollar cáncer y fue descrito clínicamente hace más de 30 años. Mucho antes de identificar las mutaciones en el gen PTEN como causa.

El síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba es también es un síndrome raro que empieza a manifestarse al nacimiento y se caracteriza por macrocefalia, sobrecrecimiento, alteraciones vasculares, hamatomas, retraso psicomotor o lipomatosis(1).

El gen PTEN se encuentra en 10q22-23, tiene 9 exones que codifican una proteína de alrededor de 400 aminoácidos que tiene dos dominios. En dominio N-terminal que es responsable de la actividad fosfatasa y el C-terminal que posibilita la unión de PTEN a la membrana fosfolípida(53). La proteína PTEN está involucrada en diferentes rutas importantes, pero su papel más importante es en la ruta PI3K/ AKT/mTOR. Cuando esta mutado este gene se acumula fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato en la célula y esto hace que se active AKT que favorece el crecimiento celular y disminuye la apoptosis.

### Síndrome de Poliposis Juvenil

Este síndrome es de tiene un patrón de herencia autosómico dominante y su incidencia es muy baja un caso entre 100.000 personas y puede presentarse de forma esporádica o familiar. El diagnóstico normalmente se realiza al final de la etapa infantil y el comienzo de la adolescencia. Según la presentación clínica se puede clasificar en 3 grupos: poliposis juvenil de la infancia, poliposis juvenil colónica y poliposis juvenil generalizada(54).

Se asocia a mutaciones germinales heterocigotas en el gen SMAD4 que se encuentra en el cromosoma 18 y BMPR1A que se localiza en el cromosoma 10. Ambos genes son elementos de la ruta de señalización TGF- $\beta$ /Proteína Morfogénica del Hueso (BMP), que tiene una importante función en la regulación del crecimiento del epitelio del colon, además de modular diferentes procesos celulares como la proliferación, adhesión o diferenciación celular. SMAD4 es un mediador intracelular en la ruta TGF- $\beta$ . Por otro lado, BMPR1A es un receptor de superficie que cuando se une el ligando activa rutas de señalización para regular la transcripción de sus genes diana. Algunos autores han relacionado las mutaciones en SMAD4 con un fenotipo más agresivo, con más pólipos y que abarca tolo el tracto gastrointestinal(55).

### Síndrome de Peutz-Jeghers

El síndrome de Peutz-Jeghers presente manchas hiperpigmentadas mucocutáneas, poliposis hamartomatosa por todo el tracto intestinal, pero sobretodo en intestino delgado y un riesgo elevado para desarrollar diferentes tipos de tumores.

Los mecanismos moleculares son desconocidos, pero alrededor del 90% de los sujetos que cumplen los criterios diagnósticos de este síndrome, se identifica una mutación en el gen STK11 o también llamado LKB1 que se localiza en 19p13.3. Este gen tiene diez exones de los que son codificantes nueve y codifican una proteína con 433 aminoácidos.

SKT1 es una proteína que tiene multitud de funciones, regula un amplio número de procesos celulares como la apoptosis mediada por p53, señalización de la ruta Wnt, parada del ciclo celular o transformación celular inducida por RAS(1).

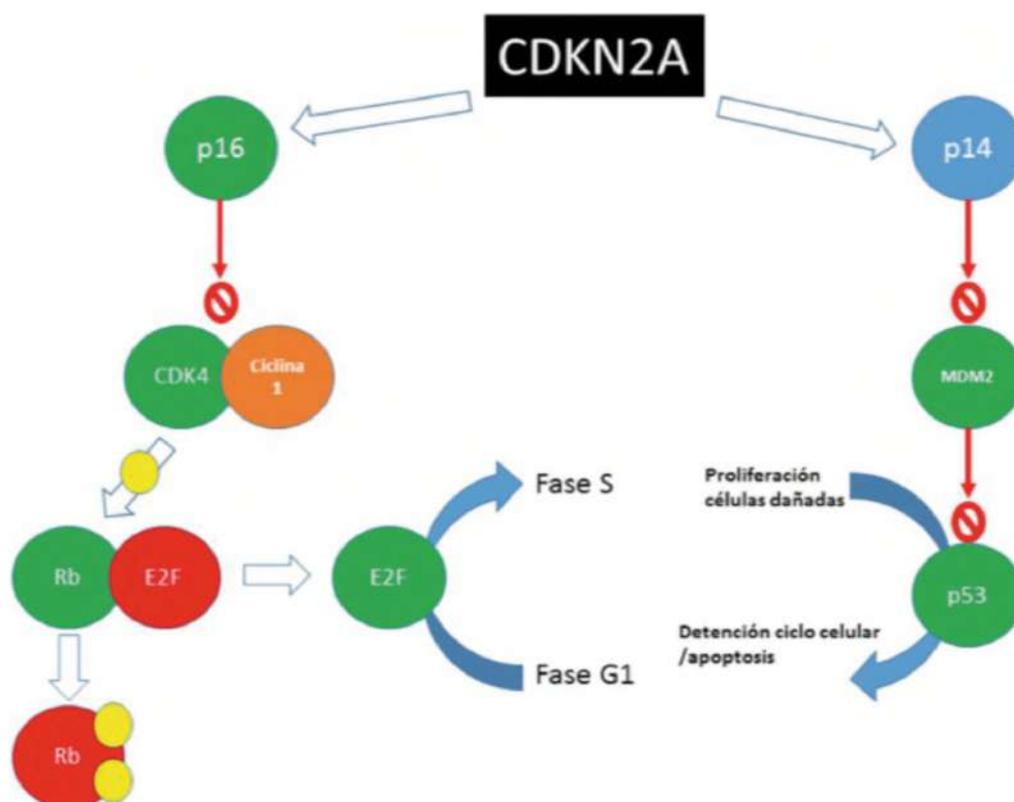
### Síndrome de poliposis serrada

Este síndrome se conocía antes como poliposis hiperplásica y es un síndrome en el que se identifica al menos cinco pólipos serrados en colon y recto y dos de ellos mayores a un centímetro, también tiene un mayor riesgo de cáncer colorrectal.

En este tipo de pólipos se ve el acumulo de cambios somático, que incluye la mutación en BRAF, y elevado grado de metilación regiones promotoras. Se han descrito mutaciones en RNF43 y este lo que hace es inhibir la señalización de Wnt.

### Síndrome de poliposis mixta

Este síndrome es muy poco frecuente, es autosómica dominante y se identifica por la presencia de varios tipos histológicos de pólipos como serrados, juveniles, adenoma



tubulares, vellosos y tubulovillosos, Peutz-Jeghers, hamartomas etc. De momentos no se hay criterios diagnósticos robustos pero lo que sí parece claro en estos pacientes es que muestra una elevada predisposición al cáncer colorrectal.

Las duplicaciones de GREM1 que se han descrito aumentan la expresión del gen, esta sobreexpresión conlleva la alteración de la ruta de la Proteína Morfogénica del Hueso y podría ser la responsable del desarrollo de los pólipos.

## MELANOMA FAMILIAR Y GENODERMATOSIS

### *Melanoma familiar*

#### Definición y epidemiología

El melanoma familiar se define cuando se producen en la misma familia dos o más casos emparentados de primer grado. En España se determinó que la frecuencia de melanoma familiar se sitúa en torno al 6% de todos los melanomas diagnosticados(56).

#### Genes de alta susceptibilidad: CDKN2A y CDK4; TERT; BAP1

Los primeros genes que se describieron para el melanoma familiar con el CDKN2A y CDK4, y son los responsables del 15-20% de los casos.

CDKN2A que se encuentra en 9p21 codifica dos proteínas distintas, p14 y p16 siendo esta última región la que se altera con más frecuencia. P16 participa en el control del ciclo celular mediante su interacción con el complejo ciclina 1/CDK4 inhibiendo así la fosforilación que este complejo hace de la proteína del retinoblastoma. Por lo que si hay una falta de acción en p16 se favorece la fosforilación de la proteína retinoblastoma por el complejo ciclina 1/CDK4 y se produce la activación de la transcripción.

Por otro lado, p14 estimula la activación de p53, evitando su ubiquitinización por MDM2, de tal forma que se produzca la apoptosis se ocasiona daño celular. Este mecanismo se pierde ante la falta de acción de p14(57).

Los portadores de las mutaciones de CDKN2A es variable, depende de la zona geográfica, siendo mas baja en Europa que en Estados Unidos o Australia. Se comporta con un patrón de herencia autosómica dominante.

Normalmente los pacientes que tienen melanoma familiar asociado a mutaciones en CDKN2A muestran melanomas a edades más jóvenes y con mayor frecuencia de múltiples melanomas.

Las mutaciones en CDK4 son más inusuales, y conllevan que la proteína CDK4 alterada impida la inhibición del complejo ciclina 1/CDK4 por parte de p16. También es autosómico dominante.

BAP1 es un gen ligado a la actividad de BRCA1. Está asociado a melanoma cutáneo y a una multitud de tumores, siendo el más importante el melanoma uveal, mesotelioma y carcinoma renal. BAP1 es una proteína que tiene función supresora de tumores mediante la interacción con múltiples proteínas que se encargan de la reparación del ADN. El gen BAP1 tiene

una alta penetrancia y se comporta de forma autosómica dominante(58).

#### Genes de susceptibilidad intermedia

El principal gen es el gen MC1R (receptor de la melanocortina tipo 1). Este gen produce el receptor de la hormona estimulante de la melanogénesis, así que juega un papel importante en las características y proporción de feomelanina y eumelanina. Una de las particularidades de este gen, es que sus variantes producen un mayor riesgo de melanoma y especialmente en mujeres, y además puede incrementar el riesgo de la mutación en CDKN2A(59).

#### Genodermatosis

La genodermatosis es un grupo de enfermedades que tienen origen genético y producen manifestaciones cutáneas y también en otros órganos. Son enfermedades hereditarias, aunque también se pueden presentar mutaciones de novo. Las lesiones de la piel son el rasgo principal en la mayoría de las genodermatosis pero no es el único. En el nacimiento no siempre se presenta las manifestaciones cutáneas, sino que pueden ir apareciendo a lo largo de la vida. Los principales síndromes hereditarios que tienen manifestaciones cutáneas son el síndrome de Gorlin, la Neurofibromatosis tipo 1, Xeroderma Pigmentoso o síndrome de Werner.

#### Síndrome de Gorlin

Gorlin y sus colaboradores en 1960 describieron un síndrome familiar que engloba múltiples carcinomas de células basales, quistes mandibulares y costillas bífidas. El patrón de herencia de este síndrome es autosómica dominante y tiene una incidencia de 1 por cada 50.000-150.000 nacidos. Este síndrome también se le conoce como carcinoma de células basales nevoide.

#### Características clínicas

El síndrome de Gorlin se caracteriza por el crecimiento de queratoquistes mandibulares múltiples, que con frecuencia empieza a partir de la segunda década de vida, y en la tercera década comienza los carcinomas de células basales. Este tipo de carcinomas se localizan normalmente en la cara, espalda y pecho. Los pits palmoplantares son otra manifestación cutánea característica y son atribuibles a la carencia parcial o total de la capa córnea(60).

El diagnóstico de este síndrome es fundamentalmente clínico, para los que hay que tener en cuenta los criterios de Kimonis en los que tiene que existir dos criterios mayores o uno mayor y dos menores.

#### Genética

En los mamíferos la vía Hedgehog participa en el desarrollo embrionario a nivel de tubo neural, pelo, esqueleto axial y sanación de heridas. En los adultos esta vía esta inactivada excepto en las stem cells, células cutáneas y folículo piloso. En estudios recientes también se ha visto la importancia de esta vía en la señalización de la tumorigénesis. Así una

hiperactivación de la vía Hedgehog se considera una anomalía que es precursora de todos los tipos de carcinomas de células basales y además esta vía está activa en otros tumores como el meduloblastoma.

El gen PTCH1 se encuentra en la zona 9q22.3 y produce el receptor sonic Hedgehog (SHH) que participa en la vía Hedgehog y sus mutaciones están presentes en el carcinoma de células basales esporádico y en el síndrome de Gorlin. También se han descrito mutaciones en el gen PTCH2 y SUFU(1).

### Xeroderma Pigmentoso

Es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por una mayor sensibilidad a luz solar y con el desarrollo de carcinomas en una edad temprana. Algunos sujetos también padecen síntomas neurológicos. Su incidencia varía según las zonas geográficas, por ejemplo, en Japón es 1-40.000 nacidos y en Estados Unidos 1-1.000.000.

#### Manifestaciones clínicas

Los primeros síntomas son sensibilidad elevada a luz solar en las primeras semanas de vida, esto ocurre en el 60% de los casos y en el 40% restante no se observan estas quemaduras, que comienzan a los 2 años de edad. Con frecuencia estos pacientes tienen fobia a la luz y sin protección sola la piel envejece volviéndose áspera, seca y atrófica. Otras manifestaciones son telangiectasia, maculas hipopigmentadas, queratosis de estuco y queratosis actínicas. Se calcula que los pacientes con Xeroderma Pigmentoso tienen 2.000 veces más posibilidades de padecer melanoma antes de los 20 años de edad y un riesgo aproximadamente de 50 veces mayor de sufrir otras neoplasias.

#### Genética

El Xeroderma Pigmentoso tiene una penetrancia del 100% y es el resultado de alguna mutación en cualquiera de estos genes XP-A a G. Estos están involucrados en la reparación

del ADN por NER (escisión de nucleótidos). El ADN absorbe la radiación e induce una reacción que produce dos fotoproductos, los dímeros de pirimidina y los dímeros de citosina y timina. En la reparación del ADN dañado por la luz UVB actúa NER. Es una enfermedad genéticamente heterogénea porque la gravedad de las manifestaciones clínicas depende del defecto de los genes que codifican las enzimas de reparación del ADN.

### Síndrome de Werner

También conocido como progeria del adulto se caracteriza por un precoz envejecimiento a la edad de 20-30 años. Se transmite por un patrón de herencia autosómico recesivo. La prevalencia se estima en 1/200.000, pero debido a las mutaciones fundadoras en la población japonesa y en Cerdeña es de 1/50.000.

#### Manifestaciones clínicas

Los sujetos que padecen síndrome de Werner no tienen alteraciones al nacer ni durante la infancia. Este síndrome comienza a presentarse entre los 20-30 años, los síntomas que aparecen antes son cataratas bilaterales, encanecimiento del pelo, adelgazamiento y cambios en la piel. Con frecuencia también se producen otros trastornos relacionados con la edad como osteoporosis, diabetes, aterosclerosis y neoplasias mesenquimales. Los pacientes con síndrome de Werner tienen un riesgo más elevado a desarrollar cáncer a lo largo de su vida, más en concreto sarcomas y melanomas(61).

#### Genética

La mutación en el gen WNR produce el síndrome de Werner. Este gen está localizado en 8p11-12 y codifica una de las cinco RecQ helicinas. Todas las mutaciones sin sentido, sustituciones, inserciones y deleciones en este gen, producen una inestabilidad genómica. Las mutaciones se en-

Gen	Localización	Vía de reparación	Función de la proteína	Características
XPA	9q22.33	NER	Reconocimiento del daño	25%
XPB/ERCC3	2q14.3	NER	Helicasa	Infrecuente
XPC	3p25.1	NER (GGR)	Reconocimiento del daño	25% No alteraciones neurológicas
XPD/ERCC2	19q13.32	NER	Helicasa	15%
XPE/DDB2	11p11.2	NER (GGR)	Reconocimiento del daño	Infrecuente No alteraciones neurológicas
XPF/ERCC4	16p13.12	NER	Nucleasa	6% No alteraciones neurológicas
XPG/ERCC5	13q33.1	NER	Nucleasa	6%
XPV/POLH	6p21.1	TLS	Polimerasa	21% No alteraciones neurológicas

El paciente NF1 debe tener al menos dos de los siguientes criterios	
1	Seis o más manchas café con leche (CAL), iguales o mayores de 0,5 cm de diámetro en prepúberes, y de 1,5 cm en pacientes postpúberes.
2	Dos o más neurofibromas de cualquier tipo, o uno plexiforme.
3	Presencia de pecas en las axilas y/o en las ingles.
4	Glioma de las vías ópticas.
5	Dos o más nódulos de Lisch (hamartomas del iris).
6	Una lesión ósea distintiva como displasia del esfenoides o adelgazamiento de la cortical del hueso largo, con o sin pseudoartrosis.
7	Un familiar de primer grado con NF1 según los criterios indicados.

Criterios diagnósticos de la neurofibromatosis tipo 1. Alonso Sánchez M. et al. *Cáncer Hereditario. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2019.*

cuentran en alrededor del 90% de los casos de síndrome de Werner diagnosticados clínicamente.

## NEUROFIBROMATOSIS Y SCHWANNOMATOSIS

### Introducción

Las Neurofibromatosis son un conjunto de enfermedades neurocutáneas que afectan normalmente a los tejidos que derivan de la cresta neural, aumenta el riesgo de sufrir tumores tanto benignos como malignos. Debido a la heterogeneidad del grupo se conocen tres entidades clínicas y genéticas diferentes:

- Neurofibromatosis tipo 1 también conocida enfermedad de von Recklinghausen o neurofibromatosis periférica. Esta enfermedad se produce por mutaciones en heterocigosis en el gen NF1.
- Neurofibromatosis tipo 2 también llamada neurofibromatosis central y está causada por mutaciones en heterocigosis en el gen NF2

A finales de los años 80, se publicaron diferentes estudios de ligamiento genético que demostraban que las dos neurofibromatosis estaban vinculadas a dos loci genéticos distintos. El gen la neurofibromatosis 1 se encontró en la región Centroamérica del cromosoma 17. De forma parecida, los estudios de ligamiento demostraron que el gen que se asocia con Bilateral acoustic neurofibromatosis se encuentra en el cromosoma 22 y es diferente al gen NF1(62).

Además, los análisis de los tumores que se asocian a la enfermedad evidenciaron la pérdida de ambos alelos del locus del cromosoma 22.

- La Schwannomatosis es la tercera neurofibromatosis. Se caracteriza por la aparición de múltiples schwannomas sin tumores vestibulares ni signos de neurofibromatosis.

También se han descrito otras formas atípicas que nos cumplen todos los criterios de las tres ya mencionadas como la neurofibromatosis espinal, síndrome NF1-Noonan o la NF1 segmentaria.

### La neurofibromatosis tipo 1

La neurofibromatosis tipo 1 (NF1) también es conocida como enfermedad de von Recklinghausen, es uno de los

trastornos genéticos más usuales, su prevalencia se calcula en 1/3000-35000 en todas las etnias. Es una enfermedad multisistémica que afecta especialmente a la piel y al sistema nervioso. La neurofibromatosis tipo 1 tiene un patrón de herencia autosómico dominante, por lo que el riesgo de transmitir la NF1 a su descendencia es de un 50%. La enfermedad se ocasiona cuando existen mutaciones en heterocigosis en el gen NF1. Aun siendo una enfermedad hereditaria, en más de un 50% de los casos se produce una mutación de novo, ya que el gen NF1 tiene una alta tasa de mutación, que se calcula que es 10 veces superior a la media. La neurofibromatosis tipo 1 es monogénica, solo las mutaciones en este gen NF1 produce la enfermedad, y la penetrancia es total, esto quiere decir que los individuos que tienen la mutación van a desarrollar la enfermedad a lo largo de su vida. La NF1 tiene una gran variabilidad clínica, por lo que no existen dos pacientes idénticos, si tan siquiera dentro de la misma familia.

Existen unos criterios diagnósticos muy sensibles y específicos, pero solo sirven para pacientes adultos. Por lo que una herramienta muy útil para el diagnóstico de pacientes infantiles es el diagnóstico genético, que nos permite identificar más del 95% de las mutaciones en el gen NF1(63).

### Manifestaciones clínicas

#### Manifestaciones cutáneas.

Las lesiones cutáneas son una manifestación clave para el diagnóstico, la más característica son unas manchas de color café con leche y las efélides. Las manchas café con leche se presenta en los primeros años de vida y van aumentando en tamaño y número hasta la adolescencia. Las efélides o pecas inguinales y axilares son pequeñas manchas que se encuentran en los pliegues y normalmente son visibles a los 3 años de edad. Otras manifestaciones pueden ser nevus anémico, prurito cutáneo, hiperpigmentación melánica difusa y el xantogranuloma juvenil(64).

#### Nódulos de Lisch

Los nódulos de Lisch son pequeños hamartomas melano-cíticos de un diámetro de 1-2 mm que se encuentran en el iris. Normalmente aparecen a los 3 años de edad y van aumentando progresivamente. Es nódulos nos lo encon-

tramos hasta en el 90% de los pacientes adultos y en un 70% en pacientes menores de 10 años(64).

### Neurofibromas

Los neurofibromas están formados principalmente por células de Schwann y aunque también pueden contener fibroblastos, mastocitos o células perineurales. Son tumores de carácter benigno de la vaina de los nervios y no malignizan. Estos van apareciendo antes de la adolescencia y van aumentando de tamaño y número(64).

### Glioma de vías ópticas.

La localización de estos tumores suele ser el nervio óptico, aunque se pueden desarrollar en cualquier zona de la vía óptica. Son lo más prevalentes en edad infantil. La gran mayoría son astrocitomas de muy bajo grado que se diagnostican antes de los 6 años. Los síntomas habituales son la disminución de agudeza visual y de la visión periférica, de la visión en colores, la proptosis o alteraciones endocrinas.

### Tumores malignos de la vaina del nervio periférico (MPNST)

Los pacientes con neurofibromatosis tipo 1 tienen un riesgo mayor de desarrollar tumores malignos de la vaina del nervio periférico durante su vida, normalmente a partir de una neurofibroma plexiforme. Se manifiestan como tumores de crecimiento rápido y doloroso y aparecen entre los 30-40 años(1).

### Manifestaciones esqueléticas

Las manifestaciones óseas más características de la NF1 son displasia de huesos largos, displasias vertebrales, displasia del esfenoideas y pseudoartrosis. Suelen aparecer en la infancia pero una minoría que no alcanza el 3.5% (64).

### Alteraciones cognitivas

El mayor problema evolutivo de los niños con NF1 son las alteraciones del aprendizaje y el fracaso escolar, estos afectan a más del 50% de los casos. Son muy variables en tipo e intensidad e interfieren en la calidad de vida de los niños. El TDAH es de las patologías más frecuentes, nos lo encontramos alrededor del 40-50% de los niños con NF1.

### Alteraciones vasculares

Las personas con NF1 pueden tener alteraciones cardiovasculares como defectos congénitos, vasculopatía o hipertensión arterial. Tras la patología tumoral, las vasculopatías son la segunda causa de muerte en sujetos que padece neurofibromatosis tipo 1. Los defectos cardíacos comprenden defectos de la pared ventricular, defectos valvulares y en la salida de las grandes venas(64).

### Genética

#### Patogénesis

La neurofibromatosis tipo 1 está causada por mutaciones en el gen NF1. El gen está localizado en el cromosoma 17 q11.2. El gen comprende 57 exones constitutivos y 3 exones de splicing alternativo. Este gen codifica una proteína llamada neurofibromina, que tiene alrededor de 2800 aminoácidos. En adultos se expresa de forma ubicua, pero su expresión es mayor en ciertos tipos celulares como neuronas, oligodendrocitos y células de Schwann.

Un dominio que tiene especial importancia es el GRD (GAP-related domain) que tiene semejanzas funcionales y estructurales con las proteínas activadoras de GTPs. Gracias al dominio GRD regula positivamente la actividad GTPasa de Ras, que favorece la forma inactiva. Por lo que mutaciones en el gen NF1 produce una disminución de



neurofibromina que a la vez se traduce en un incremento de la forma activa de Ras y esto altera varias cascadas de señalización que regulan distintos procesos celulares como la proliferación, diferenciación o supervivencia celular(65)(66).

### Mutaciones en el gen NF1 causantes de la enfermedad

#### *Espectro mutacional.*

En el gen NF1 no existen hotspots o puntos calientes de mutación, las mutaciones se localizan en cualquier región del gen. El espectro de mutaciones es muy amplio e implican diferentes alteraciones genéticas como microdeleciones del locus NF1, duplicaciones o deleciones de uno o varios exones, mutaciones nonsense, missense, frameshift o mutaciones de splicing.

#### *Caracterización de mutaciones en el gen NF1*

El análisis de este gen NF1 es complejo por diferentes razones:

- El gran tamaño del gen que tiene una secuencia codificante de 8.6Kbp y 60 exones
- La presencia de 12 pseudogenes que se encuentran en distintas regiones cromosómicas
- La ausencia de hotspot
- Amplio espectro mutacional

Hace que la identificación de mutaciones en este gen requieran del uso de técnicas de análisis complementarias para la identificación. También hay que tener en cuenta que aproximadamente el 27% de las mutaciones son de splicing.

#### *Correlación genotipo-fenotipo*

En el gen NF1 se han estudiado más de 2,000 mutaciones diferentes y no hay correlación entre una determinada mutación y el fenotipo. Los sujetos con una misma mutación pueden tener fenotipos muy diferentes, incluso dentro de una misma familia. Sin embargo, hay tres excepciones, una de ellas es la deleción (c.2970\_2972delAAT) en el exon 17 y se correlaciona con un fenotipo leve, otra de ellas es la son las microdeleciones tipo 1 (1,4Mb) y estas se relacionan con el fenotipo más grave, esto implica un riesgo mayor de manifestaciones como dimorfismo facial, retraso mental, defectos cardiacos o un elevado número de neurofibromas.

#### *Las formas segmentarias de la enfermedad y el mosaicismo*

La enfermedad en individuos esporádicos es decir si progenitores afectados puede estar causada por:

- Una mutación de novo, postcigotica que altera una fracción de células somáticas
- Una mutación de novo, precigotica que afecta a las células germinales.

Generalmente los casos de neurofibromatosis cutánea segmentaria está causado por las mutaciones postcigóticas.

Esta se produce después de la formación del cigoto y no todas las células del embrión tienen la mutación.

### **La neurofibromatosis tipo 2**

La neurofibromatosis tipo 2 es una enfermedad que tiene un patrón de herencia autosómica dominante que está originada por mutaciones en el gen NF2 y se caracteriza por el desarrollo de tumores intracraneales e intraespinales, tumores cutáneos y alteraciones oculares. La prevalencia para esta enfermedad se calcula que es 1-210.000 personas. Como ocurre en la NF1, más del 50% de los pacientes son esporádicos, sin que sus progenitores estén afectados, es decir aparece de novo. Los criterios diagnósticos son complicados debido a que esta enfermedad tiene una expresión clínica muy variable. Se postula que hay dos subtipos, la enfermedad de Gardner (forma leve) y enfermedad de Wishart (forma grave).

### **Manifestaciones clínicas**

#### *Schwannoma vestibular*

Es el tumor más común de las fosas craneales posteriores. Su incidencia es de 1-100.000 y afecta a personas de edad media y los síntomas aparecen alrededor de los 50 años. Pero cuando este tipo de tumor aparece antes de los 30 años es muy posible que la causa sea la neurofibromatosis tipo 2. Es un tumor encapsulado que está formado por células de Schwann que crece alrededor de la rama superior del brazo vestibular del octavo nervio craneal(67).

#### *Meningioma*

El meningioma se desarrolla alrededor del 50% de pacientes con neurofibromatosis tipo 2, y es el segundo tipo más frecuente en estos pacientes. Ocurren en la zona intracraneal e intrarraquidea.

#### *Otros tumores*

Los pacientes con NF2 también sufren otro tipo de tumores como los ependimomas, los gliomas o más raramente los astrocitomas.

#### *Alteraciones oftalmológicas*

Aproximadamente entre el 60-80% de los pacientes con neurofibromatosis tipo 2 tiene una disminución de la agudeza visual. Normalmente aparecen antes del inicio de los síntomas de schwannomas. La opacidad subcapsular posterior es el descubrimiento ocular más habitual y normalmente no evoluciona a catarata.

#### *Mono o polineuropatía*

Es una de las primeras manifestaciones de la neurofibromatosis tipo 2 y se suele presentar en la infancia. Se trata de una neuropatía vinculada a la posible compresión de las fibras nerviosas por microtumores o por el fallo en la función de las células de Schwann(67).

## Genética

### Patogénesis

La neurofibromatosis tipo 2 se produce por una alteración en el gen NF2, también denominado gen schwannomin (SCH) o gen merlina. Se encuentra en la región central del brazo largo del cromosoma 22.

La proteína NF2 se encuentra en la membrana plasmática, regiones ricas de filamentos de actina y microvellosidades, es decir en las áreas que se relacionan con la adhesión y motilidad celular. Hay estudios que demuestran que la proteína NF2 concretamente la isoforma I regula la adhesión y la proliferación celular. La fosforilación mediante proteína quinasa A de la isoforma tipo I produce un cambio pasando de la forma activa a la inactiva.

La falta de proteína por la inactivación de los alelos NF2 induce la proliferación y motilidad celular.

### Espectro mutacional

El espectro de mutaciones es muy amplio, en el que incluyen mutaciones nonsense, missense, deleciones de distintos tamaños o mutaciones que alteran el procesamiento del ARNm.

No hay puntos calientes o Hotspot en el gen NF2. Cuando se combina diferentes técnicas de análisis genético se consigue una alta tasa de detección de mutaciones en los casos familiares. Pero en los casos esporádicos se reduce notablemente la tasa de detección, esto puede ser la existencia de mosaicismo. Se calcula que el mosaicismo afecta el 30% de los casos, aunque puede ser superior.

### Correlación genotipo- fenotipo

Existen varios trabajos que indican que los pacientes con mutaciones missense muestran formas más leves de la enfermedad que los pacientes con mutaciones que alteran el ARNm o mutaciones truncantes. El 60% de los pacientes que presentan síntomas antes de los 20 años tienen una mutación truncante, los que tienen una mutación que altera el procesamiento del ARNm desciende al 36% y los que tienen una mutación missense disminuye hasta el 27%.

### La Schwannomatosis

También es denominada neurilemomatosis, o NF3 fue descrita en 1996 por MacCollin como una entidad clínica distinta a la NF1 y NF2. Es un trastorno de origen genético y la mayoría de casos son esporádicos, solamente entre 15-25% heredan la enfermedad de sus progenitores. No se conocen datos de la prevalencia aunque pueden ser parecidos a la NF2(68).

### Manifestaciones clínicas

La característica principal es la predisposición al desarrollo de schwannomas y con menos frecuencia meningiomas. Los tumores suelen aparecer entre los 20-40 años de edad. El dolor es otro signo característico de la enfermedad.

Los schwannomas se manifiestan normalmente en los nervios periféricos y espinales. La afectación de los nervios craneales es infrecuente. Los meningiomas se desarrollan en el 5% de los pacientes y solo en la forma de la enfermedad asociada al gen SMARCB1(69).

## Genética molecular

### Patogénesis

En 2007 se demostró en un grupo de familias con schwannomatosis que el gen responsable de la enfermedad no era NF2 como se pensaba, sino que el gen que tenía la mutación era SMARCB1. En estudios posteriores se ha visto que este gen se encuentra aproximadamente en un 40-50% de los casos familiares y en un 8-10% de los esporádicos. También se ha visto que mutaciones en heterocigosis en el gen LZTR1 producen NF3. Este gen está alterado alrededor del 30% de los casos esporádicos y en un 30-35% de los casos familiares.

El gen SMARCB1 codifica para una subunidad del complejo SWI/SNF que está implicado en la regulación de la expresión génica. Este gen también se relaciona con otras patologías como el síndrome de Coffin-Siris y el síndrome de predisposición al tumor rabdoide.

El gen LZTR1 codifica para una proteína de la superfamilia BTB/POZ que regulan distintos procesos celulares. Esta proteína se localiza solo en el aparato de Golgi(70).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso Sánchez M. et al. Cáncer Hereditario. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2019.
2. García R, Ayala PA, Perdomo SP. Epigenética: Definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. Rev Ciencias la Salud. 2012;10(1).
3. Tume-Farfán LF. Las alteraciones epigenéticas en la progresión del cáncer. Gac Mex Oncol. 2014;13(4).
4. Chen Z, Wang L, Wang Q, Li W. Histone modifications and chromatin organization in prostate cancer. Vol. 2, Epigenomics. 2010.
5. Trovero M, Geisinger A. Los ARNs no codificantes largos y su vinculación con las patologías testiculares. An Fac Med (Univ Repúb Urug, En línea). 2019;6(1):12-47.
6. Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-cañete FJS, Raya P, et al. Рёберно-Отказоустойчивые Расширения 8-, 9- И 10-Вершинных Графов. Int J Open Inf Technol. 2020;8(8):119-31.
7. Lichtenstein P, Holm N V., Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. N Engl J Med [Internet]. 2000 Jul 13 [cited 2021 Mar 12];343(2):78-85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10891514/>

8. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes [Internet]. Vol. 23, *Oncogene*. Oncogene; 2004 [cited 2021 Mar 12]. p. 6445–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15322516/>
9. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer [Internet]. Vol. 9, *Trends in Genetics*. Trends Genet; 1993 [cited 2021 Mar 13]. p. 138–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8516849/>
10. Ngeow J, Eng C. Precision medicine in heritable cancer: When somatic tumour testing and germline mutations meet [Internet]. Vol. 1, *npj Genomic Medicine*. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2021 Mar 13]. p. 1–3. Available from: [www.nature.com/npjgenmed](http://www.nature.com/npjgenmed)
11. Okur V, Chung WK. The impact of hereditary cancer gene panels on clinical care and lessons learned [Internet]. Vol. 3, *Cold Spring Harbor molecular case studies*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017 [cited 2021 Mar 15]. Available from: [/pmc/articles/PMC5701305/](https://pmc/articles/PMC5701305/)
12. Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian SV, Nathanson KL, et al. Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jun 4 [cited 2021 Mar 15];372(23):2243–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26014596/>
13. Desmond A, Kurian AW, Gabree M, Mills MA, Anderson MJ, Kobayashi Y, et al. Clinical actionability of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer risk assessment. *JAMA Oncol* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Mar 15];1(7):943–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26270727/>
14. Shieh Y, Eklund M, Madlensky L, Sawyer SD, Thompson CK, Stover Fiscalini A, et al. Breast Cancer Screening in the Precision Medicine Era: Risk-Based Screening in a Population-Based Trial [Internet]. Vol. 109, *Journal of the National Cancer Institute*. Oxford University Press; 2017 [cited 2021 Mar 16]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28130475/>
15. J. Farfán BM. BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2015 Nov 1;26(6):788–93.
16. De F, Biológicas C, Solla LP, María J, De La R, Cascajares C, et al. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID HUMANOS ANTIGUOS Y MUESTRAS FORENSES CRÍTICAS: VALORACIÓN DE ESTRATÉGIAS Y RESULTADOS MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR Bajo la dirección de los doctores. 2002.
17. Sandoval Pineda JF, Ochoa Corona F, Torres Rojas E. Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp. *Rev Colomb Biotecnol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Mar 16];19(1):42–52. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/57114>
18. Taq polimerasa: De los geiseres a la ciencia.
19. PCR: reacción en cadena de la polimerasa - PDF Descargar libre [Internet]. [cited 2021 Mar 18]. Available from: <https://docplayer.es/50622255-Pcr-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa.html>
20. De A, Presencia LA, Organismos DE, Modificados G, Muestras EN, Alimentos DE, et al. WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL OFFICE FOR EUROPE WELTGESUNDHEITSORGANISATION REGIONALBÜRO FÜR EUROPA ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE BUREAU REGIONAL DE L'EUROPE ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD OFICINA REGIONAL PARA EUROPA CURSO DE FORMACIÓN SOBRE MANUAL DEL PARTICIPANTE [Internet]. [cited 2021 Mar 18]. Available from: <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/documentation.htm>
21. de Dios TL. Tecnología en salud [Internet]. Vol. 2. 2013 [cited 2021 Mar 18]. Available from: [www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx)
22. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Jul 22 [cited 2021 Mar 18];100(15):8817–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12857956/>
23. Hernández M, Quijada NM, Rodríguez-Lázaro D, Eiros JM. Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Rev Argent Microbiol*. 2020 Apr 1;52(2):150–61.
24. Jauk F. Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones Next-Generation Sequencing (NGS): basic concepts and applications.
25. Análisis de grandes deleciones/duplicaciones mediante MLPA UNA VISIÓN 360° DE LA MEDICINA GENÓMICA.
26. Mori MDLÁ, Mansilla E, García-Santiago F, Vallespín E, Palomares M, Martín R, et al. Prenatal diagnosis and comparative genomic hybridization (CGH) -array (I). High risk pregnancies [Internet]. Vol. 23, *Diagnostico Prenatal*. Elsevier Doyma; 2012 [cited 2021 Mar 19]. p. 34–48. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-diagnostico-prenatal-327-articulo-diagnostico-prenatal-array-hibridacion-genomica-comparada-S2173412712000339>
27. Repáraz Andrade A. GENÉTICA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS APLICABILIDAD CLÍNICA DE LOS MICROARRAYS CROMOSÓMICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL CASO CLÍNICO. 2014.
28. Clínica G. Consenso para la Implementación de los Arrays [CGH y SNP-arrays] en la [Internet]. 2012 [cited 2021 Mar 19]. Available from: [www.instituto-roche.es](http://www.instituto-roche.es)
29. Ortiz-Genga MF, Ochoa JP, Monserrat L, Martín D, Ortiz-Genga F. Aportes de la genética al estudio y manejo clínico de las miocardiopatías. *Rev Uruguaya Cardiol* [Internet]. 2018 Nov 11 [cited 2021 Mar 21];33(3):314–57.

- Available from: [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-04202018000300314&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-04202018000300314&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
30. Moles-Fernández A, Duran-Lozano L, Montalban G, Bonache S, López-Perolio I, Menéndez M, et al. Computational tools for splicing defect prediction in breast/ovarian cancer genes: How efficient are they at predicting RNA alterations? *Front Genet* [Internet]. 2018 Sep 5 [cited 2021 Mar 21];9(SEP). Available from: [/pmc/articles/PMC6134256/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6134256/)
  31. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1994 Nov 2 [cited 2021 Mar 21];86(21):1600–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7932824/>
  32. Takaoka M, Miki Y. BRCA1 gene: function and deficiency [Internet]. Vol. 23, *International Journal of Clinical Oncology*. Springer Tokyo; 2018 [cited 2021 Mar 24]. p. 36–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28884397/>
  33. Pfeffer CM, Ho BN, Singh ATK. The evolution, functions and applications of the breast cancer genes BRCA1 and BRCA2 [Internet]. Vol. 14, *Cancer Genomics and Proteomics*. International Institute of Anticancer Research; 2017 [cited 2021 Mar 24]. p. 293–8. Available from: [/pmc/articles/PMC5611516/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5611516/)
  34. Economopoulou P, Dimitriadis G, Psyrris A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes [Internet]. Vol. 41, *Cancer Treatment Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2015 [cited 2021 Mar 31]. p. 1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25467110/>
  35. Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2021 Apr 1];97(11):813–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15928302/>
  36. Golmard L, Castéra L, Krieger S, Moncoutier V, Abidallah K, Tenreiro H, et al. Contribution of germline deleterious variants in the RAD51 paralogs to breast and ovarian cancers /631/208/68 /631/67/1347 article. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Apr 1];25(12):1345–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29255180/>
  37. Norquist BM, Harrell MI, Brady MF, Walsh T, Lee MK, Gulsuner S, et al. Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. *JAMA Oncol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 Apr 2];2(4):482–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26720728/>
  38. Síndrome de Lynch: aspectos genéticos, clínicos y diagnósticos [Internet]. [cited 2021 Apr 3]. Available from: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-51292018000300008](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292018000300008)
  39. Lynch Syndrome - PubMed [Internet]. [cited 2021 Apr 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20301390/>
  40. Liu D, Keijzers G, Rasmussen LJ. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells [Internet]. Vol. 773, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. Elsevier B.V.; 2017 [cited 2021 Apr 3]. p. 174–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28927527/>
  41. Stoffel EM, Yurgelun MB, Richard Boland C. Lynch syndrome. In: *Hereditary Colorectal Cancer: Genetic Basis and Clinical Implications* [Internet]. Springer International Publishing; 2018 [cited 2021 Apr 4]. p. 3–19. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-74259-5\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-74259-5_1)
  42. Duval A, Reperant M, Hamelin R. Comparative analysis of mutation frequency of coding and non coding short mononucleotide repeats in mismatch repair deficient colorectal cancers. *Oncogene*. 2002;21(52):8062–6.
  43. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of lynch syndrome: A consensus statement by the us multi-society task force on colorectal cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2014 [cited 2021 Apr 5];147(2):502–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25043945/>
  44. Bakry D, Aronson M, Durno C, Rimawi H, Farah R, Alharbi QK, et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* [Internet]. 2014 [cited 2021 Apr 5];50(5):987–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24440087/>
  45. Bodo S, Colas C, Buhard O, Collura A, Tinat J, Lavoine N, et al. Diagnosis of Constitutional Mismatch Repair-Deficiency Syndrome Based on Microsatellite Instability and Lymphocyte Tolerance to Methylating Agents. *Gastroenterology* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Apr 5];149(4):1017–1029.e3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26116798/>
  46. Hankey W, Frankel WL, Groden J. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting [Internet]. Vol. 37, *Cancer and Metastasis Reviews*. Springer New York LLC; 2018 [cited 2021 Apr 7]. p. 159–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29318445/>
  47. Zhang L, Shay JW. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer [Internet]. Vol. 109, *Journal of the National Cancer Institute*. Oxford University Press; 2017 [cited 2021 Apr 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28423402/>
  48. Jeong W-J, Ro EJ, Choi K-Y. Interaction between Wnt/β-catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of β-catenin and RAS by targeting the Wnt/β-catenin pathway. *npj Precis Oncol* [Internet]. 2018 Dec [cited 2021 Apr 7];2(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29872723/>

49. Talseth-Palmer BA. The genetic basis of colonic adenomatous polyposis syndromes [Internet]. Vol. 15, Hereditary Cancer in Clinical Practice. BioMed Central Ltd.; 2017 [cited 2021 Apr 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28331556/>
50. Li J, Woods SL, Healey S, Beesley J, Chen X, Lee JS, et al. Point Mutations in Exon 1B of APC Reveal Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach as a Familial Adenomatous Polyposis Variant. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016 May 5 [cited 2021 Apr 8];98(5):830–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27087319/>
51. Win AK, Reece JC, Dowty JG, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, et al. Risk of extracolonic cancers for people with biallelic and monoallelic mutations in MUTYH. *Int J Cancer* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Apr 8];139(7):1557–63. Available from: [/pmc/articles/PMC5094810/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27087319/)
52. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* [Internet]. 2002 [cited 2021 Apr 8];30(2):227–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11818965/>
53. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer [Internet]. Vol. 4, Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. Annu Rev Pathol; 2009 [cited 2021 Apr 8]. p. 127–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18767981/>
54. Palacios MG, Bautista Casasnovas AL. Síndromes de poliposis intestinales. *An Pediatr Contin* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2021 Apr 9];12(4):183–90. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-anales-pediatria-continuada-51-articulo-sindromes-poliposis-intestinales-S1696281814701891>
55. Ma H, Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM, de Leng WWJ, Montgomery EA. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer [Internet]. Vol. 50, Pathology. Elsevier B.V.; 2018 [cited 2021 Apr 9]. p. 49–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29169633/>
56. 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* [Internet]. 1999 [cited 2021 Apr 11];17(10):3245–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10506626/>
57. Potrony M, Badenas C, Aguilera P, Puig-Butille JA, Carreira C, Malveyh J, et al. Update in genetic susceptibility in melanoma [Internet]. Vol. 3, Annals of Translational Medicine. AME Publishing Company; 2015 [cited 2021 Apr 11]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26488006/>
58. Masoomian B, Shields JA, Shields CL. Overview of BAP1 cancer predisposition syndrome and the relationship to uveal melanoma [Internet]. Vol. 30, Journal of Current Ophthalmology. Iranian Society of Ophthalmology; 2018 [cited 2021 Apr 11]. p. 102–9. Available from: [/pmc/articles/PMC6034168/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
59. Wendt J, Mueller C, Rauscher S, Fae I, Fischer G, Okamoto I. Contributions by MC1R variants to melanoma risk in males and females. *JAMA Dermatology* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2021 Apr 11];154(7):789–95. Available from: [/pmc/articles/PMC6128491/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30111111/)
60. Saxena S, Sundaragiri KS, Bhargava A, Sankhla B. Studying the multiple faces of nevoid basal-cell carcinoma syndrome: A case series. *J Oral Maxillofac Pathol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Apr 12];24(2):315–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33456241>
61. Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria) - PubMed [Internet]. [cited 2021 Apr 15]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8722214/>
62. Rouleau GA, Wertelecki W, Haines JL, Hobbs WJ, Trofatter JA, Seizinger BR, et al. Genetic linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* [Internet]. 1987 [cited 2021 Apr 15];329(6136):246–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2888021/>
63. Valero MC, Martín Y, Hernández-Imaz E, Hernández AM, Meleán G, Valero AM, et al. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2011 [cited 2021 Apr 17];13(2):113–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21354044/>
64. Pascual-castroviejo I. Neurofibromatosis. Fundación. Madrid; 2001.
65. Cawthon RM, Weiss R, Xu G, Viskochil D, Culver M, Stevens J, et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* [Internet]. 1990 Jul 13 [cited 2021 Apr 18];62(1):193–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2114220/>
66. Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, et al. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* [Internet]. 1990 Nov 16 [cited 2021 Apr 18];63(4):851–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2121371/>
67. Hulsebos TJM, Plomp AS, Wolterman RA, Robanus-Maandag EC, Baas F, Wesseling P. Germline mutation of INI1/SMARCB1 in familial schwannomatosis. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2007 [cited 2021 Apr 23];80(4):805–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17357086/>
68. MacCollin M, Woodfin W, Kronn D, Short MP. Schwannomatosis: A clinical and pathologic study. *Neurology* [Internet]. 1996 [cited 2021 Apr 23];46(4):1072–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8780094/>

69. MacCollin M, Chiocca EA, Evans DG, Friedman JM, Horvitz R, Jaramillo D, et al. Diagnostic criteria for schwannomatosis [Internet]. Vol. 64, Neurology. Neurology; 2005 [cited 2021 Apr 23]. p. 1838–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15955931/>
70. Piotrowski A, Xie J, Liu YF, Poplawski AB, Gomes AR, Madanecki P, et al. Germline loss-of-function mutations in LZTR1 predispose to an inherited disorder of multiple schwannomas. Nat Genet [Internet]. 2014 [cited 2021 Apr 23];46(2):182–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24362817/>

