

Trinidad Caldés

Unidad de Oncología Molecular. Hospital Clínico San Carlos de Madrid

## Resumen

El estudio de los genes de susceptibilidad BRCA1/BRCA2 y hMLH1/hMSH2/hMSH6 relacionados con el cáncer hereditario, permite seleccionar aquellos individuos que se van a beneficiar de las medidas de prevención en las enfermedades oncológicas altamente prevalentes. Debido a la alta complejidad genética y de manejo clínico de los cánceres hereditarios, los individuos con un riesgo alto, deberían ser vistos y seguidos en Unidades de Consejo Genético o en Clínicas de Cáncer Familiar. Estas Unidades o Clínicas deben ser multidisciplinarias es decir integradas por diversos especialistas (Médicos Oncólogos, Farmacéuticos y Biólogos Moleculares, Enfermeras y Psicólogos) todos ellos con formación en genética molecular, consejo genético y manejo del cáncer hereditario. Es en estas consultas, donde se debe calcular el riesgo que tiene la familia de ser portador de una mutación en BRCA1/BRCA2; hMLH1/hMSH2/hMSH6. Los resultados deben ser comunicados a la familia entendiendo el significado de lo que se les dice y dedicando el tiempo necesario para que ellos puedan asimilar toda la información que se les está dando. Todas las clínicas donde se lleven a cabo programas de estudios de mutaciones en los genes implicados en el cáncer hereditario (BRCA1/BRCA2, hMLH1/hMSH2/hMSH6), deben establecer consultas pre- y post-test. De esta forma se llevará a cabo un buen consejo genético.

**Palabras clave:** Consejo genético, test genético, cáncer hereditario, mutaciones genéticas, BRCA1/BRCA2, hMLH1/hMSH2/hMSH6.

## Abstract

Genetic counseling plays a key role in the BRCA1/BRCA2 and hMLH1/hMSH2/hMSH6 testing process. The initial genetic counseling encounter will determine the appropriateness of the test by collecting a detailed family history and determining the likelihood that the family has a BRCA1/BRCA2, hMLH1/hMSH2/hMSH6 mutation. Once the test is offered, then genetic counseling discussions center around the possible test results, implications of the patient and other relatives, and risk and benefits of testing. The goal of this pre-test genetic counseling session is to ensure that patients have sufficient information with which to make a decision about being tested. At results disclosure, individuals can learn their results along with information about cancer risks and medical management options. Follow-up genetic counseling services can provide continued support and help arrange consultations with other medical care providers as needed. All clinical BRCA1/BRCA2; hMLH1/hMSH2/hMSH6 testing genetic programs should include pre- and post-test genetic counseling.

**Key words:** Genetic counseling, gene testing hereditary cancer, gene mutation, BRCA1/BRCA2, hMLH1/hMSH2/hMSH6.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer o desarrollo tumoral se caracteriza por un crecimiento excesivo y descontrolado de un grupo de células que invaden y dañan tejidos y órganos. Es una de las

causas más frecuentes de mortalidad ocupando un segundo puesto en los países desarrollados detrás de las enfermedades cardiovasculares o coronarias. La incidencia del cáncer ha aumentado en las últimas décadas. En relación con el cáncer de mama, la incidencia en Europa es de alrededor de 135.000 casos nuevos y en Estados Unidos de 184.000<sup>(1)</sup>. Estas cifras nos indican que 1 de cada 12 mujeres tendrá cáncer de mama. El cáncer de colon es la

### Correspondencia:

Trinidad Caldés  
Unidad de Oncología Molecular. Hospital Clínico San Carlos.  
Martín Lagos s/n - 28040 Madrid  
E-mail: tcaldes.hcsc@salud.madrid.org

enfermedad maligna de mayor incidencia en la población si tenemos en cuenta a hombres y mujeres. La predisposición familiar al cáncer ha sido un hecho reconocido durante muchos años. El descubrimiento de algunos de los genes implicados en la herencia de algunas enfermedades malignas, como en el cáncer de mama/ovario y en el cáncer colorrectal, ha representado un gran avance y un reto en la prevención del cáncer. En ambas patologías se han estudiado muchos factores de riesgo, y se han desarrollado modelos para ayudar a cuantificar el riesgo de cada individuo a padecer un cáncer. Estos modelos están basados en la historia personal y familiar de cáncer, siendo la historia familiar el factor más importante de riesgo a padecer cáncer.

El estudio de los genes de susceptibilidad relacionados con el cáncer hereditario, permite seleccionar aquellos individuos que se van a beneficiar de las medidas de prevención en las enfermedades oncológicas altamente prevalentes. La alteración germinal de estos genes, necesita que se produzca un segundo acontecimiento para el desarrollo de los tumores. Los mecanismos epigenéticos, son factores que modulan la penetrancia de la enfermedad genética y tienen un papel importante en la predisposición del cáncer hereditario. Debido a la alta complejidad genética y de manejo clínico de los cánceres hereditarios, los individuos con un riesgo alto, deberían ser vistos y seguidos en Unidades de Consejo Genético o en Clínicas de Cáncer Familiar. Estas Unidades o Clínicas deben ser multidisciplinarias es decir integradas por diversos especialistas (Médicos Oncólogos, Farmacéuticos y Biólogos Moleculares, Enfermeras y Psicólogos) todos ellos con formación en genética molecular, consejo genético y manejo del cáncer hereditario, ya que el consejo genético del cáncer es un proceso de comunicación en el cuál se discuten con los individuos y las familias, los factores médicos, estudios genéticos y psicosociales relacionados por un lado con el riesgo de desarrollar un cáncer y por otro con las medidas de prevención. En el con-

sejo genético, no se debe producir ningún tipo de sesgo, la autonomía de los individuos debe ser respetada y protegida, debe existir una colaboración entre los consejeros genéticos y los pacientes y debe incluirse la aceptación del estudio mediante el acuerdo por parte de los pacientes de firmar un consentimiento informado. En el consentimiento informado deben constar factores como el riesgo, tipo de test para el estudio genético, exactitud y limitaciones del test, interpretación de los resultados, implicaciones del resultado para el individuo y la familia, confidencialidad, riesgo de estrés psicológico y las medidas preventivas y de seguimiento después del resultado del estudio si es procedente. Por último deben tenerse en cuenta factores éticos y legales que puedan surgir en el proceso, ya que hay muchas preguntas en este campo que todavía hoy no tienen respuesta. A pesar de todo lo expuesto, los beneficios obtenidos en estos estudios superan las dificultades por lo tanto están claramente indicados.

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

### **Antecedentes históricos**

En el año 1971 Lynch et al<sup>(2)</sup>, publicaron un estudio de asociación familiar de cáncer de mama debida a una susceptibilidad transmitida genéticamente. Posteriormente este hecho fue sostenido por estudios epidemiológicos publicados por Anderson et al<sup>(3)</sup> en 1974 en el que demostraban que el riesgo de cáncer de mama se incrementaba en familiares femeninos de pacientes con la enfermedad. Estudios de segregación llevados a cabo por Claus et al<sup>(4)</sup> indicaron que la susceptibilidad era debida a la existencia de uno o más genes autosómicos dominantes y altamente penetrantes. En 1990 King et al<sup>(5)</sup>, localizaron un locus para cáncer de mama hereditario en el cromosoma 17q21 y el gen candidato fue llamado *BRCA1*. En el año 1991 Narod et al<sup>(6)</sup> añadió la susceptibilidad al cáncer de ovario al fenotipo *BRCA1* y por fin en 1974 el gen fue

clonado por Miki et al<sup>(7)</sup>. El locus para el segundo gen de susceptibilidad a cáncer de mama fue localizado en el cromosoma 13q12 ese mismo año por Wooster et al<sup>(8)</sup> y clonado un año después por los mismos autores<sup>(9)</sup>.

Se ha establecido que alrededor del 5% de todos los cánceres de mama están directamente relacionados con genes de herencia autosómica dominante, considerándose a este tipo como cáncer de mama hereditario. Un 15% adicional de pacientes con cáncer de mama tienen también historia familiar, pero no existe un patrón claro de herencia. El cáncer de mama familiar se debe probablemente a la interacción de factores medio ambientales y genéticos (genes de baja penetrancia). Los polimorfismos en genes de baja penetrancia, confieren un riesgo bajo al cáncer pero son más prevalentes que las mutaciones en genes de alta penetrancia y explicarían una mayor

proporción de cánceres de mama en la población.

### Genes de susceptibilidad BRCA1 y BRCA2

Las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* son responsables de una gran mayoría de los tumores de mama y ovario de tipo hereditario. Existen otros síndromes mucho menos frecuentes en los cuales están implicados otros genes y que también producen cáncer de mama como son: el de Li-Fraumeni (mutaciones en *p53*), la enfermedad de Cowden (mutaciones en *PTEN*) y el síndrome de Peutz-Jeghers (mutaciones en *STK11*). La contribución de otros genes como *ATM* y *CHEK2* hoy por hoy es controvertida. Por otro lado tanto *BRCA1* como *BRCA2* no explican el origen de todos los tumores de mama y de ovario, por lo tanto la existencia de otros genes implicados no debe ser descartada (véase tabla 1)

Tabla 1. Genes de susceptibilidad al cáncer de mama

Gen	Cromosoma	Frecuencia	Penetrancia	Tipo de cáncer	Tumores asociados
BRCA1	17q21	Rara	Alta	Mama, ovario	Colon, próstata
BRCA2	13q12-13	Rara	Alta	Mama, ovario	Mama varón páncreas
P53 (Li-Fraumeni)	17p13.1	Muy raro	Alta	Mama, cerebro sarcoma leucemia	Melanoma
PTEN (Cowden)	10q22-23	Muy raro	Alta	Mama	Tiroides, mucosa oral, hamartomas de piel
ATM	11q22-23	Común	Baja	Linfoproliferativos	Neurodegeneración Inmunodeficiencia, Sensibilidad Radiación, Mama
HRAS1/ VNTR	11p15.5	Común	Baja		Mama, colon, vejiga

## Genética Molecular

*BRCA1* es un gen muy grande localizado en el cromosoma 17q12-21. Tiene 24 exones, 22 de ellos codificantes (5592 pares de bases). Los exones 1 y 4 son los no codificantes, traduce una fosfoproteína de 1863 aminoácidos. Este gen confiere una susceptibilidad aumentada para el desarrollo de cáncer de mama y de ovario y un riesgo aumentado de otros tumores como próstata, colon, endometrio, leucemia, páncreas<sup>(10)</sup>. Sus funciones no son bien conocidas, pero cada día se conocen más. Hasta el momento se sabe que actúa como proteína supresora de tumores y participa en la reparación del ADN de doble cadena y en mantener la integridad genómica<sup>(11-13)</sup>. Además está implicada en la regulación transcripcional ya que colabora con la holoenzima RNA Polimerasa, lo que indica que puede ser una de las proteínas activadoras de la transcripción<sup>(14,15)</sup>. Tiene también un papel en el desarrollo, pues los ratones doble knock out no se desarrollan<sup>(16)</sup>. Por último se conoce que *BRCA1* interacciona con p53 en la vía de la apoptosis<sup>(17)</sup>.

*BRCA2* es un gen mayor que *BRCA1* localizado en el cromosoma 13q12-13. Contiene 27 exones 26 de ellos codificantes y uno no codificante (Exon 1). Codifica para una proteína de 3418 aminoácidos. Confiere igual riesgo que *BRCA1* para desarrollar cáncer de mama, menor riesgo para el cáncer de ovario y mayor riesgo para el cáncer de mama en varón. Al igual que *BRCA1* también aumenta el riesgo de otro tipo de tumores como el de próstata, páncreas vesícula biliar, estómago y melanoma. La proteína *BRCA1* está también implicada en mecanismos de reparación del ADN de doble cadena y en mantener la integridad genómica<sup>(18)</sup>. Forma dímeros con *RAD51* y con *BRCA1*<sup>(19)</sup>.

Hasta el momento se han descrito muchas mutaciones en ambos genes y están localizadas a lo largo de toda la secuencia codificante. Para llevar a cabo un consejo genético adecuado hay que distinguir las mutaciones realmente patogénicas como las

que producen un codon de parada, las que cambian el marco de lectura y las que se encuentran en sitios de corte y empalme de aquellas mutaciones que cambian el aminoácido o no lo cambian conocidas como variantes sin clasificar, ya que no se conoce su repercusión sobre la función de la proteína y por otro lado están los polimorfismos, que son los cambios que se encuentran con relativa frecuencia en la población general.

Las técnicas de laboratorio usadas para el diagnóstico son múltiples considerándose las más sensibles y específicas el DGGE y el HPLC para el cribaje y la secuenciación para la confirmación. Recientemente se ha visto que la proporción de grandes reordenamientos en estos genes en las familias de riesgo es del 10%<sup>(20, 21)</sup>, este hallazgo nos ha llevado a incluir este estudio en las familias en las cuales no se encuentran mutaciones por las técnicas habituales. La técnica más apropiada para estos estudios es la de MLPA. En relación con el hallazgo en el laboratorio de una variante sin clasificar, el estudio se prolonga ya que debemos esclarecer una serie de criterios para aclarar su posible papel deletéreo de la variante como por ejemplo:

1. Que tipo de cambio de aminoácido ocurre
2. Localización de la mutación, si está en un sitio conservado o no del gen
3. Si segrega o no con la enfermedad
4. Si expresa o no la proteína
5. Por último, son muy útiles los ensayos funcionales, pero estos últimos son complicados y necesitan gente muy experta para ello

Estos son algunos ejemplos de la complejidad de estos test genéticos y de la importancia de las Unidades Pluridisciplinares de consejo genético para la interpretación correcta de los resultados del test.

### Prevalencia de mutaciones en los genes *BRCA*

En la población general, el riesgo de ser portador de una mutación está entre 1:100 a 1:400 dependiendo del grupo étnico. Se han

encontrado mutaciones fundadoras en varias poblaciones, por ejemplo en los judíos Ashkenazi se han encontrado tres mutaciones fundadoras dos en *BRCA1*, la 185 del AG y la 5382insC y una en *BRCA2* la 6174delT<sup>(22)</sup>. La prevalencia combinada de las tres mutaciones en dicha población judía es de 2.3%, esta prevalencia es 50 veces más alta que la de la población general. El 30% de los cánceres de mama en mujeres menores de 40 de años y el 39% de cánceres de ovario en menores de 50 años en esta población son causados por una de las tres mutaciones fundadoras. En la población de Islandia también se ha encontrado una mutación fundadora en *BRCA2* la 999de5<sup>(23)</sup>. Dicha mutación en Islandia es 20 veces más prevalente que la frecuencia alélica estimada en la población general. En España y en otros países no se han encontrado mutaciones fundadoras, pero sí mutaciones recurrentes. El hallazgo de encontrar tanto mutaciones fundadoras como recurrentes es importante, ya que simplifica mucho los estudios genéticos y ayuda al consejo genético ya que permite un mayor conocimiento del riesgo asociado a la mutación.

En un estudio llevado a cabo por el grupo español de cáncer hereditario de mama y ovario<sup>(24)</sup> en familias con síndrome de mama/ovario, ha encontrado un 26% de familias portadoras de mutación. Si se consideran solo las familias con mama y ovario, la prevalencia es del 52%. En este estudio se han identificado 60 mutaciones en *BRCA1* y 53 en *BRCA2*, no viéndose diferencias en el porcentaje de mutaciones deletéreas en estos genes. En España no se han encontrado mutaciones fundadoras, solo la mutación en *BRCA1* 330A>G parece ser recurrente en familias Gallegas. La prevalencia de mutaciones encontrada en familias españolas, es similar a la descrita en otros países Europeos.

### ¿En que familias está indicado el test genético?

Las mujeres con antecedentes personales y familiares que sugieren la existencia de algún tipo de predisposición hereditaria,

son relativamente frecuentes en la población general. Gracias a los planes de prevención y a la creciente información que suministran los medios de comunicación, cada vez es más habitual que estas mujeres busquen asesoramiento en una consulta de cáncer familiar. La identificación de los genes de susceptibilidad *BRCA1* Miki et al<sup>(25)</sup> y *BRCA2* Wooster et al<sup>(26)</sup> transformó profundamente el manejo y el tipo de asesoramiento que podían recibir estas familias. Hoy día la comprensión de la susceptibilidad genética a este tipo de patologías sigue siendo limitada. Por un lado, los genes *BRCA1* y *BRCA2* solo explican un 15-25% de las familias sospechosas de padecer algún tipo de susceptibilidad genética y no se dispone de una descripción clínica adecuada de los síndromes hereditarios asociados específicamente a defectos en estos genes. Por otro lado, el riesgo conferido por estos genes no está bien definido y por tanto la identificación de una mutación patogénica no es sinónimo de una buena estimación de riesgo en todos los casos. Como es lógico, este desconocimiento plantea numerosos problemas en dos etapas fundamentales del proceso de asesoramiento, como son la *selección de familias* que con más probabilidad pueden beneficiarse de un estudio genético y la *estimación de riesgo* una vez identificados los portadores. En los últimos años se han venido desarrollando diferentes abordajes estadísticos que pretenden ayudar al especialista a tomar decisiones en ambas etapas.

El análisis molecular de los genes *BRCA1* y *BRCA2* resulta muy complejo, debido tanto al tamaño de los dos genes como a la distribución aleatoria de mutaciones que se observa en la mayoría de poblaciones. El análisis debe incluir al menos toda la región codificadora de los dos genes (más de 15 Kb), las secuencias intrónicas adyacentes, y un estudio de grandes reordenamientos en los dos loci. Con las técnicas actuales, este proceso puede tardar meses en ser finalizado y requiere importantes recursos humanos y económicos, por lo tanto es muy importante

la correcta selección de las familias en la consulta de consejo genético. En el síndrome de cáncer hereditario de mama y ovario (HBOC) a diferencia del síndrome de HNPCC no existen criterios consensuados que nos indiquen a quien se debe hacer un test genético. El estudio de mutaciones en *BRCA* está basado en la prevalencia encontrada en su propia población y en criterios de coste beneficio. La experiencia de nuestro laboratorio en el estudio de mutaciones de estos genes en nuestra población nos ha conducido a proponer unos criterios propios de selección:

- Mujeres con cáncer de mama bilateral
- Mujeres con cáncer de mama/ovario < de 35 años
- Mujeres con cáncer de mama en familias con tres miembros afectados de cáncer de mama/ovario en dos generaciones sucesivas y uno de ellas diagnosticada antes de los 50 años
- Varones con cáncer de mama
- Mujeres de origen Judío

Estos criterios, son solo una guía, ya que hay otros factores en un árbol familiar que hay que tener en cuenta en relación con la condición hereditaria como son: el tamaño de las familias, la transmisión paternal, el número de varones en la familia.

### **Riesgo de cáncer asociado a mutaciones en *BRCA***

El riesgo de cáncer asociado a mutaciones germinales en *BRCA* es variable y depende del tipo de mutación y de la población donde se haya hecho dicho estudio. A pesar de que el heredar una mutación en *BRCA* confiere un riesgo elevado de cáncer de mama y de ovario, existe una variabilidad interindividual y un porcentaje de portadores pueden no desarrollar la enfermedad. También hay diferencias en la penetrancia de una misma mutación en dos familias diferentes. El riesgo de padecer cáncer de mama en portadores de *BRCA1* es de 50% a 85% y en portadores de *BRCA2* de 30% a 80%. El riesgo de un segundo cáncer en portadores de mutaciones en *BRCA*

es del 40%. El riesgo de cáncer de ovario es mayor en los portadores de mutaciones en *BRCA1* que en *BRCA2*. Las mutaciones en *BRCA1* se asocian también a otros tumores como el cáncer colorrectal y el de próstata y las mutaciones en *BRCA2* se asocian a melanoma, laringe y páncreas<sup>(27, 28)</sup>.

Las mutaciones en los genes *BRCA1/2* solo confieren una predisposición al cáncer, se piensa que existen otros locus genéticos que pueden actuar como modificadores de la penetrancia potenciando o coadyuvando al riesgo conferido por las mutaciones en los genes de susceptibilidad<sup>(29)</sup>.

## **SÍNDROME DE HNPCC: DIAGNÓSTICO E IMPORTANCIA**

### **Antecedentes históricos**

El cáncer colorrectal es el segundo cáncer más frecuente tanto en mujeres como en hombres, constituyendo la segunda causa más común de muerte por cáncer en el mundo occidental. Como mínimo un 5% de la población desarrollará un tumor colorrectal, pudiéndose incrementar este número debido al aumento de expectativas de vida. En Estados Unidos se diagnostican anualmente unos 130.000 nuevos casos y se producen unas 55.000 muertes por año. Aproximadamente el 15% de los casos tienen una historia familiar de cáncer colorrectal y un 5% de ellos desarrollan el cáncer a una edad temprana <45 años<sup>(30)</sup>. Los factores genéticos juegan un papel dominante en una pequeña proporción de casos. La patología más clara en relación con el riesgo familiar es la Poliposis Familiar Adenomatosa (FAP). Es una enfermedad con herencia autosómica dominante y una penetrancia del 100%. Está causada por mutaciones germinales en el gen *APC* que se encuentra localizado en el cromosoma 5q. Esta enfermedad, se caracteriza por el desarrollo de un gran número (>100) de pólipos adenomatosos en el colo-recto, y constituye el 1% de todos los tumores colorrectales<sup>(31)</sup>. Otro síndrome hereditario que está implicado en el desarrollo del cáncer colorrectal y que es más común, es el Cán-

cer Colorrectal Hereditario no Polipósico (HNPCC, Síndrome de Lynch). Es una enfermedad autosómica dominante de penetrancia incompleta (penetrancia estimada 80%), caracterizada por el desarrollo a edades tempranas de cáncer colorrectal, así como de otros tumores extracolónicos como endometrio, estómago, intestino delgado, sistema hepatobiliar, riñón, uréter y ovario<sup>(32)</sup>. El síndrome de HNPCC, representa el 2-5% de todos los casos de cáncer colorrectal<sup>(33)</sup> y se produce como consecuencia de mutaciones en uno de los siguientes genes reparadores: *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2* y *hMLH3*<sup>(34,35)</sup>, aunque la mayoría de mutaciones germinales (90% en las poblaciones estudiadas) se han identificado en los genes *hMLH1* y *hMSH2*. El tercer gen en importancia es el gen *hMSH6*, siendo minoritarias las alteraciones en *hPMS1*, *hPMS2* y *hMLH3* (véase la figura 1).

### Genética Molecular del Síndrome de Lynch

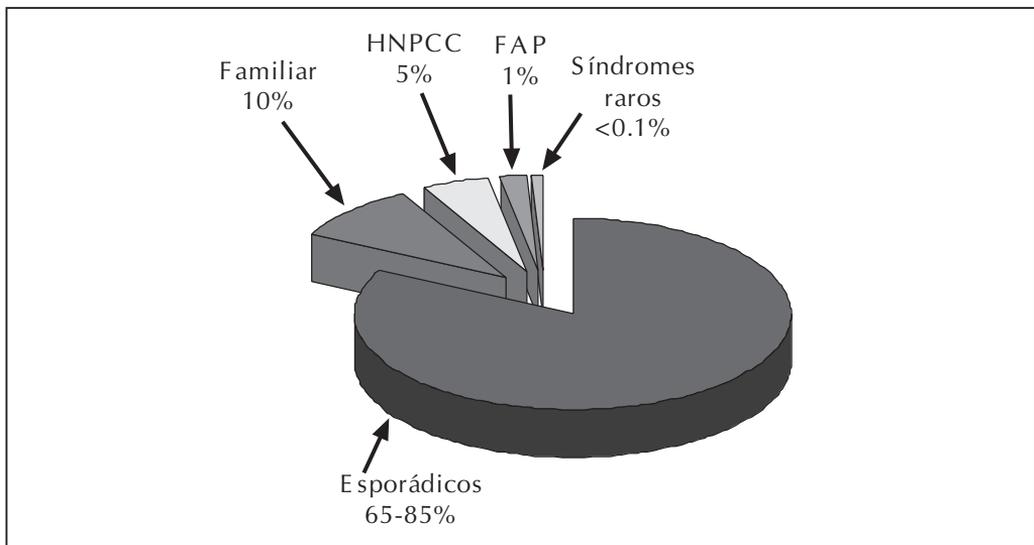
Se han descrito en pacientes HNPCC mutaciones en seis genes reparadores: *hMLH1* localizado en el cromosoma 3p21; *hMSH2* en 2p16; *hMSH6* en 2p15; *hPMS2* en 7p22; *hPMS1* en 2q22. Solamente entre

un 40-60% de las familias son portadoras de una mutación germinal en estos genes. Estos hallazgos sugieren al igual que en mama, la existencia de otros genes implicados y todavía desconocidos. Se ha visto que las mutaciones en *hMSH6* predisponen al cáncer de endometrio y a otro tipo de tumores más que a cáncer colorrectal solamente.

Las bases genéticas del Síndrome de HNPCC están relacionadas con la inestabilidad a microsátélites (MSI). La etiología de la enfermedad no se comprende en su totalidad, aunque se postula que la pérdida de función reparadora aumenta la tasa de mutaciones en secuencias repetitivas (microsátélites) localizadas en la región codificadora de determinados genes implicados en la iniciación y progresión tumoral (*TGFβRII*, *BAX*, *IGFIIR*, *GRB-14*, *MSH3*, *MSH6*...).

Las mutaciones encontradas hasta el momento se reparten indiscriminadamente por todos los genes implicados, por lo tanto el estudio se debe llevar a cabo en toda la secuencia codificante de los genes reparadores. Las técnicas que se deben utilizar son las mismas que las escritas anteriormente para los genes BRCA. Al igual que para los genes de mama y ovario debemos diferenciar las mutaciones deletéreas de las

Figura 1. Frecuencia de los tumores colorectales



variantes sin clasificar, con el fin de dar un consejo genético apropiado y correcto.

### ¿En que familias está indicado el test genético?

El riesgo de desarrollar cáncer colorrectal en los subgrupos de cáncer colorrectal hereditario o familiar, varía entre un 15% para los parientes de los pacientes diagnos-

ticados antes de los 45 años, a un 20% para los miembros de familias con dos parientes en primer grado con cáncer colorrectal, y aproximadamente un 70-95% en pacientes con FAP y HNPCC<sup>(36-38)</sup>. El test genético es una opción diagnóstica que, potencialmente, puede ser de gran utilidad clínica para las familias con síndrome HNPCC. La identificación de una mutación patogénica per-

**Tabla 2. Criterios clínicos para la selección de las familias HNPCC**

<b>Historia personal y/o familiar de cáncer</b>
<p><b>Amsterdam I</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tres familiares con cáncer colorrectal, uno de ellos en primer grado de los otros dos</li> <li>• Al menos dos generaciones afectadas</li> <li>• Al menos uno de los cánceres colorrectales diagnosticado antes de los 50 años</li> <li>• Haber descartado FAP</li> </ul>
<p><b>Amsterdam II</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Igual que los criterios Amsterdam I, con la excepción de que:</li> <li>• No es necesario que los 3 cánceres sean colorrectales, sino que pueden estar afectados con otros tumores extracolónicos asociados a este síndrome HNPCC, como son: endometrio, estómago, intestino delgado, sistema hepatobiliar, riñón, uréter y ovario</li> </ul>
<p><b>Bethesda</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Individuos de familias que cumplen criterios de Amsterdam</li> <li>• Individuos con dos tumores relacionados con HNPCC, incluyendo tumores colorrectales sincrónicos o metacrónicos o asociado a tumores extracolónicos</li> <li>• Individuos con cáncer colorrectal y un pariente en primer grado con cáncer colorrectal y/o tumor relacionado con HNPCC diagnosticado antes de los 45 años y/o adenoma colorrectal antes de los 40 años</li> <li>• Individuos con cáncer colorrectal o de endometrio antes de los 45 años</li> <li>• Individuos con cáncer colorrectal derecho con patrón histológico indiferenciado diagnosticado antes de los 45 años</li> <li>• Individuos con cáncer colorrectal de células en anillo de sello diagnosticados antes de los 45 años</li> <li>• Individuos con adenomas diagnosticados antes de los 40 años</li> </ul>
<p><b>Agregación familiar o HNPCC like</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Familias que sin cumplir los criterios anteriores son sospechosas de presentar un síndrome hereditario HNPCC</li> </ul>

mite seleccionar a los familiares portadores sanos que pueden beneficiarse de los diversos protocolos de seguimiento y/o medidas profilácticas, evitando los costes y molestias derivadas de las mismas a los familiares no portadores. Por otro lado desde el punto de vista del tratamiento a aplicar, el reconocimiento de estas formas hereditarias es también importante ya que la respuesta en los casos hereditarios es diferente a los no hereditarios.

A diferencia del síndrome de mama y ovario, en el síndrome de HNPCC se ha llegado a un acuerdo en relación con los criterios clínicos de selección de las familias susceptibles de hacer el estudio de mutaciones en los genes MMR. Este acuerdo está reflejado en los criterios de Ámsterdam, Ámsterdam modificado y Bethesda (véase la tabla 2). La mejor manera de identificar los casos hereditarios es llevar a cabo una historia familiar detallada y aplicar los criterios expuestos anteriormente.

**Inestabilidad a microsatélites y expresión de las proteínas reparadoras en la selección molecular de las familias para hacer el test genético**

La inestabilidad a microsatélites (MSI), es causada por un fallo en el sistema de reparación de los desapareamientos en el ADN y fue descrita por primera vez en 1993 por Thibodeau et al<sup>(39)</sup>. En el año 1998 se establecieron unas guías internacionales

para la evaluación de MSI, comunicando a la comunidad investigadora internacional la utilización de un panel de 5 microsatélites en el estudio<sup>(40)</sup>. En estos marcadores están incluidos tres microsatélites con repeticiones de dos nucleótidos D5S345, D2S123 y D17S250 y dos microsatélites con repeticiones de un solo nucleótidos BAT25 y BAT26. Si dos de los cinco microsatélites muestran inestabilidad (ganancias o pérdidas en el número de repeticiones), se considera que ese tumor tiene alta inestabilidad y se le denomina MSI-H. Si solo hay inestabilidad en uno de los marcadores, entonces se dice que el tumor tiene baja inestabilidad y se le denomina MSI-L<sup>(40)</sup>. Un tumor que no presenta inestabilidad para ningún marcador se dice que es estable y se le denomina MSS. La inestabilidad a microsatélites, no es específico de HNPCC, ya que ocurre en el 15% de los tumores colorectales esporádicos así como también ocurre en los tumores de endometrio y en los gástricos. Recientemente ha sido demostrado que el estudio de MSI es efectivo para seleccionar familias con sospecha de HNPCC para llevar a cabo el estudio genético<sup>(41-43)</sup>.

Otra técnica introducida recientemente para la identificación de deficiencia en el mecanismo de reparación de los desapareamientos en el ADN, es el estudio de expresión de las proteínas reparadoras llevado a cabo en el tumor de los pacientes por la técnica de inmunohistoquímica. Wilson et

**Tabla 3. Resultados encontrados por distintos autores para predecir la presencia de mutaciones mediante el estudio de la Inmunohistoquímica**

Mutación en los genes MMR	Nº de tumores	Expresión de las proteínas por inmunohistoquímica				
		hMLH1		hMSH2		hMSH6
<i>hMLH1</i>	37	28 (76%)	-	34 (92%)	+	No estudiado
	2	1	-	2	+	1 +
<i>hMSH2</i>	23	23 (100%)	+	23 (100%)	-	No estudiado
	4	4	+	4	-	3 -
<i>hMSH6</i>	14	12 (86%)	+	12 (86%)	+	11 (79%) -

al<sup>(42)</sup> fueron los primeros que mostraron el uso de anticuerpos frente a la proteína MSH2. Más tarde se describió el uso de anticuerpos frente a las proteínas MLH1 y MSH6. A partir de ese momento se han publicado muchos estudios sobre el uso de la inmunohistoquímica (IHC) en familias sospechosas de ser HNPCC. La mayoría de estos estudios han mostrado que la pérdida de expresión detectada por esta técnica se correlaciona muy bien con la presencia de una mutación germinal en MMR<sup>(43-47)</sup>. La tabla 3 muestra el resumen de algunos de estos trabajos publicados. Basándose en estos resultados, se recomienda el uso de la IHC como método de selección para identificar posibles pacientes con defectos en los genes MMR.

La IHC tiene varias ventajas, primero es una técnica barata, segundo se hace en poco tiempo, y por último y quizá la más importante es que nos dirige el análisis para buscar la mutación en el gen que no se expresa que sería el gen implicado. Por otro lado la IHC debe ser hecha por personal experto y valorada por dos patólogos independientes. También se debe tener en cuenta que la ausencia de expresión de la proteína MLH1 no siempre se debe a mutaciones en el gen, sino que la causa puede ser la hipermetilación en el promotor de este gen. Este hecho ocurre en los tumores esporádicos con inestabilidad a microsatélites y nos lo podemos encontrar en los tumores CRC de individuos de edad avanzada.

Un estudio llevado a cabo por nuestro grupo en 130 familias Españolas con sospecha de síndrome de HNPCC<sup>(41)</sup>, hemos encontrado una concordancia entre alta inestabilidad a microsatélites y pérdida de

expresión de alguna de las proteínas reparadoras por inmunohistoquímica del 82% y una concordancia del 98% para los tumores estables que mantenían la expresión de las proteínas (véase la tabla 4)

## DISCUSIÓN

### Estrategia para el estudio molecular del HNPCC: MSI, IHC y análisis de mutaciones.

Vasen et al<sup>(48)</sup>, presentan una estrategia para la selección de pacientes, pertenecientes a familias sospechosas HNPCC, en los que se debe hacer el estudio genético de mutaciones en *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* y *hPMS2*. Para estos autores la estrategia a seguir es diferente según sea la clasificación clínica de estas familias. En familias que cumplen los criterios de Amsterdam I y II, se recomienda como primer paso para seleccionar las familias para el análisis de mutaciones en los genes MMR, el estudio de la IHC de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. En caso de duda en los resultados o si se expresan todas las proteínas, entonces se recomienda como segundo paso, el estudio de inestabilidad a microsatélites (MSI). En familias claramente sospechosas de ser HNPCC y en las cuales ambas pruebas han sido negativas, se debe hacer el estudio en otro tumor procedente de otro miembro de la familia, porque existe la posibilidad de que el primero estudiado sea un cáncer esporádico (una fenocopia) en una familia HNPCC. En familias sospechosas de ser HNPCC pero que no cumplen Amsterdam I o II, se recomienda como primer paso hacer el análisis de inestabilidad a microsata-

**Tabla 4. Comparación de los resultados de MSI y IHC**

MSI	Expresión positiva (+)	Expresión negativa (0/+)	Concordancia
MSI-H (N=55)	10	45	82%
MSS (N=56)	55	1	98%

télites (MSI). Como segundo paso se haría el estudio de IHC en los tumores MSI-H o MSI-L con el fin de guiar el estudio de mutaciones hacia un determinado gen. En los tumores MSS se haría el estudio de la proteína MSH6 por inmunohistoquímica (IHC), ya que parece ser que el tener una mutación en este gen no siempre va acompañada de inestabilidad a microsatélites. En nuestro grupo de trabajo hemos elaborado un algoritmo de estudio del síndrome de HNPCC, la estrategia a seguir está resumida en la figura 2, y se debe llevar a cabo en aquellos hospitales donde exista una colaboración entre los genéticos clínicos y moleculares, patólogos, cirujanos, gastroenterólogos, oncólogos y por supuesto donde los pacientes sean registrados correctamente.

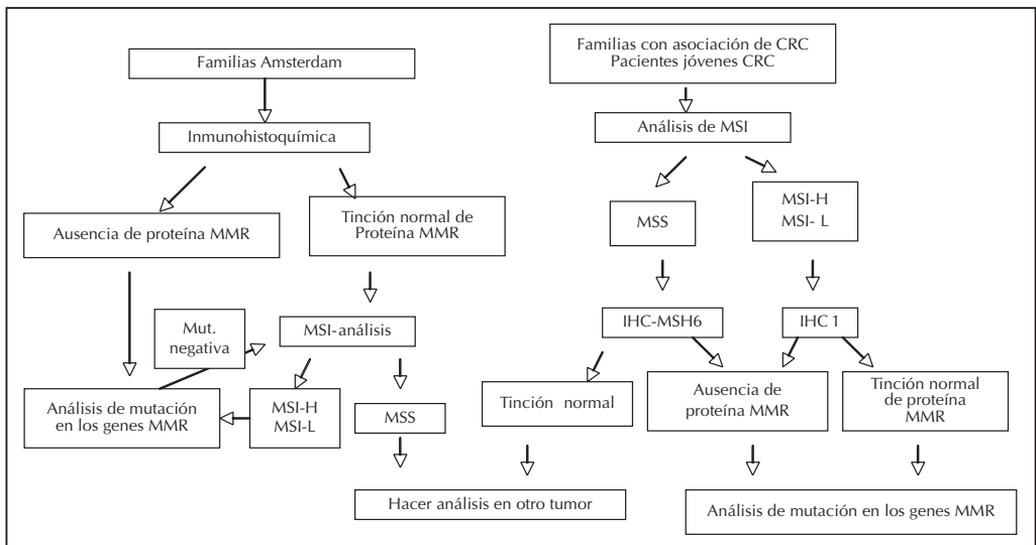
**CONCLUSIONES**

La interpretación y la información de los resultados obtenidos en el estudio genético debe llevarse a cabo por el equipo multidisciplinar, ya que no siempre se sabe la implicación que puede tener el cambio encontrado sobre la función de la proteína implicada. Las mutaciones que producen un codon de parada, las inserciones o dele-

ciones que producen un cambio en el marco de lectura y un codon de parada prematuro, las mutaciones en los sitios de corte y empalme y los grandes reordenamientos, son consideradas como mutaciones deletéreas y por tanto son las responsables de la susceptibilidad al cáncer. Este tipo de alteración se considera como resultado positivo, y al informar al probando se le debe sugerir hacer el estudio extensivo a toda la familia, y recomendar las medidas de prevención y seguimiento adecuadas y actualizadas para la patología de estudio. Las mutaciones que producen cambio de aminoácido son consideradas como variantes sin clasificar, y son las más complicadas para explicar desde el punto de vista de consejo genético ya que no podemos asegurar que sean responsables de la susceptibilidad al cáncer. Un resultado de este tipo implica seguir profundizando en el estudio de la variante teniendo en cuenta el estudio expuesto al principio de este capítulo (genética molecular).

El hecho de no encontrar una mutación responsable del síndrome de HNPCC en los miembros de una familia, no excluye que esta no pueda existir, ya que puede ser que no se detecte por la técnica utilizada o bien

**Figura 2. Algoritmo de estudio de las familias sospechosas de HNPCC**



que se encuentre en otro gen no conocido hasta el momento. Por lo tanto, el resultado del estudio no debe influir sobre las recomendaciones del seguimiento. La ventaja de los estudios genéticos es que se puede conocer la naturaleza hereditaria de la enfermedad, y que, en las familias portadoras de una determinada mutación patogénica, se puede diferenciar los portadores de la mutación familiar de los no portadores.

Los resultados expuestos anteriormente deben ser comunicados a la familia entendiendo el significado de lo que se les dice y dedicando el tiempo necesario para que ellos puedan asimilar toda la información que se les está dando. Por todo ello las consultas de Consejo Genético o las Clínicas Familiares son una necesidad social de hoy y deben establecerse en hospitales de referencia donde exista un laboratorio de Oncología Molecular que debe estar en todo momento en contacto con la clínica, de esta forma se llevará a cabo un consejo genético correcto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mincey N.A. Genetics and the management of women at high risk for breast cancer. *Oncologist* 2003; 8:466-73.
2. Lynch H.T., Krush A.J. Carcinoma of the breast and ovary in three families. *Surg Gynecol Obstet* 1971;133:644-8.
3. Anderson D.E. Genetic study of breast cancer: identification of a high risk group. *Cancer* 1974; 34:1090-7.
4. Claus E.B., Rish N., Thompson W.D. Genetic analysis of breast cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet* 1991;48: 232-242.
5. Hall J.M., Lee M.K., Newman B. Morrow J.E., Anderson L.A. et al. Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250:1684-9.
6. Narod S.A., Feunteun M., Lynch H.T., et al. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q21. *Science* 1990;338: 82-3.
7. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A., Harshman K. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266:66-71.
8. Wooster R., Newhausen S.L., Mangion J, Quirk Y, Ford D. et al. Localization of a breast-cancer susceptibility gene, BRCA 2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265: 2088-90.
9. Wooster R., Bignell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378:789-792.
10. Johansson O.T., Loman N., Moller T., Kristofferson U., Borg A., Olsson H. Incidence of malignant tumors in relatives of BRCA1 and BRCA2 germline mutation carriers. *Eur J Cancer* 1999; 35:1248-57.
11. Welsch P.L., Owens K.N., King M-C. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* 2000;16:69-74.
12. Gowen L.C., Avrutskaya A.V., Latour A.M., Koller B.H., Leadon S.A. BRCA1 is required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science* 1998; 281:1009-12.
13. Chen J-J, Silver D., Cantor S., Livingston D.M., Scully R. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res* 59 (7 Suppl):1752s-6s.
14. Monteiro A., August A., Hanafusa H. Evidence for a transcriptional function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13595-99.
15. Anderson S.F., Schlegel B.P., Nakajima T., Wolpin E.S., Parvin J.D. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat Genet* 1998;19: 254-6.
16. Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, et al. The tumor suppressor gene Bcr1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* 1996; 85:1009-1023.
17. Ouchi T, Monteiro ANA, August A, Aaronson SA, Hanafusa H. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 2302-6.
18. Patel K.J., Yu V.P.C.C., Lee H., Corcoran A., Thistlewaite F.C. et al. Involvement of Brca 2 in DNA repair. *Mol Cell* 1998; 1:347-57.

19. Katagiri T., Saito H., Shinohara A., Ogawa H., Kamada N. et al. Multiple possible sites of BRCA2 interacting with DNA repair protein RAD51. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21:217-22.
20. Unger M.A., Nathanson K.L., Calzone K., Antin-Ozerkis D., Shih HA, Martin A.M. et al. Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. *Am J Hum Genet* 2000; 67:841-50.
21. Woodward A.M., Davis T.A., Silva A.G.S., kConFab Investigators, Large genomic rearrangements of both BRCA2 and BRCA1 are a feature of the inherited breast/ovarian cancer phenotype in selected families. *J Med Genet* 2005. 24:e31
22. Roa B.B., Boyd M., Votcik K., Richards C.S. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet* 1996; 14:85-187.
23. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 1998; 58: 4023-37.
24. Diez O., Osorio A., Durán M., Martínez-Ferrandis J.L., de la Hoya M. et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 Genes in Spanish Breast/Ovarian Cancer Patients: A High Proportion of Mutations Unique to Spain and Evidence of Founder Effects. *Hum Mutat* 2003;22:301-12.
25. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A., Harshman K. et al, A strong candidate for the breast cancer and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266:66-71.
26. Wooster R., Neuhausen S.L., Mangion J., Quirk Y., Ford D., et al Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q12. *Science*1995; 265:2088-90.
27. Ford D., Easton D.F., Bishop D.T., Narod S.A., Goldgar D.E. Risk of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet* 1994; 345:692-5.
28. Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1310-1316.
29. Nathanson K.N., Wooster R, Weber B.L. Breast cancer genetics: What we know and what we need. *Nat Med* 2001; 7:552-6.
30. Slattery M.L., Kerber R. A. Family history of cancer and colon cancer risk the Utah Population database. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:1618-26.
31. Bussey H.J. *Familial Poliposis Coli*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1975.
32. Lynch H.T., Smyrk T.C., Watson P., Lanspa S.J., Lynch J.F. et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-49.
33. Aaltonen L.A., Salovaara R., Kristo P. Canzian F., Hemminki A. et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1481-1487.
34. Peltomaki P., Vasen H.F. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer, database and results of a collaborative study. The international collaborative group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997; 113: 1146-58.
35. Miyaki M., Konishi M., Tanaka K Kikuchi-Yanoshita R., Muraoka M., Yasuno M. et al.. Germline mutations of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genet* 1997; 17:271-2.
36. St John J, McDermott F.T., Hopper JL, Debney E.A., Johnson W.R., et al. Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1993; 118:785-90.
37. Vasen H.F Wijnen J.T., Menko F.H., Kleibeuker J.H., Taal B.G., et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1020-7.
38. Aarnio M., Sankila R., Pukkala E., Salovaara R, Aaltonen L.A. et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA mismatch repair genes. *Int J Cancer* 1999; 8:214-8.
39. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 339:511-518.

40. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R., Sidransky D., Eshleman J.R., et al. A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57.
41. Caldes T., Godino J., Sanchez de Abajo A., Corbacho C., de la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer. *Oncol Rep* 2004; 12:621-9.
42. Wilson TM, Ewel A, Duguid IR Eble J.N., Lescoe M.K, et al. Differential cellular expression of the human MSH2 repair enzyme in small and large intestine. *Cancer Res* 1995; 55:5146-50.
43. Thibodeau S.N, French AJ, Roche P.C., Cunningham J.M., Tester D.J. et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996; 56:4836-40.
44. Marcus V.A., Madlenski L., Gryfe R., Kim H, So K, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:1248-55.
45. de Leeuw W.J., Dierssen J, Vasen H.F., Wijnen J.T., Kenter G.G. et al, Prediction of a mismatch repair gene defect by microsatellite instability and immunohistochemical analysis in endometrial tumors from HNPCC patients. *J Pathol* 2000; 192:328-35.
46. Saalahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A. Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* 2001; 81:535-41.
47. Halvarsson, B, Lindblom A., Rambech E, Lagerstedt K., Nilbert, M. Microsatellite instability análisis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444:135-41
48. Vasen H.F.A., Morreau H. Familial and Hereditary colorectal cancer with emphasis on the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Curr Diagn Pathol* 2002; 8: 241-8.