

Premios y Becas



Bases Convocatoria Becas SEOM para Formación en Investigación Traslacional en Centros de Referencia en el Extranjero

Número de Becas: 4 (1 Beca con la colaboración de Novartis).

Dotación: 70.000 € cada una.

Duración: La dotación económica prevista es de dos años.

Requisitos de los solicitantes:

- Médicos Especialistas en Oncología Médica hasta 5 años desde el término de la residencia o Residentes de Oncología Médica de cuarto año.
- Miembro de la SEOM.
- Alto nivel de inglés hablado y escrito.

Ámbito: Europa, Estados Unidos y Canadá.

Formato de la solicitud:

- Nombre del solicitante.
- CV del solicitante.
- Justificación solicitud de ayuda (Carta cerrada del solicitante en inglés)- Anexo2.
- Cartas de recomendación – Anexo 2.
- Después de la preselección del solicitante por la Comisión de Becas de la SEOM, este deberá ser entrevistado por el grupo receptor y una vez confirmada su aceptación, debe presentar un proyecto a realizar durante el tiempo de la beca.

Plazos:

- En mayo 2010 se realiza la convocatoria y difusión a los miembros de SEOM.
- El 30 de junio de 2010 finaliza el plazo de presentación de proyectos.
- En julio 2010 resolución convocatoria y comunicación.

Presentación: Enviar original de la solicitud en papel a la Secretaría de la SEOM en C/ Conde Aranda 20-5º dcha. 28001 Madrid y copia en formato electrónico a marinacasanueva.congresos@seom.org. En el exterior del sobre deberá constar la modalidad de Beca, la fecha de solicitud y nombre del solicitante.

Evaluación: Cada solicitud presentada será revisada por dos evaluadores que emitirán un informe en base a los siguientes criterios (máx 50 pts):

- Curriculum vitae del solicitante (puntuar de 0 a 16) – Seguir plantilla modelo.
- Cartas de recomendación (de 0 a 4) – Anexo 2.
- Carta del solicitante (de 0 a 10) – Anexo 2.
- Entrevista personal en inglés (de 0 a 20) – Anexo 2.

Dicho informe será remitido al Jurado.

Jurado: El Jurado estará formado por miembros designados por la Junta Directiva de la SEOM. Los miembros del Jurado realizarán una evaluación estratégica posterior a la evaluación técnica que realicen los evaluadores.

Adjudicación: La decisión del Jurado se transcribirá en un Acta y el fallo será inapelable. El Jurado podrá decidir no adjudicar la totalidad de las ayudas previstas si considera que las solicitudes presentadas no alcanzan el nivel adecuado.

Informes: El investigador deberá aportar unos resultados de PhD extranjero/europeo. Es deseable que la actividad desarrollada por el candidato durante los 2 años de la beca permita alcanzar el grado PhD europeo o del país receptor del investigador, o en caso de contar ya con un PhD la estancia deberá encuadrarse en un Post-doc con posibles publicaciones que avalen el adecuado aprovechamiento de la estancia.

A criterio de la Comisión se solicitará una exposición presencial cuando se considere necesario.

Publicación: Las publicaciones o comunicaciones generadas a raíz de esta Beca deberán consignar explícitamente la existencia del soporte de la SEOM. La no mención explícita puede ser causa de reclamación por parte de la Sociedad. Cualquier opinión expresada en estas publicaciones o comunicaciones son las de sus autores y no reflejan necesariamente las de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). La SEOM y su Fundación no se responsabilizan de los criterios expuestos en ellos.

El Boletín de la SEOM podrá publicar o reproducir los resultados parciales o finales del estudio.

Pagos: Se realizarán dos pagos:

- 35.000 € en el momento de la concesión de la Beca.
- 35.000 € una vez transcurrido el primer año de la estancia.
- Si el proyecto supera los dos años, el solicitante podrá pedir la Beca FIS de ampliación de estudios para el tercer año y sucesivos donde la SEOM se compromete a ayudarle en los trámites necesarios para dicha solicitud.

Las Memorias remitidas serán archivadas en la Secretaría de la SEOM y no se mantendrá correspondencia sobre las mismas.

Características de las becas e incompatibilidades:

- 1.- La concesión y disfrute de estas Becas no implica relación laboral alguna con la SEOM ni con su Fundación, ni supone ningún compromiso de incorporación posterior de los becarios a sus plantillas.
- 2.- El disfrute de una Beca al amparo de esta convocatoria es compatible con cualquier otra Beca o ayuda otorgada para la misma finalidad cualesquiera que sea los fondos públicos o privados.
- 3.- El becario podrá durante la vigencia de la Beca desarrollar otros trabajos o estudios, siempre que no interfieran con el cumplimiento de las obligaciones establecidas por la SEOM.

La participación en la Convocatoria supone la aceptación de sus bases.

Anexo 1

Lista de Investigadores, centros y líneas de investigación.

Professor Alan Answorth

The Institute of Cancer Research.
London, United Kingdom.
DNA repair.

Professor Paul Workman

The Institute of Cancer Research.
Sutton, United Kingdom.
Heat Shock Proteins and drug
development.

Professor Michael Stratton

The Wellcome Trust Sanger Institute.
Cambridge, United Kingdom.
Cancer genome project.

Professor Peter Carmeliet

Versalius Research Centre, Katholieke
Universiteit Leuven.
Leuven, Belgium.
Angiogenesis and cancer.

Professor Joan Massague

Memorial Sloan Kettering Cancer
Centre.
Manhattan, New York, United States.
Cancer Metastasis.

Professor Robert Kerbel

Sunnybrook Health Science Centre,
University of Toronto.
Toronto, Canada.
Angiogénesis y cáncer.

Professor Charles L. Sawyers

Memorial Sloan-Kettering Cancer
Centre.
Mahanttan, New York, United States.
Molecular targeted drugs and
resistance.

Professor Lisa S. Coumms

Helen Diller Family Comprehensive
Cancer Center, UCSF.
San Francisco, California,
United States.
Inflammation and Cancer.

Ana María González - Angulo, M.D., M.Sc.

MD Anderson Cancer Center,
Houston, TX .
Laboratorio de Biología Molecular de
Mama.

Bruce E. Johnson

Dana Farber Cancer Center/Harvard
University (Boston).
Transducción de señal en cáncer de
pulmón.

Tyler Jacks

MIT Center for Cancer Research,
Harvard University (Boston).
Ciclo celular, genes supresores y
oncogenes.

Stephen Baylin

The Sidney Kimmel Comprehensive
Cancer Center at Johns Hopkins (Bal-
timore).
Epigenética.

Kenneth Kinzler

Ludwig Center at Johns Hopkins Uni-
versity, (Baltimore).
Alteraciones genéticas en cáncer de
colon.

W. K. Alfred Yung

The University of Texas
M. D. Anderson Cancer Center
(Houston).
Neuro-oncología.

James L. Abbruzzese

The University of Texas
M. D. Anderson Cancer Center
(Houston).
Cáncer de páncreas.

Michael F. Clarke

Stanford Cancer Center
(Stanford University, Palo Alto, CA).
Cancer stem cell.

Patrick O. Brown

Stanford Cancer Center (Stanford
University, Palo Alto, CA).
Expresión génica y regulación de la
expresión génica.

Jaap Verweij

Department of Oncology, Erasmus
University Medical Center
(Rotterdam).
Fases-I en nuevos fármacos.

Bruce Ponder

Cancer Research UK Cambridge
Research Institute (Cambridge, UK).
Susceptibilidad genética en cáncer.

Stephen Smale

UCLA's Jonsson Comprehensive
Cancer Center (Los Angeles).
Regulación transcripcional.

Allan Weissman

National Cancer Insitute, NIH
(Bethesda).
Transducción de señal en
proliferación y apoptosis.

Paul Meltzer

National Cancer Insitute, NIH
(Bethesda).
Inestabilidad genética y
cromosómica en cáncer.

Michael Gottesman

National Cancer Insitute, NIH
(Bethesda).
Mecanismos moleculares de
resistencia.

Antonio Jimeno M.D., Ph.D.

University of Colorado Cancer
Center (USA).
Investigación traslacional de eventos
moleculares en muestras de pacien-
tes tratados con inhibidores de hed-
gehog y PI3K.

Baremo de puntuación: Máximo 50 puntos.

1) Valoración de los meritos del candidato/a.

Máximo 16 puntos:

- a) Nota media del expediente académico (Aprobado = 1, Notable = 2, Sobresaliente = 3 y Matrícula de honor = 4). Máximo 4 puntos.
- b) Estudios de post-grado (Cursos de doctorado =1 punto, Suficiencia investigadora = 2 puntos, Título de doctor = 3.5, Título de doctor "Cum Laude"= 4). Máximo 4 puntos.
- c) Otra Diplomatura o Licenciatura o maestría 1 punto. Máximo 2 puntos.
- d) Publicaciones. Máximo 3.5 puntos.
 - Revistas indexadas en el primer cuartil: 1^{er} autor o co-autor (0.5 pts), 2^{do} o 3^{er} autor (0.35 pts).
 - Revistas indexadas después del 1^{er} cuartil: 1^{er} autor o co-autor (0.25 pts), 2^{do} o 3^{er} autor (0.15 pts).
- e) Comunicaciones a congresos científicos Máximo 2 puntos.
 - Comunicaciones orales en congresos internacionales: 1^{er} autor (0.35 pts), 2^{do} o 3^{er} autor (0.2 pts).
 - Comunicaciones orales en congresos nacionales: 1^{er} autor (0.2 pts), 2^{do} o 3^{er} autor (0.1 pts).
 - Poster a congresos internacionales: 1^{er} autor (0.25 pts), 2^{do} o posterior (0.1 pts).
 - Poster a congresos nacionales: 1^{er} autor (0.15 pts), 2^{do} o posterior (0.05 pts).
- d) Otros méritos (conocimiento de Inglés, premios científicos, otras titulaciones no universitarias). Máximo 0.5 punto.

2) Cartas de recomendación (2 referencias).

Máximo 4 puntos.

Las cartas de recomendación seguirán el modelo adjunto preestablecido en el cual el referente detallará su relación con el solicitante, del cual valorarán y argumentarán las siguientes características:

- a) Potencial investigador.
- b) Capacidad de pensamiento crítico.
- c) Capacidad de trabajo.
- d) Capacidad de creativa.
- e) Mayor/es logros durante su residencia/formación.
- f) Interés y capacidad de alcanzar objetivos.

De acuerdo con la argumentación de cada punto, el referente asignará una puntuación de 0 a 4 a cada una

de las características (0= mediocre, 1= bueno, 2 = muy bueno, 3= excelente, 4 = extraordinario).

Finalmente, un revisor independiente y ciego para las puntuaciones asignadas, asignará puntuaciones basadas únicamente en la argumentación de ambos referentes. La puntuación final corresponderá a la media final de estas tres puntuaciones.

3) Carta del solicitante. Máximo 10 puntos.

El solicitante completará junto a la solicitud una carta del solicitante explicando su motivación, interés, expectativas y planes de futuro. Dicha carta será redactada en inglés y siguiendo un modelo adjunto en el que se responderá a las siguientes preguntas cerradas:

- a) Which is the applicant experience and interest in medical and/or translational research?
- b) What is the interest of the applicant in becoming a Clinician (medical oncologist) Scientist?
- c) Which are the strongest applicant abilities to become a successful researcher?
- d) How would receiving this award affect the applicant's career in short term?
- e) What's it the applicant medium and long-term career plan?
- f) How would awarding the applicant with this training fellowship help the Spanish oncology?
- g) In which project/s would the applicant be more interested and why?

Esta carta será revisada y puntuada por dos revisores de forma independiente, puntuando cada uno de ellos los siguientes aspectos con una valoración de 1 a 5. La puntuación final corresponderá a la suma de la puntuación media de ambos evaluadores.

4) Entrevista personal. Máximo 20 puntos.

El solicitante será finalmente entrevistado por un panel consistente en dos miembros de la Comisión de becas, y dos evaluadores externos incluyendo al menos un investigador básico. Parte de la entrevista podrá ser realizada en inglés. Las preguntas en dichas entrevistas se basarán tanto en los méritos curriculares del solicitante, como en sus cartas de recomendación y carta personal. Así mismo podrían ser introducidas preguntas tipo similares para todos los solicitantes. La puntuación final se otorgará por consenso del panel evaluador.

Informe final. Beca SEOM 2006-2007 para proyectos de investigación

Evaluación Integral de las variantes Genéticas de Significado Clínico Desconocido en Familias con Síndrome de Lynch

Investigadora principal: Dra. Carmen Guillén Ponce

Resumen

El síndrome de Lynch supone alrededor del 3% de todos los tumores colorrectales. El diagnóstico genético del síndrome se lleva a cabo mediante el análisis de los genes responsables del síndrome MLH1, MSH2, y MSH6. Del estudio de estos genes se pueden obtener diferentes tipos de variantes genéticas, que atendiendo a su implicación en la patogénesis pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- a) Mutaciones deletéreas o patogénicas que se consideran causantes del síndrome.
- b) Neutrales o polimorfismos que están presentes en población normal y no se relacionan con la patología.
- c) Variantes de significado incierto o sin clasificar (UV).

Este tercer grupo constituye un verdadero problema desde el punto de vista de la actividad del Consejo Genético en Cáncer, ya que no puede ser utilizado en los test predictivos para discriminar entre familiares de alto y bajo riesgo.

En el presente proyecto se plantea el estudio de las diferentes líneas de evidencia que pueden aportar información para la clasificación final de estas variantes de significado incierto, así como la evaluación integral de dicha información. Estas líneas de evidencia incluyen:

- a) La simultaneidad de mutaciones deletéreas en el mismo caso.
- b) Análisis in silico de la repercusión funcional con respecto a la naturaleza y posición del cambio de aminoácido y el grado de conservación de la variante entre especies.
- c) Generación de formas aberrantes en el procesamiento del RNA.
- d) Estudios de co-segregación de la variante con la enfermedad en los pedigrís, así como la frecuencia de la variante en casos y controles; y las características anatomopatológicas del tumor que se asocian al síndrome.

Se analizaron un total de 16 de estas UV obtenidas en el contexto de las Unidades de Consejo Genético en Cáncer de la Comunidad Valenciana. Se evaluaron las líneas de evidencia expuestas y se valoraron de acuerdo a los criterios establecidos por el IARC Unclassified Variants Working Group. Los resultados permitieron clasificar un total de cinco de las variantes analizadas (31%). La integración de la información obtenida por diferentes grupos en una única base de datos, es fundamental para tratar de solventar la incertidumbre que crean estas UV en el manejo clínico de las familias portadoras.

Introducción

El Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (CCHNP) es una enfermedad autosómica y dominante que predispone a los portadores de mutación al desarrollo de diferentes tipos de tumor. La incidencia de este síndrome en la población española es del 2.5% de todos los tumores colorrectales y supone el síndrome hereditario de CCR más frecuente⁽¹⁾. Los individuos de estas familias portadores de mutación tienen un riesgo acumulado del 80% de padecer CCR y del 60% de cáncer de endometrio. Existe así mismo, un incremento significativo de riesgo de otros tipos de tumores como estómago, ovario, intestino delgado, tracto biliar, riñón y sistema nervioso central. Los tumores colorrec-

tales que aparecen en este síndrome se caracterizan por una edad temprana aparición, localización proximal (en el 60-70% de los casos), riesgo incrementado de CCR sincrónicos y metacrónicos y mejor pronóstico⁽²⁾. Para que una familia sea diagnosticada como CCHNP han de cumplirse los criterios consensuados de Amsterdam y modificados en 1998: al menos tres miembros de la familia (con relación de primer grado) en dos generaciones consecutivas han de haber presentado CCR ó alguno de los tumores relacionados con el síndrome. Al menos uno de los afectados ha de haber sido diagnosticado antes de los 50 años de edad. Poliposis adenomatosa debe haber sido excluido⁽³⁾.

Más del 60% de los tumores del CCHNP presentan inestabilidad de microsatélites como síntoma inequívoco de defectos en la reparación del DNA de tipo mismatch. Mutaciones en los genes reparadores MLH1, MSH2 mayoritariamente, MSH6 con menor frecuencia y PMS2 ó PMS1 en raras ocasiones son causantes del CCHNP⁽⁴⁾.

Los estudios genéticos para la detección de mutaciones en genes de alta penetrancia para cáncer comenzaron a ser abordados en el ámbito clínico hacia la segunda mitad de la década de los '90. Actualmente en nuestro país viene siendo una práctica habitual en la mayoría de Comunidades Autónomas. En el año 2005 se inició el programa de Cáncer Hereditario en la Comunidad Autónoma Valenciana que facultó a diferentes centros de referencia en el manejo especializado de las familias con cáncer hereditario.

La aproximación para el diagnóstico genético utilizada en la mayoría de casos, comprende la secuenciación de la región codificante y zonas de unión intrón-exón de los genes MLH1, MSH2 y MSH6. Además, también se contempla el estudio de reordenamientos genéticos; mayoritariamente grandes deleciones; mediante la técnica de MLPA^(5,6).

Desde un punto de vista clínico, las variantes genéticas identificadas en estos estudios se han venido clasificando en:

a) **Mutaciones deletéreas con carácter patogénico**, que generalmente cursan con la generación de proteínas aberrantes. Éstas, pueden ser consecuencia de mutaciones puntuales sin sentido, pequeñas inserciones y deleciones que alteran el patrón de lectura, mutaciones que afectan a zonas del procesamiento del RNA o grandes reordenamientos genéticos.

b) **Polimorfismos**, en los que se asume un papel neutral desde el punto de vista del riesgo a la enfermedad.
 c) **Variantes con relevancia clínica incierta o no clasificadas (UV)**. Frecuentemente se trata de sustituciones de nucleótidos que implican cambios en la secuencia de aminoácidos en la proteína.

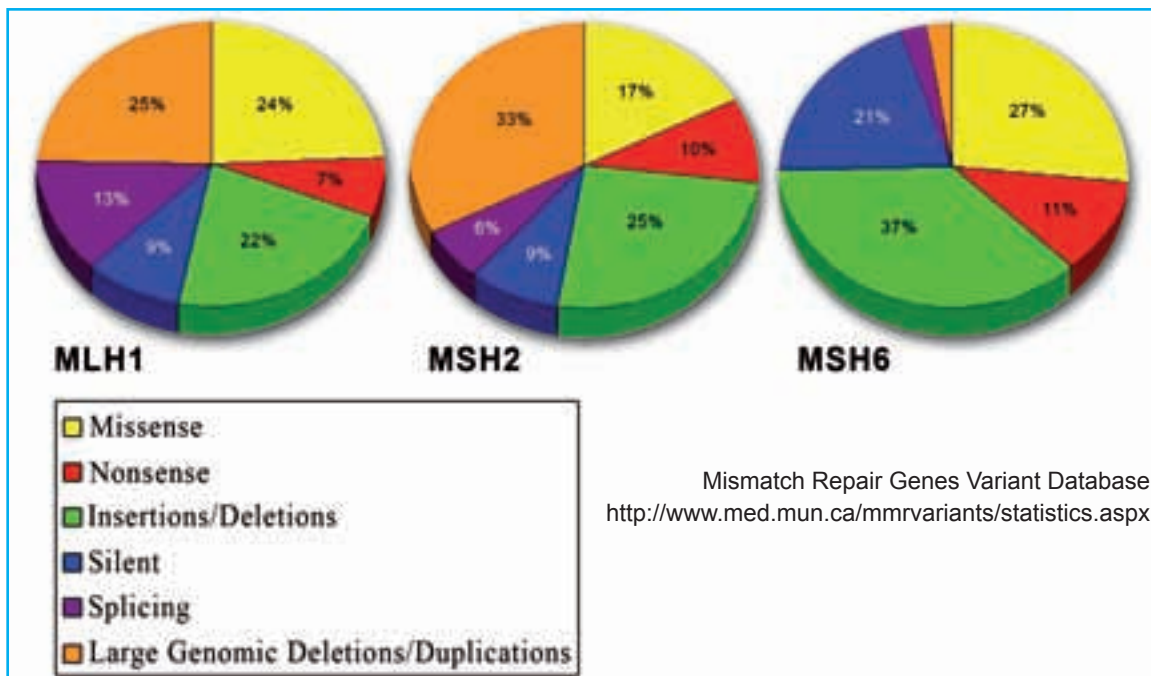
Esta última categoría de variantes genéticas plantea evidentes problemas en la práctica del consejo genético. Las variantes de las que se carece de información suficiente para poder determinar su relación causal con el síndrome, han de ser considerados de la misma forma que un resultado no informativo; donde no se encuentra mutación patogénica alguna en el rastreo de los genes implicados. En consecuencia, no se pueden ofrecer tests predictivos a los familiares a riesgo, y todos ellos han de ser considerados como de alto riesgo con vistas a medidas de vigilancia y profilaxis.

Para el caso de los genes BRCA1 y BRCA2 en el cáncer de mama y ovario hereditario, las llamadas variantes no clasificadas suponen aproximadamente la mitad de todas las variantes únicas detectadas (excluyendo los polimorfismos) (ver Breast Cancer Information Core Database: BIC).

Actualmente, desconocemos la dimensión real del problema de las UV en el síndrome que nos ocupa. Nuestros datos indican que aproximadamente el 25% de las variantes genéticas únicas que se detectan en los estudios; una vez excluidos los polimorfismos; corresponden precisamente a UV.

Desde un punto de vista genético, los tipos y frecuencias de las variantes descritas hasta el momento en los genes MLH1, MSH2 y MSH6 se representan gráficamente en la **Figura 1**:

Figura 1:



Al inicio del presente estudio, la información recogida en las bases de datos públicas disponibles de variantes genéticas para el síndrome de Lynch, estaba fragmentada y no se consignaban las variantes de significado desconocido como grupo diferenciado, ni existía un consenso para el análisis de estas UV. En los últimos dos años, se han ido produciendo una serie de avances que han permitido sentar las bases para la estandarización en la clasificación de estas variantes de significado clínico desconocido:

- La creación de un grupo de trabajo de expertos para el estudio de variantes genéticas no clasificadas en el seno de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC Unclassified Variants Working Group) que ha consensuado la estrategia de análisis, estudio y clasificación de estas UV integrando diferentes líneas de información (7-15). Se ha propuesto una clasificación de las variantes genéticas en cinco grupos (Tabla 1). Los fundamentos y consecuencias clínicas de este nuevo sistema de clasificación se detallan en Plon et al, 2008 (10).

Tabla 1

Clase #	Clasificación (nomenclatura abreviada)	Probabilidad patogenicidad*
1	Neutral (-)	<0.1%
2	Probablemente neutral (-?)	0.1-5%
3	Desconocida (?)	5-95%
4	Probablemente patogénica (+?)	95-99%
5	Patogénica (+)	>99% probabilidad

*La probabilidad de patogenicidad se obtiene calculando el LR global (likelihood ratio: OR de causalidad) como producto de los LR individuales para cada una de las líneas de evidencia¹³.

Las líneas de evidencia que se contemplan desde el grupo de expertos son 13:

Tabla 2

Líneas de evidencia	
Evidencia genética directa	Evidencia indirecta
Frecuencias en casos y controles	Estudio <i>in silico</i> : Conservación del cambio entre especies Severidad del cambio de aa Predicción de splicing aberrante
Co-ocurrencia con mutaciones deletéreas	Estudios funcionales
Consegregación con la enfermedad en los pedigris	Clasificación patológica
Historia Familiar	

- Recientemente, se ha procedido a la integración de las tres bases de datos de variantes genéticas asociadas al síndrome de Lynch:

1. International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors: <http://www.insight-group.org/>
2. Mismatch Repair Genes Variant Database: <http://www.med.mun.ca/MMRvariants/>
3. Mismatch repair gene unclassified variants database (University of Groningen): <http://www.mmmisense.info/>.

La nueva base de datos forma parte de la Leiden Open

Variation Database (LOVD) y se accede desde la página de web de InSiGHT: <http://www.insight-group.org/mutations>. Esta nueva base de datos aglutina toda la información conocida sobre cada una de las variantes que en ella se recogen, incluyendo estudios caso-control, análisis funcionales, *in silico*, etc..., así como las referencias bibliográficas. Se convierte así en la herramienta de consulta de referencia obligatoria para este síndrome.

- La creación y puesta en marcha del Human Variome Project (<http://www.humanvariomeproject.org>) como iniciativa global para coleccionar y depurar la información concerniente a las variaciones genéticas que se asocian a enfermedad (16).

Este nuevo escenario, nos ha obligado a adaptar el proyecto inicial a los nuevos avances. En este sentido, hemos asumido el modelo global de clasificación propuesto recientemente por el IARC Unclassified Variants Working Group (Tabla 1). Las líneas de evidencia contempladas en el proyecto inicialmente engloban todas las propues-

tas por la IARC, a excepción de los estudios funcionales con modelos in vitro (Tabla 2). Los resultados obtenidos, fruto del presente trabajo son compartidos con el grupo de trabajo en UV de la IARC con objeto de consolidar la solidez de la información para la clasificación de las variantes genéticas.

Material y Métodos

Sujetos a estudio:

Familias con sospecha de síndrome de Lynch remitidos a las Unidades de Consejo Genético en Cáncer de los Hospitales Universitarios de La Fe y Elche que cumplen criterios de estudio genético 17. Se incluyeron en el estudio aquellas familias que presentaban variantes no clasificadas (n=17) así como otras con mutaciones patogénicas puntuales y polimorfismos de tipo missense que se utilizaron como controles (n=5). El período de reclutamiento de casos abarca entre Abril del 2005 hasta Marzo del 2009.

Variantes genéticas a estudio:

Tras el rastreo de mutaciones rutinario en los casos índice de familias con sospecha de síndrome de Lynch (genes MLH1, MSH2 y MSH6); se consideraron variantes de significado clínico desconocido o sin clasificar -objeto de estudio del presente proyecto- a todas aquellas variantes genéticas de tipo sustitución de nucleótido simple que ori-

gine un cambio de aminoácido (missense), en las que no haya sido demostrada su patogenicidad.

En el presente trabajo se han analizado un total de 16 variantes genéticas no clasificadas correspondientes a 17 familias aparentemente no relacionadas, que han sido analizadas en el laboratorio de Genética Molecular del Hospital General Universitario de Elche dentro del Programa de Cáncer Hereditario de la Comunidad Valenciana (Tabla 3a).

Además, se analizaron otras cinco variantes genéticas con significado conocido a modo de control. Tres de ellas clasificadas como mutaciones patogénicas, y otras dos como polimorfismos neutrales (Tabla 3b).

Previamente a su entrada en el estudio, todos los individuos: casos índice, y familiares a riesgo, firmaron el preceptivo consentimiento informado.

Tabla 3: Descripción de las variantes genéticas incluidas en el estudio:

a) Variantes genéticas no clasificadas.

Gen	Exón	Nom. Prot.	Historia Familiar	MSI
MLH1	3	p.Thr82Ala	BG	MSI+
MLH1	9	p.Gly244Asp	ACII	MSI+
MLH1	12	p.Ser406Asn	ACII	
MLH1	12	p.Ser406Asn	BG	MSI+
MLH1	10	p.Arg265Cys	BG	MSI+
MLH1	16	p.Lys618Ala	BG	MSI+
MLH1	16	p.Lys618Ala	BG	MSI+
MLH1	16	p.Leu622His	BG	MSI+
MSH2	3	p.Ile145Met	ACII	MSI+
MSH2	4	p.Arg243Gln		
MSH2	6	p.Gly322Asp	ACII	
MSH2	10	p.Ile544Thr	ACII	
MSH2	6	p.Pro349Ala	ACII	MSI+
MSH6	2	p.Ser144Ile	ACII	MSI+
MSH6	4	p.Val480Glu	ACII	MSI+
MSH6	4	p.Val878Ala	ACII	MSI+
MSH6	4	p.Pro462Leu	ACII	
MSH6	2	p.Leu95Val	ACII	MSI+

b) Variantes genéticas clasificadas.

Clasificación	Gen	Exón	Nom. Prot.	cDNA	Historia Familiar	MSI
MUTACIÓN	MLH1	2	p.Gly67Arg	c.199G>A	ACII	
MUTACIÓN	MLH1	15	p.Ser577Ser	c.1731G>A	ACII	MSI+
MUTACIÓN	MLH1	4	p.Thr117Met	c.353C>T	ACII	
POLIMORFISMO	MLH1	8	p.Ile219Val	c.655A>G	BG	MSI+
POLIMORFISMO	MSH6	1	p.Gly39Glu	c.116G>A	ACII	MSI+

BG se cumplen criterios de Bethesda para análisis de inestabilidad de microsatélites. ACII: la familia cumple criterios de Amsterdam II. MSI: inestabilidad de microsatélites.

Líneas de evidencia:

1. Frecuencia en casos y controles: Las variantes genéticas a estudio son sometidas a estudio caso-control con tres grupos: 500 casos de CCR esporádico, 500 controles sanos y 75 individuos con sospecha de síndrome de Lynch. Este estudio se lleva a cabo mediante plataformas Sequenom (Genoma España).

2. Co-ocurrencia con mutaciones deletéreas: Todos los casos incluidos en el estudio fueron analizados por PCR y secuenciación directa de la secuencia codificante completa y uniones intron-exon de los genes MLH1, MSH2 y MSH6, para la detección de mutaciones puntuales. Asimismo, se abordó el estudio de grandes reordenamientos (insecciones y deleciones) mediante MLPA de estos mismos genes.

3. Co-segregación con la enfermedad en pedigrís: Los familiares relacionados con el caso índice, tanto sanos como afectados de cáncer, son analizados con objeto de establecer su estatus como portadores de la variante en cuestión. Con la información del genotipado de la variante en cada miembro de la familia y su relación con el caso índice, se calcula el factor de Bayes de causalidad, cuantificando de forma relativa la probabilidad de que la variante sea de tipo causal frente a la probabilidad de que sea neutral 18,19.

4. Historia Familiar: Todas las familias analizadas cumplen criterios de estudio genético. Se aplican los criterios de Bethesda modificados y los de Amsterdam II para determinar la historia familiar de cáncer 16.

5. Análisis in silico:

• **SNPs3D:** www.SNPs3D.org
Utiliza el Support Vector Machine (SVM score) y datos de 15 parámetros basados en la estructura de la proteína y 5 parámetros basados en alineamiento de secuencias para analizar las sustituciones. Valores SVM negativos indican variante deletérea, mientras que valores positivos indican variantes neutras. Valores entre -0.5 y +0.5 tienen un reducido valor predictivo.

• **PolyPhen:** <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>
Se basa en la toma de decisión que combina un número de atributos de la estructura de proteínas con un alineamiento

de secuencias filogenético prediseñado que incluye solamente especies de mamífero. Calcula el PSIC score para cada sustitución de nucleótidos introducida. Provee una clasificación binaria sobre la trascendencia funcional estimada en la proteína (tolerada / afecta a la función de la proteína), además de la mediana de conservación de la secuencia en el alineamiento.

• Predicción de splicing aberrante:

Los diferentes modelos de predicción de splicing utilizan diferentes algoritmos y matrices para identificar sitios de unión intron-exon-intron así como los Exon Splicing Enhancers.

• **ESE Finder:** <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>

• **Rescue ESE:** <http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese>

• **NNSPLICE:** <http://biologyhelp.awardspace.com/desc.php?id=1478&type=biotech>

• **Human Spice Site Finder:** <http://www.umd.be/HSF>

• **PESX:** <http://cubweb.biology.columbia.edu/pesx>

• Análisis experimental de splicing aberrante:

Todas las variantes analizadas fueron analizadas experimentalmente para determinar la presencia de splicing aberrante; y en su caso, caracterizarlo.

Para ello, se aisló RNA total de leucocitos (RNA easy mini kit, and Qiacube system, Qiagen). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo con oligo-dT (Reverse Transcription Reagents and using random primers (Applied Biosystems). Finalmente la reacción de PCR se realizó con sistema de amplificación de fragmentos largos, conteniendo toda la región codificante de cada uno de los genes analizados en uno o dos amplicones (Long Expand PCR System, Roche). Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa.

6. Clasificación patológica:

MSPath: fórmula que -utilizando diferentes variables anatómicas de los tumores colorrectales- calcula la probabilidad de que el tumor sea de origen hereditario ²⁰.

Resultados y Discusión

Decisiones importantes sobre el manejo clínico de síndromes de predisposición a cáncer son tomadas, basándose en el dato de si un individuo es portador o no de una variante patogénica. La existencia de variantes genéticas con un significado clínico desconocido -generalmente sustituciones nucleotídicas de tipo missense- representa un serio problema en la práctica clínica. Es necesario por tanto un abordaje específico, multidisciplinar y multicéntrico, con objeto de poder clasificar adecuadamente dichas variantes. En este contexto se ha desarrollado el presente trabajo.

Prevalencia de las UV: La primera cuestión que se plantea es la dimensión real del problema en cuanto a prevalencia. No existen datos precisos en la bibliografía sobre este aspecto. Nuestros datos, con una experiencia acumulada de cuatro años y un total de 420 familias que cumplían

criterios de estudio detectamos un total de 18 familias con UV. Esto implica que, en nuestro entorno, alrededor del 13% de casos que son sometidos a rastreo genético en MLH1, MSH2 y MSH6 son portadores de una UV (Tabla 4a). Cuando el cálculo lo realizamos en relación a las variantes patogénicas, observamos que el 28% de las variantes genéticas detectadas (excluidos los polimorfismos) son UV (Tabla 4b). Del total de variantes patogénicas detectadas, únicamente tres fueron mutaciones de tipo missense. En consecuencia, el 86% (18/21) de las variantes de tipo missense encontradas (excluyendo los polimorfismos) son no clasificables.

Se trata sin duda de un número no despreciable de familias, cuyos miembros, no pueden ser beneficiarse de una estimación precisa de riesgo.

Tabla 4a

	n	(%) ¹ ;	(%) ²
Cumplen criterios*	420		
Rastreo mutaciones	138	(32.8%) ¹	
Identificación mutaciones	46	(10.9%) ¹	(33.3%) ²
Identificación de UV	18	(4.3%)¹	(13%)²

* Cumplen al menos, criterios de Bethesda 1 % sobre el total de casos que cumplen criterios. 2 % sobre el total de casos que han sido sometidos a rastreo de mutaciones.

Tabla 4b

	Variantes	patogénicas	no clasificadas
MLH1	24	16 (67%)	8 (33%)
MSH2	23	17 (76%)	5 (24%)
MSH6	18	13 (72%)	5 (28%)
total	64	46 (72%)	18 (28%)

De las variantes estudiadas en el presente trabajo, cuatro no están recogidas en la base de datos del InSiGHT (MLH1: Thr82Ala; MSH2: Ile544Thr; MSH2: Pro349Ala y MSH6: Pro462Leu). Las restantes aparecen en la citada base de datos, pero su patogenicidad sigue aún en debate (Tabla 6). Un caso presentaba dos UV simultáneamente (MSH2: Arg243Gln y Gly322Asp). Dos de las UV en estudio fueron recurrentes en nuestra serie, habiéndose presentado cada una de ellas, en dos familias independientes (MLH1: Ser406Asn; MLH1: Lys618Ala).

Historia Familiar: Once de las 17 familias portadoras de UV cumplen criterios de Ámsterdam II, lo que indica una carga familiar importante de cáncer asociado al síndrome

de Lynch. Las restantes seis familias cumplen criterios de Bethesda modificados y presentan inestabilidad de microsatélites (Tabla 3A).

Co-ocurrencia de mutaciones patogénicas en casos en los que se ha detectado UV: Cuatro de los casos analizados presentaban simultáneamente mutaciones patogénicas en heterocigosis (de tipo frameshift). Todos estos casos cumplen criterios de Ámsterdam II (Tabla 5). No se han abordado estudios moleculares sobre el origen alélico, para establecer si las UV y las mutaciones patogénicas en cada uno de los casos, proceden del mismo progenitor. No obstante, en el análisis de las historias familiares de cáncer de estos cuatro casos, se puede precisar la rama de la familia de

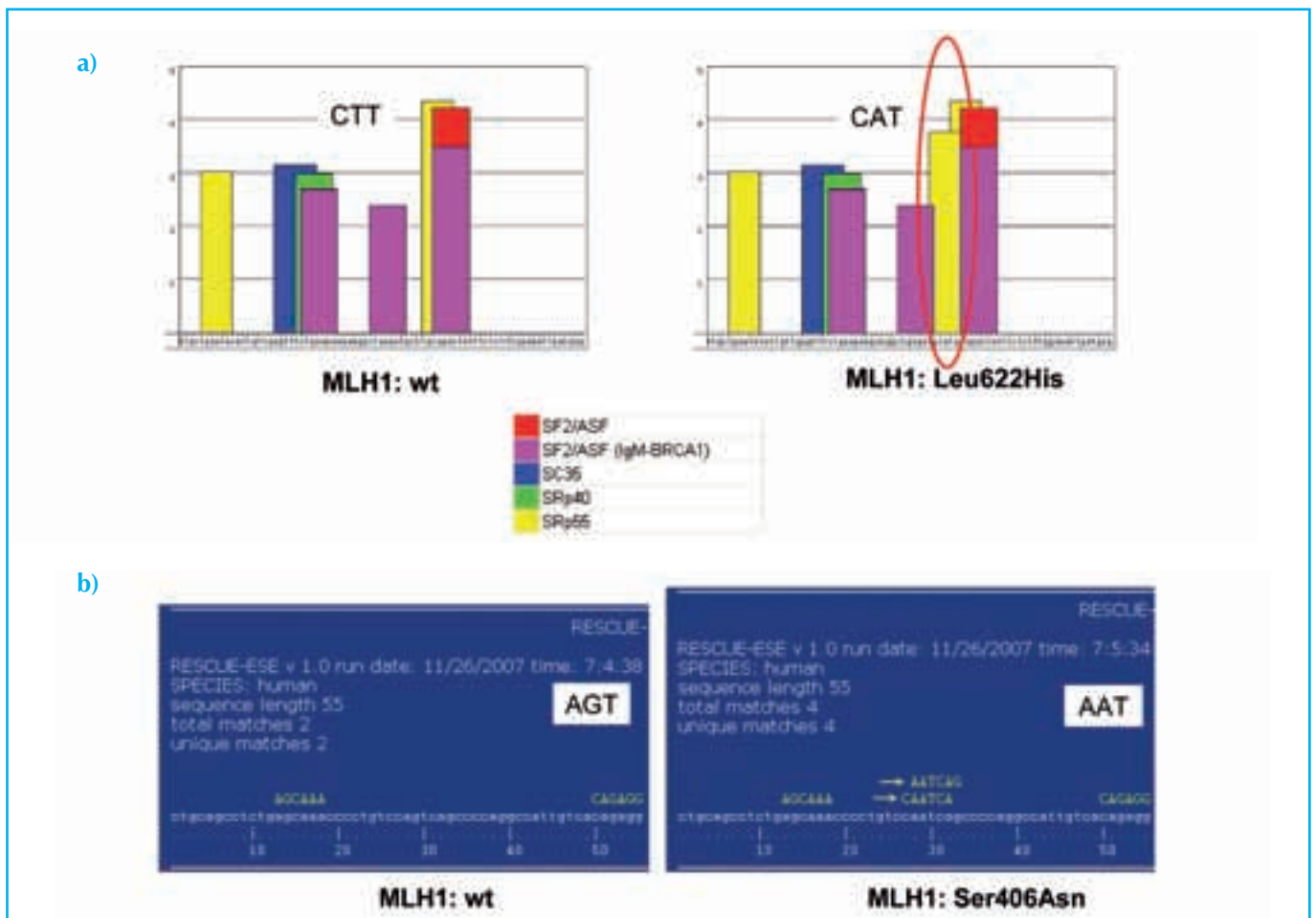
la que procede el riesgo, lo que sugiere que en cualquier caso, la variante patogénica es la responsable del síndrome, y la UV puede ser considerada neutral.

Análisis in silico: En el análisis combinado de los modelos de predicción de patogenicidad utilizados; en los que se integran diferentes algoritmos y matrices que tienen en cuenta aspectos estructurales de las proteínas y conservación evolutiva de las secuencias (SNPs3D y Polyphen), se observa en general, un comportamiento homogéneo con cinco UVs en el que ambos modelos predicen patogenicidad y dos UVs en el que ambos predicen neutralidad. En el resto de variantes, alguno de los modelos presenta resultados no valorables o dudosos. De los siete casos en el que hay coincidencia en la predicción in silico, cuatro son los que presentan co-ocurrencia de mutación patogénica. Es interesante destacar el hecho de que la predicción de dos de estos casos de UV con mutación patogénica concurrente resultó con efecto deletéreo. En las otras dos, el resultado de la predicción fue neutral. Se pone en evidencia claramente la limitación del uso de estos modelos in silico para la clasificación de las UV (Tabla 5). En el análisis por SNPs3D y Polyphen de las variantes utilizadas como control se observó, no obstante, una coherencia de resultados:

las dos mutaciones patogénicas missense que resultaron valorables, tenían una predicción de variantes deletéreas por ambos modelos, mientras que la predicción del único SNP valorable, resultó neutral.

La generación de un splicing aberrante es un fenómeno que inevitablemente conduce a un efecto deletéreo en la función de estas proteínas en la gran mayoría de los casos. Las UV podrían estar potencialmente implicadas en estos fenómenos. Se abordó este análisis con una estrategia en dos pasos. Primeramente, se utilizaron cinco modelos diferentes de predicción de splicing a modo de cribado. La predicción de una teórica alteración en el procesamiento del mRNA; por al menos uno de los modelos utilizados, nos obligaba a su confirmación empírica. Dicha confirmación experimental se llevó a cabo mediante análisis de los fragmentos de cDNA generados de cada uno de los casos en cuestión. El resultado de los análisis in silico sobre el splicing muestra una patente heterogeneidad entre los diferentes modelos utilizados. Todas las variantes mostraban, en al menos un modelo, sospecha de splicing anómalo (Tabla 5a; Figuras 2a y 2b). Algo muy similar, sucede con las UVs utilizadas como control (Tabla 5b).

Figura 2: Predicción in silico del splicing. **a)** ESE Zinder: MLH1, Leu622His. **b)** Rescue ESE: MLH1, Ser460Asn



No obstante, el análisis experimental demostró la ausencia de anomalías en el splicing en todos los casos (Tabla 5). Estos datos ponen en evidencia la limitación real de la información que aportan estos modelos de predicción de splicing. En general, la implicación de una UV en un procesamiento aberrante de mRNA es sinónimo de variante deletérea; si bien es cierto que este mecanismo de patogenicidad en variantes missense es poco frecuente. En nuestra experiencia, la utilidad de estos modelos como cribado de sospecha de splicing anómalo ha resultado ser completamente nula.

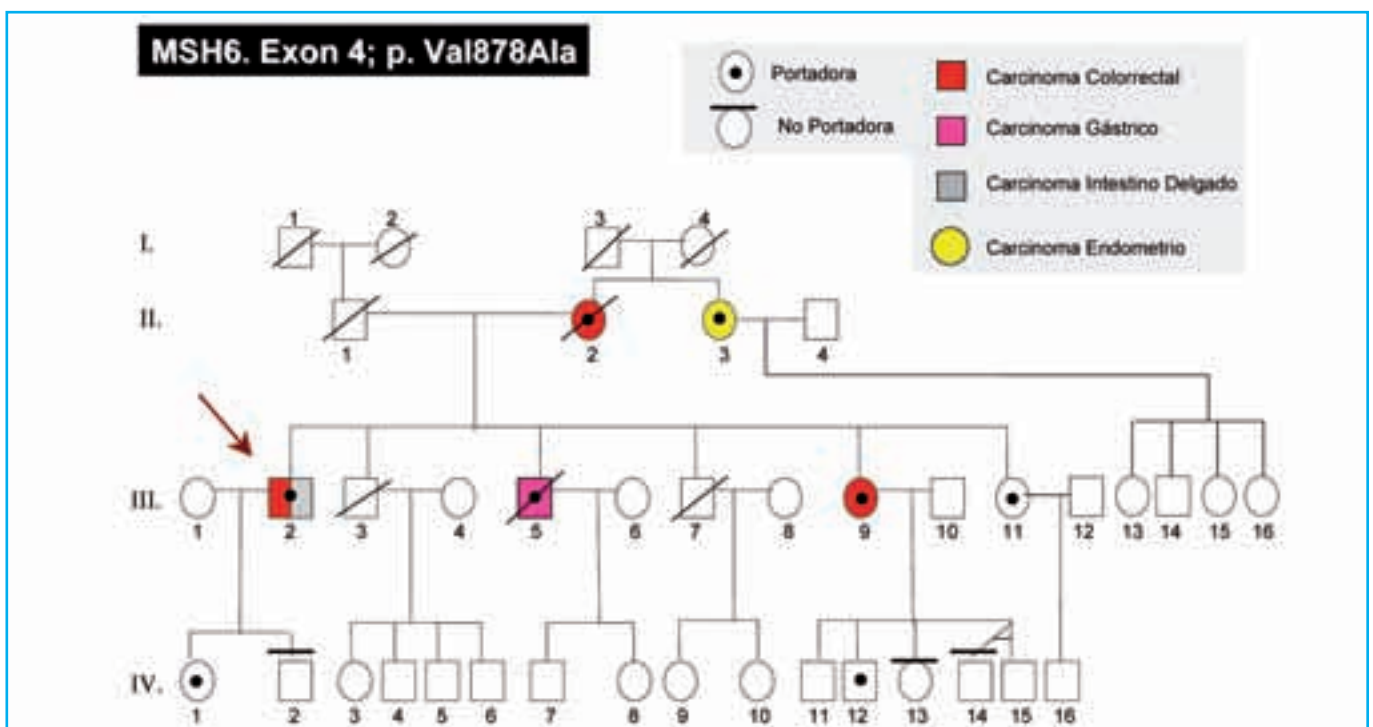
Co-segregación: En el abordaje de los estudios de co-segregación, los datos obtenidos hasta la fecha, son del todo insuficientes para poder sacar ningún tipo de conclusión en la mayoría de los casos. Se han analizado un total de 40 familiares pertenecientes a 12 familias con UV (rango entre 1 y 10 familiares). La mayor dificultad en estos estudios estriba en la disponibilidad de los familiares para su estudio. Es cada vez más frecuente encontrarse con familias con un número de individuos muy limitado; muy dispersadas geográficamente; sin individuos afectados vivos; con familiares disponibles pero demasiado jóvenes como para ser informativos para nuestro objetivo; o simplemente, reacios a participar en el estudio genético.

En la Figura 3 se muestra el caso de la familia con la variante en MSH6: p.Val878Ala, en la que se han analizado un total de 10 familiares. Esta familia cumple criterios de Ámsterdam II. En el rastreo de mutaciones puntuales y grandes reordenamientos en los genes MLH1, MSH2 y MSH6, el único hallazgo destacable fue la citada UV. Los cinco in-

dividuos afectados de cáncer son portadores de la variante, mientras que otros tres familiares no afectados son también portadores. Estos tres portadores sanos tienen actualmente menos de 40 años, por lo que la información que aportan es reducida. Lo mismo ocurre con los tres individuos no portadores de la cuarta generación. Globalmente, en el análisis de los datos de segregación de la variante con la enfermedad en esta familia, podemos considerar que la probabilidad de que la variante sea patogénica versus neutral es de aproximadamente 32:1. La información que aporta los estudios in silico sobre esta variante es poco determinante. No se observa la generación de ninguna forma anómala de splicing. Por otro lado, esta variante está recogida en la base de datos de SNP con rs2020912 con una frecuencia alélica de 0.008 en población europea. Barnetson et al (2008)²¹ clasifican esta variante como polimórfica basándose en un estudio caso control con 2000 individuos genotipados, si bien en la base de datos del InSiGHT sigue apareciendo como UV. Tomando en consideración todos los datos expuestos, no podemos clasificar esta variante objetivamente sin asumir un riesgo considerable. Por consiguiente, continuamos con la misma incertidumbre que al inicio del estudio, y consideramos la variante como de significado clínico desconocido.

Este caso es un claro ejemplo de la necesidad absoluta de integrar la mayor cantidad de información para minimizar la incertidumbre inherente en estas UV. Es importante tener información sobre co-segregación de esta misma variante en el mayor número de familias posible, así como establecer estudios poblacionales con mayor número de individuos.

Figura 3:



En estos momentos estamos a la espera de recibir los resultados de genotipado de las variantes genéticas a estudio en 500 casos de CCR esporádico, 500 controles sanos y 75 individuos con sospecha de síndrome de Lynch. Este estudio nos puede aportar una información útil y directa de la asociación de cada variante con el riesgo a cáncer. La gran limitación de estos estudios es su poder estadístico reducido cuando la variantes son raras. En estos casos frecuentes sería necesaria una $n > 10.000$ para obtener resultados sólidos.

Asimismo, se está procediendo a la valoración anatomopatológica de los tumores por dos patólogos para calcular el índice MSpPath. Esta información también puede contribuir a un mejor conocimiento en el comportamiento clínico de las variantes.

Considerando conjuntamente la información obtenida en este trabajo e integrándola con el conocimiento

acumulado previamente, podemos concluir clasificando como patogénicas las cuatro variantes que se presentan simultáneamente con mutaciones patogénicas. Los datos de co-segregación de la variante MSH6: p.Val878Ala con la enfermedad en nuestra familia confieren un peso suficiente para ser considerada como probablemente patogénica. El resto de variantes analizadas, no presentan evidencia suficiente para ser clasificadas (Tabla 6). Esto significa que un 31% de las variantes con significado clínico desconocido (5/16), han sido debidamente clasificadas con los criterios establecidos. Este dato no es del todo decepcionante si consideramos por ejemplo, que en un estudio con un planteamiento similar, donde se intentaba clasificar un total de 196 variantes con significado desconocido en genes BRCA1 y 2, detectaron un total de 29 variantes claramente patogénicas (14.8%), mientras que las 167 restantes permanecieron como UV (resultados no publicados, comunicados en el III Congreso del InSiGHT, 2009).

Tabla 6

Gen	Exón	Nom. Prot.	Historia Familiar	MSI
MLH1	3	p.Thr82Ala	NR	?
MLH1	9	p.Gly244Asp	?	?
MLH1	10	p.Arg265Cys	?	?
MLH1	12	p.Ser406Asn	?	?
MLH1	16	p.Lys618Ala	?	?
MLH1	16	p.Leu622His	?	?
MSH2	3	p.Ile145Met	?	-
MSH2	4	p.Arg243Gln	?	?
MSH2	6	p.Gly322Asp	?	?
MSH2	6	p.Pro349Ala	?	-
MSH2	10	p.Ile544Thr	NR	-
MSH6	2	p.Leu95Val	NR	?
MSH6	2	p.Ser144Ile	?	?
MSH6	4	p.Val480Glu	NR	?
MSH6	4	p.Val878Ala	?	?+
MSH6	4	p.Pro462Leu	?	-

NR: no reportada. ?: variante de significado clínico desconocido. ?+: variante probablemente patogénica.

Las conclusiones fundamentales que trascienden de este tipo de trabajo, es la imperiosa necesidad de establecer 1) un sistema de consenso de las líneas de evidencia a considerar, 2) la forma de evaluarlas, 3) la centralización de toda la información generada en una base de datos única y pública; y 4) el consenso sobre las medidas de seguimiento clínico en cada una de las situaciones ^{7,10,12,14}. Afortunadamente, en los dos últimos

años hemos vivido el nacimiento de una iniciativa sólida en este sentido a través del grupo de trabajo en UV de la IARC, y promocionado por la InSiGHT. Es necesario por consiguiente, una colaboración activa de todos los grupos que trabajan en este campo para lograr rápidos avances en la minimización de la incertidumbre que ocasionan las UV para un mejor manejo clínico de las familias con riesgo de cáncer.

Bibliografía

1. Piñol V, Andreu M, Castells A, et al. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicentre, prospective, nationwide study. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* 2004. 16(1): 39-45.
2. Lynch HT. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cytogenet Cell Genet* 1999. 86: 130-135.
3. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999. 116: 1453-1456.
4. Peltomaki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition. Update of the ICG_HNPCC/INSIGHT mutation database. *Dis. Markers* 2004. 20(4-5): 269-76.
5. Wijnen J, van der Klift, Vasen H, et al. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat. Genet.* 1998. 20: 326-328.
6. Plaschke J, Rüschof H, Schackert HK. Genomic rearrangements of MSH6 contribute to the genetic predisposition in suspected hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *J Med Genet* 2003 40: 597-600.
7. Ou J, Niessen RC, Vonk J, Westers H, Hofstra RMW, Sijmons RH. A Database to Support the Interpretation of Human Mismatch Repair Gene Variants. *Human Mut* 2008; 29(11),1337-134.
8. Hofstra RMW, Spurdle AB, Eccles D, Foulkes WD, de Wind N, Hoogerbrugge N, Hogervorst FBL, for the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Tumor Characteristics as an Analytic Tool for Classifying Genetic Variants of Uncertain Clinical Significance. *Human Mut.* 2008; 29(11),1292-1303.
9. Tavtigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A. Classification of Rare Missense Substitutions, Using Risk Surfaces, With Genetic- and Molecular-Epidemiology Applications. *Human Mut.* 2008; 29(11),1342-1354.
10. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes, WD, Genuardi M, Greenblatt MS, Hogervorst FBL, Hoogerbrugge N, Spurdle AB, Tavtigian V, for the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Sequence Variant Classification and Reporting: Recommendations for Improving the Interpretation of Cancer Susceptibility Genetic Test Results. *Human Mut.* 2008; 29(11),1282-1291.
11. Tavtigian SV, Greenblatt MS, Lesueur F, Byrnes GB, for the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. In Silico Analysis of Missense Substitutions Using Sequence-Alignment Based Methods. *Human Mut.* 2008; 29(11),1327-1336.
12. Greenblatt MS, Brody LC, Foulkes WD, Genuardi M, Hofstra RMW, Olivier M, Plon SE, Sijmons RH, Sinilnikova O, Spurdle AB, for the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Locus-Specific Databases and Recommendations to Strengthen Their Contribution to the Classification of Variants in Cancer Susceptibility Genes. *Human Mut.* 2008; 29(11),1273-1281.
13. Goldgar DE, Easton DF, Byrnes GB, Spurdle AB, Iversen ES, Greenblatt MS, for the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Genetic Evidence and Integration of Various Data Sources for Classifying Uncertain Variants Into a Single Model. *Human Mut.* 2008; 29(11),1265-1272.
14. Tavtigian SV, Greenblatt MS, Goldgar DE, Boffetta P, for the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Assessing Pathogenicity: Overview of Results from the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. *Human Mut.* 2008; 29(11),1261-1264.
15. Couch FJ, Rasmussen LJ, Hofstra R, Monteiro ANA, Greenblatt MS, de Wind N, for the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Assessment of Functional Effects of Unclassified Genetic Variants. *Human Mut.* 2008; 29(11),1314- 326.
16. Editorial. What is the Human Variome Project? *Nat Genet.* 2007; 39, 423.
17. Comité Editorial : Bolufer P, et al. Guía de práctica clínica en cáncer hereditario. Generalitat Valenciana. Consellería Sanitat. 2008 (ISBN: 978-84-482-4988-5).
18. Petersen G, Parmigiani G, Thomas. Missense mutations in disease genes: a Bayesian approach to evaluate causality. *Am. J. Hum. Genet* 1998. 62:1516-1524.
19. Thompson D, Easton DF, Goldgar DE. A full-likelihood method for the evaluation of causality of sequence variants from family data. *Am. J. Hum. Genet* 2003. 73:652-655.
20. Jenkins M, Hayashi S, O'Shea AM, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007. 133:48-56.
21. Barnetson RA, Cartwright N, van Vliet A, et al. Classification of ambiguous mutations in DNA mismatch repair genes identified in a population-based study of colorectal cancer. *Hum. Mut.* 2008; 29(3):367-374.