

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



# **VNiVERSiDAD D SALAMANCA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO CLÍNICO Y GENÉTICO EN CARCINOMA  
BASOCELULAR ESPORÁDICO Y ASOCIADO A SÍNDROME DE  
GORLIN**

Irene Palacios Álvarez

**DIRECTORES**

Dr. D. Rogelio González Sarmiento

Dra. Dña. Emilia Fernández López

2016



El **Dr. D. Rogelio González Sarmiento**, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y la Dra. **Dña. Emilia Fernández López**, Profesora Asociada del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado “Estudio clínico y genético en carcinoma basocelular esporádico y asociado a síndrome de Gorlin”, que presenta la licenciada en Medicina Dña. Irene Palacios Álvarez ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Medicina y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 15 de Enero de 2016.

Dr. D. Rogelio González Sarmiento

Dra. Dña. Emilia Fernández López



## AGRADEMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido directa e indirectamente en esta tesis doctoral, y sin las cuales este trabajo no habría sido posible.

A la Fundación Rodríguez Pascual, por la beca de investigación con la que se ha financiado este proyecto, y sin la cual este trabajo no habría podido llevarse a cabo.

A Rogelio González, director de esta tesis doctoral, por su dedicación, por la confianza depositada en mí y por haberme brindado la oportunidad de llevar a cabo este estudio.

A Emilia Fernández, codirectora de esta tesis doctoral, por su apoyo en todo momento, su generosidad y su cariño. No sólo por haberme enseñado dermatología en estos años, sino también por ayudarme a llevar a cabo mis metas.

A Juan Luis García, por su ayuda con el CGH array y la interpretación de los datos, así como por su accesibilidad.

A los integrantes del Laboratorio de Medicina Molecular de la Universidad de Salamanca, y especialmente a Elena Bueno, por instruirme en la metodología de las técnicas empleadas en esta tesis, por su disponibilidad para responder a todas mis dudas, y sobre todo por su amabilidad y su amistad, que han hecho más liviano el trabajo duro de laboratorio.

A Alejandro Palacios, por su ayuda con las ilustraciones y la maquetación de este trabajo, por su paciencia, su esfuerzo y disponibilidad. Por tener siempre un pensamiento positivo y ayudarme a encontrar el camino.

A Teresa Usero y Laura Arango, por haberme ayudado de todas las formas posibles en este proyecto, sus mensajes de ánimo y por su amistad incondicional. Por haberme

ayudado a crecer profesional y personalmente, y por muchas otras cosas; ellas saben cuáles son.

A los integrantes del Servicio de Dermatología del Hospital Clínico de Salamanca, por enseñarme dermatología en estos años, por ayudarme en la recogida de muestras, por su interés y sus consejos.

A Ángela Hernández, Carmen Peña, Victoria Nespereira, Maite Bordel y Esther Cardeñoso, por su contribución enviando muestras de sus pacientes.

A los pacientes con carcinoma basocelular esporádico y asociado a síndrome de Gorlin, por su generosa colaboración. Sin ellos este trabajo no tendría sentido.

A mis amigos, tanto de Pamplona como residentes de Salamanca, por todo lo que me aportan en mi vida, y por estar siempre dispuestos a ayudarme y a levantarme el ánimo.

A Mikel, por su refuerzo positivo, su confianza en mí y sus consejos. Por animarme en los días malos y alegrarse conmigo en los buenos.

Y, sobre todo, a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano, por quererme y creer en mí. Por su sacrificio, apoyo incondicional, y por dárme todo para llegar hasta aquí.

*“Si tienes el anhelo de llevar a cabo una investigación científica adquiere el aprendizaje preciso y por todos los medios hazlo. Difícilmente alguna otra cosa te dará tanta satisfacción y, sobre todo, tal sentido de logro”.*

**Severo Ochoa**





# INTRODUCCIÓN

## 1. Generalidades

## 2. Recuerdo histórico

## 3. Epidemiología

3.A. Estudios epidemiológicos poblacionales en carcinomas basocelulares esporádicos

3.B. Epidemiología del síndrome de Gorlin

3.C. Factores de riesgo

3.C.1. Factores de riesgo no modificables

3.C.2. Factores de riesgo modificables

## 4. Patogenia molecular

4.A. Ligandos Hedgehog

4.B. Receptor PTCH1

4.B.1. Estructura del gen PTCH1

4.B.2. Estructura de la proteína PTCH1

4.B.3. Relación de PTCH1 con el ciclo celular

4.B.4. Detección de mutaciones patogénicas en el gen del receptor PTCH1

4.C. Otras proteínas de la vía hedgehog

4.C.1. Smoothened

4.C.2. Familia Gli

4.C.3. SUFU

4.D. Interacción de la vía hedgehog con otras rutas de señalización

5. Características clínicas e histológicas

5.A. Histología y clasificación del carcinoma basocelular

5.B. Factores de riesgo y pronóstico en función de las características del carcinoma basocelular

5.C. Manifestaciones cutáneas y extracutáneas del síndrome de Gorlin. Criterios diagnósticos. Pruebas diagnósticas recomendadas.

5.C.1. Manifestaciones cutáneas

5.C.2. Manifestaciones extracutáneas

5.C.3. Pruebas diagnósticas complementarias y recomendaciones para el seguimiento de pacientes con síndrome de Gorlin

6. Prevención primaria del carcinoma basocelular

7. Tratamiento

7.A. Tratamiento quirúrgico

7.A.1. Técnicas no ablativas

7.A.2. Técnicas ablativas

7.B. Tratamiento no quirúrgico

7.B.1. Quimioterapia tópica

7.B.2. Inmunoterapia t3pica

7.B.3. Terapia fotodin3mica

7.B.4. Radioterapia

7.B.5. Otros tratamientos no quir3rgicos

7.C. Tratamiento sobre la patogenia molecular

7.C.1. Vismodegib

7.C.2. Itraconazol y ars3nico

7.C.3. Formulaciones t3picas

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## OBJETIVOS

## MATERIAL Y M3TODOS

1. Generalidades

2. Seguimiento cl3nico

3. Estudio gen3tico

3.A. Obtenci3n de muestras de DNA

3.A.1. Obtenci3n de muestras de DNA de sangre perif3rica

- 3.A.2. Obtención de DNA a partir de muestras de tumor
- 3.B. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR
- 3.C. Electroforesis en gel de agarosa
- 3.D. Secuenciación del DNA
- 3.E. Análisis bioinformático de las secuencias
- 3.F. Estudio bioinformático del comportamiento teórico de las mutaciones missense no descritas
- 3.G. CGH-array

## RESVLTADOS

- 1. Características generales de los pacientes con síndrome de Gorlin
  - 1.A. Características clínicas
  - 1.B. Estudio del gen PTCH1
    - 1.B.1 Estudio de PTCH1 en sangre periférica
    - 1.B.2 Estudio de PTCH1 en muestra tumoral
- 2. Características generales de pacientes con carcinoma basocelular esporádico
  - 2.A. Características clínicas
  - 2.B. Estudio del gen PTCH1
    - 2.B.1 Estudio de PTCH1 en sangre periférica

2.B.2. Estudio de PTCH1 en muestra tumoral

### 3. Resultados del estudio con ARRAY-CGH

3.A. Análisis de la región 9q22.3

3.A.1. Carcinoma basocelular asociado a síndrome de Gorlin

3.A.2. Carcinoma basocelular esporádico

3.B. Alteraciones recurrentes cuantitativas afectando a un cromosoma entero

3.B.1. Carcinoma basocelular asociado a síndrome de Gorlin

3.B.2. Carcinoma basocelular esporádico

3.C. Alteraciones recurrentes puntuales

3.C.1. Carcinoma basocelular asociado a síndrome de Gorlin

3.C.2. Carcinoma basocelular esporádico

3.D. Análisis de inestabilidad cromosómica

## DISCUSIÓN

1. Características clínicas

1.A. Características clínicas de los pacientes con síndrome de Gorlin

1.B. Características clínicas de los carcinomas basocelulares esporádicos

2. Estudio molecular

2.A. Características moleculares pacientes con síndrome de Gorlin

2.A.1. Estudio de mutaciones puntuales en sangre periférica

2.A.2. Estudio de mutaciones puntuales en muestras tumorales

2.B. Características moleculares de los pacientes con carcinomas basocelulares esporádicos

2.B.1. Estudio de mutaciones puntuales en sangre periférica

2.B.2. Estudio de mutaciones puntuales en muestras tumorales.

2.C. Estudio mediante CGH

**CONCLUSIONES**

**BIBLIOGRAFÍA**







## ABREVIATURAS

- Carcinoma basocelular: CBC
- Ultravioleta: UV
- Síndrome de Gorlin: SG
- Carcinoma epidermoide: CEC
- Cáncer cutáneo no melanoma: CCNM
- Polimorfismos de un solo nucleótido: SNPs
- Ultravioleta A: UVA
- Ultravioleta B: UVB
- Psolarenos y ultravioleta A: PUVA
- Patched-1: PTCH1
- Señalización Hedgehog (vía o ruta): Hh
- Ligandos Hedgehog: LHH
- Sonic Hedgehog: SHH
- Indian Hedgehog: IHH
- Desert Hedgehog: DHH
- Smoothened: SMO
- Suppressor of fused: SUFU
- Dominio sensible a esterol: DSE
- Promotor de la fase M: MPF
- Reacción en cadena de la polimerasa: PCR
- Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación: MLPA

- RNA mensajero: mRNA
- Receptor del factor de crecimiento epidérmico: EGFR
- Factor de crecimiento insulín-like: IGF
- Factor de necrosis tumoral: TNF
- Mammalian target of rapamycin: mTOR
- S6 kinasa 1: S6K1
- Fosfoinosítido-3-quinasa: PI3K
- Cirugía micrográfica de Mohs: CMM
- Terapia fotodinámica: TFD
- 5-fluorouracilo: 5FU
- 5 aminolevulínico: ALA
- Radioterapia: Rxt
- Dodecil sulfato sódico: SDS
- Cloroformo:alcohol isoamílico 24:1: CIAA
- CGH-array: CGH
- Cromosomas artificiales de bacterias: CAB
- Cromosomas artificiales derivados de P-1: CAP
- Indocarbocianina: Cy3
- Indodicarbocianina: Cy5
- Hibridación in situ con fluorescencia: FISH





# INTRODVCCIÓN



# INTRODUCCIÓN

### 1. GENERALIDADES

El carcinoma basocelular (CBC) es un tumor de piel que se caracteriza por su crecimiento lento, con mínima afectación de tejidos blandos y una alta tasa de curación tanto con tratamiento quirúrgico como no quirúrgico.<sup>1</sup> Es el tumor más común en la población caucásica,<sup>2,3,4</sup> con tasas de incidencia y prevalencia variables según poblaciones.<sup>5</sup> Constituye aproximadamente el 80% de los cánceres cutáneos no melanoma,<sup>4</sup> con un riesgo de desarrollo durante la vida de aproximadamente el 30% en la población caucásica.<sup>3,1</sup>

El factor de riesgo principal para su desarrollo es la exposición a la luz ultravioleta (UV), pero existen otros predisponentes como el fototipo, la exposición a agentes tóxicos, la presencia de genodermatosis y la inmunosupresión.<sup>4</sup> Aunque la mayor parte de los CBC ocurren en individuos sanos, existen genodermatosis que se asocian con una incidencia mayor de este tumor y en edades más tempranas. Entre todas ellas, este trabajo se centra principalmente en el síndrome de Gorlin (SG) (ONIM: 109400), una enfermedad autosómica dominante que asocia a la aparición de CBC, entre otros, queratoquistes odontogénicos y pits palmoplantares.<sup>3</sup>

### **2. RECUERDO HISTÓRICO**

El CBC fue descrito por primera vez por Jacob en 1824.<sup>6</sup> El término “carcinoma basocelular” (en alemán “Basalzellkrebs”) fue acuñado en 1903 por Krompecher, debido a la semejanza histológica de sus células con las de la capa basal de la epidermis.<sup>7</sup>

Los hallazgos más antiguos de la existencia del SG corresponden al Antiguo Egipto, al descubrirse dos momias pertenecientes al Periodo Dinástico (3000-2575 A.C) con cambios óseos característicos.<sup>8</sup> La primera referencia al SG data de 1894, cuando Jarish y White comunicaron un caso de un paciente con CBC múltiples, escoliosis y dificultades en el aprendizaje.<sup>9,10</sup> La primera descripción de esta entidad como un síndrome autosómico dominante fue realizada en 1960 por Gorlin y Goltz, que publicaron los casos de una familia con múltiples CBC, quistes mandibulares y costillas bífidas.<sup>11</sup> Desde entonces, más de 1800 publicaciones científicas han reunido las características de esta enfermedad.

### **3. EPIDEMIOLOGÍA**

Existen pocos datos sobre la incidencia y prevalencia de esta enfermedad,<sup>2,3,4,5</sup> así como su distribución poblacional.<sup>12</sup> A pesar de que el CBC es el tumor más frecuente en población caucásica,<sup>2,3,4</sup> no se dispone de registros de estos enfermos y los que hay no recogen la información de manera sistematizada.<sup>1,5</sup> Esto se debe a que tanto el CBC como el carcinoma epidermoide o espinocelular (CEC) son excluidos de los registros de cáncer, incluso en los de países de alto riesgo como Estados Unidos, Australia e Israel.<sup>13,12</sup> Esto se traduce en que los datos epidemiológicos sobre estos tumores provienen en su mayoría de



bases de datos heterogéneas entre sí y de estudios retrospectivos. Además, en los diferentes trabajos la incidencia se ajusta por distintas poblaciones (mundial, europea, española, estadounidense...), lo que dificulta la comparación de los datos.

### **3.A. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS POBLACIONALES EN CARCINOMAS BASOCELULARES ESPORÁDICOS**

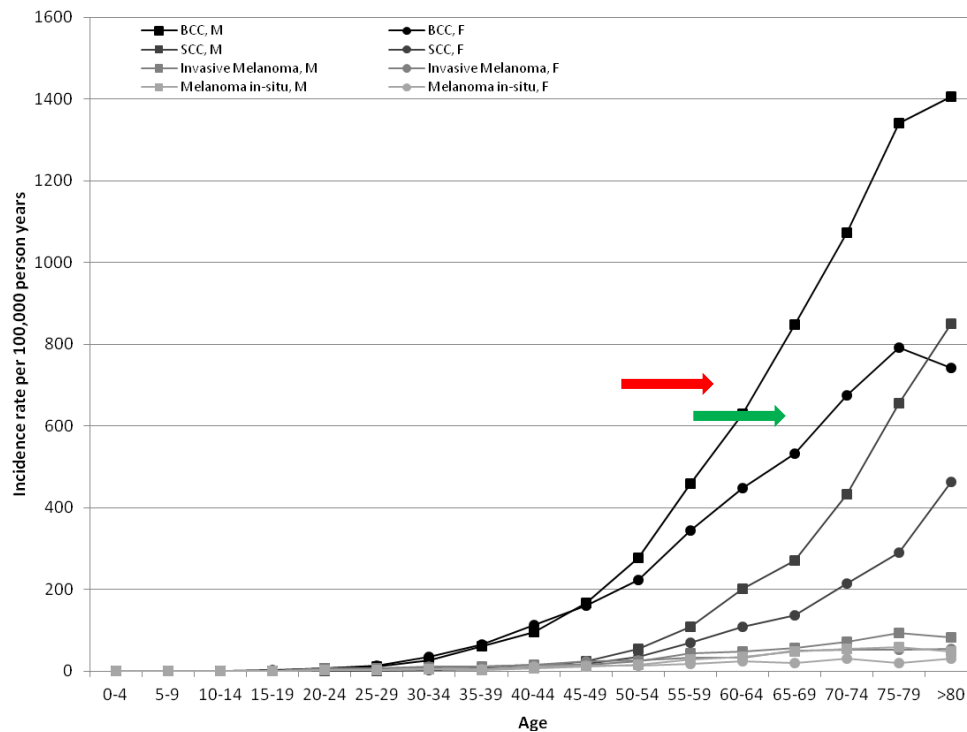
El cáncer cutáneo no melanoma (CCNM), que engloba tanto al CBC como al CEC, constituye el tipo de tumor más frecuente en población de raza blanca. Su incidencia global es creciente<sup>14</sup> y comprende hasta el 75% de los cánceres en Australia.<sup>15</sup> A pesar de su baja letalidad causa una importante morbilidad<sup>14</sup> y un gasto sanitario anual muy elevado, estimado en 511 millones de dólares australianos en Australia y 650 millones de dólares en Estados Unidos.<sup>15</sup> Según un estudio reciente en Canadá, el tratamiento del CCNM representa aproximadamente el 80% del gasto destinado a cáncer cutáneo. De esta cantidad de dinero, la mayoría se dedica al tratamiento del CBC.<sup>16</sup>

El CBC es el tipo de CCNM más frecuente, aunque la proporción entre CBC y CEC varía según poblaciones y hábitos de exposición solar. EL CBC se relaciona más con la exposición solar intermitente a altas dosis y de forma precoz en la infancia y adolescencia.<sup>5,13,15</sup> Por el contrario, el CEC se asocia con exposición a la luz UV de manera prolongada. Esto se refleja en una menor relación de CBC con respecto a CEC en Australia, en comparación con otros países. Los australianos reciben una exposición solar de manera prolongada, y por eso en ellos el ratio CBC:CEC es de 2,5:1. Por el contrario, en países

## INTRODUCCIÓN

como Reino Unido e Israel (figura 1), con hábito de exposición solar intermitente, esta proporción es mayor a favor de CBC, siendo de 4:1<sup>5</sup> y 3,4:1 respectivamente.<sup>13</sup>

El CBC se desarrolla fundamentalmente en adultos<sup>3</sup> y es infrecuente en edad pediátrica. A mayor edad aumenta la incidencia de diagnóstico de esta enfermedad,<sup>13</sup> y cuando aparece en niños suele estar asociado a genodermatosis.<sup>17</sup>



**Figura 1.** Incidencia específica por edad y sexo de carcinoma basocelular en hombres (flecha roja) y en mujeres (flecha verde) en Israel durante el periodo 2006-2011.

Extraído de: *Br J Dermatol.* 2015;172:202-7

La incidencia del CBC por sexos varía con la edad, y a menor edad de los pacientes es más común en mujeres: en mayores de 60 años el CBC es 1,6 veces más frecuente en

## INTRODUCCIÓN

hombres que en mujeres, en menores de 60 años la incidencia es 1,4 veces mayor en hombres<sup>15</sup> y por debajo de 40 años son más mujeres que hombres las que presentan este tumor (Figura 1).<sup>3</sup> De manera global y debido a la mayor frecuencia de aparición de esta enfermedad en edades tardías, el CBC afecta a dos hombres por cada mujer.<sup>3</sup>

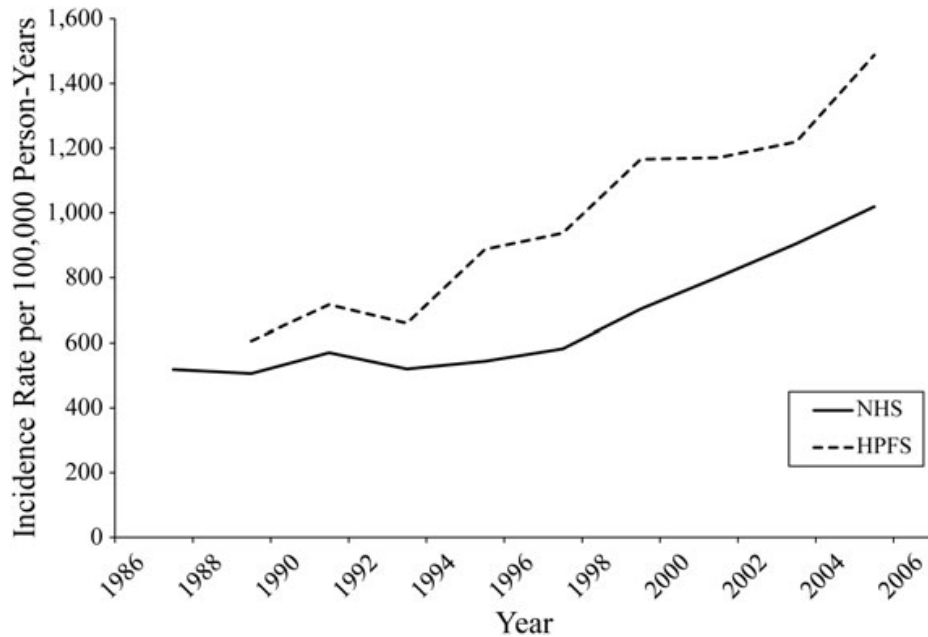
Existen escasos estudios sobre la edad de los pacientes al diagnóstico. En un estudio retrospectivo en población israelí durante el periodo 2005 a 2011, la mediana de edad al diagnóstico fue de 64 años en hombres y 62 años en mujeres.<sup>13</sup> En otro estudio retrospectivo realizado en Zurich en el periodo entre 2007 y 2011 la media de edad era mayor,  $69,5 \pm 12,95$  años en los hombres y  $69,29 \pm 14,64$  años en las mujeres.<sup>1</sup>

### Variación de la incidencia en los últimos años

La incidencia de CBC ha ido aumentando entre un 3 y un 8% por año en población caucásica de Europa, Estados Unidos y Australia.<sup>13</sup> Según datos de revisiones sistemáticas, en Europa este incremento ha sido de un 5,5% anual.<sup>5</sup> El único estudio publicado que arroja datos al respecto en España estimó un aumento de la incidencia en Gerona de 40,3/1000000 en 1994 a 47,03/100000 personas-año en 2007, lo que corresponde con un porcentaje de cambio anual de 1,72% para ese periodo.<sup>18</sup> En Reino Unido este aumento ha sido mayor, de 6/100000 personas-año anual.<sup>5</sup> Más concretamente, entre los años 2004 y 2010, la incidencia de CBC en Reino Unido ha aumentado un 16%, siendo este incremento más acusado en la franja de edad entre 30 y 49 años.<sup>19</sup>

## INTRODUCCIÓN

En las cohortes Nurses' Health Study y Health Professionals' Follow-up Study de Estados Unidos también se ha objetivado un aumento en la incidencia ajustada por la edad en mujeres de 519/100000 personas-año y 1019/100000 personas-año entre los periodos entre 1986-1988 y 2004-2006 (figura 2). En hombres, el aumento fue de 606/100000 personas-año en 1988-1990 a 1488/100000 personas-año en el periodo 2004-2006. Sin embargo, el aumento de la incidencia puede estar sobrevalorado debido a un sesgo de selección ya que sólo incluyen en el estudio a individuos de raza caucásica; y a un sesgo del recuerdo, debido a que las cohortes están conformadas por personal sanitario. Por estos motivos, estos resultados pudieran no ser generalizables al resto de la población de Estados Unidos.<sup>12</sup>



**Figura 2.** Aumento de la incidencia ajustada por edad en las cohortes de enfermeras y de profesionales de la salud de estados Unidos entre los años 1986 y 2006.

Imagen extraída de: Am J Epidemiol. 2013;178:890-7.

## INTRODUCCIÓN

El único país sin esta tendencia al alza es Israel, donde se ha observado un descenso de la incidencia ajustada por edad de 198/100000 personas-año en 2006 a 188/100000 personas-año en 2011.<sup>13</sup>

Se postula que la tendencia al alza de la incidencia de CBC en la mayoría de los países pueda deberse a diferentes causas: a la existencia de mejores programas de vigilancia, cambios en las conductas de fotoexposición,<sup>5</sup> aumento de actividades al aire libre, mayor longevidad de la población, depleción de la capa de ozono y cambios en la indumentaria.<sup>13</sup>

### Estimación de la incidencia en el momento actual

En Europa las cifras de incidencia más bajas corresponden a Croacia, donde la incidencia fue de 33,6/100000 personas-año entre 2003 y 2005; y Eslovaquia, con una incidencia de 38/100000 personas-año en 1994. Por el contrario, las cifras más altas corresponden a Suiza e Italia, con una incidencia de 70/100000 en 1995; Dinamarca, que presentó una incidencia en mujeres de 96,6/100000 y en hombres de 91,2/100000 en 2007; y el sur de Gales, con una incidencia global de 114,2/100000 personas-año en 1998. En Estados Unidos no se han encontrado grandes diferencias con respecto a Europa para latitudes similares, observándose una incidencia de 93,9/100000 personas-año en el año 2000.<sup>5</sup> En Arizona y Nuevo Méjico la incidencia fue mayor, de 935,9/100000 personas-año en 1996,<sup>20</sup> aunque los estudios excluían a la población hispanoamericana y de raza no caucásica.

## INTRODUCCIÓN

En España existen pocos estudios con diferentes resultados: la incidencia en Soria durante los años 1998 a 2000 (ajustada por la población española estimada en el año 2000) fue de 57,97/1000000 personas-año,<sup>21</sup> bastante menor que la encontrada por Bielsa y cols en la costa este española en los años 2006 y 2007, estimada en 128/100000 personas-año (incidencia ajustada por la población mundial) y 195,5/100000 personas-año (incidencia ajustada por la población europea).<sup>22</sup>

### 3.B. EPIDEMIOLOGÍA DEL SÍNDROME DE GORLIN

El SG tiene una prevalencia variable según las series publicadas. En Reino Unido se estima una prevalencia de 1/30827.<sup>23</sup> Sin embargo, otros estudios arrojan cifras de prevalencia inferiores en otras áreas. En 1992, Farndon y cols establecieron una prevalencia mínima de esta enfermedad de 1/57000 habitantes, y estimaron que uno de cada 200 pacientes con uno o más CBCs tienen SG.<sup>24</sup> En Australia la prevalencia es de 1/164000 y en Italia es aún inferior, de 1/256000.<sup>25</sup>

No se conoce bien la incidencia de esta enfermedad. Existe un único estudio al respecto, que estima la incidencia en Reino Unido de 1/18976.<sup>23</sup>

La frecuencia de aparición de los CBCs asociados a esta enfermedad es del 80% en los enfermos de raza blanca y del 38% en los afroamericanos.<sup>26</sup>

La edad de aparición de CBC en estos pacientes es variable. Pueden presentarse durante la infancia precoz, aunque en la mayoría de los casos se desarrollan entre la

## INTRODUCCIÓN

pubertad y los 35 años, con una edad media de aparición variable entre los 16 y los 25 años según las series.<sup>27,28</sup> La incidencia de CBC aumenta con la edad, pero es mucho mayor en enfermos de raza caucásica que en afroamericanos. En pacientes de raza caucásica no se ha encontrado relación entre el fototipo, la edad de aparición del primer CBC y el número de lesiones.<sup>29</sup> El número de CBC no se correlaciona con otros rasgos de la enfermedad y su incidencia es similar en hombres y en mujeres.<sup>30</sup>

El pronóstico de los individuos con SG es habitualmente más favorable que en otras genodermatosis.<sup>31,32</sup> La esperanza de vida de los afectados de SG es 73,4 años, y es significativamente más reducida que en la población general, que es de 80 años. No existen diferencias en la esperanza de vida entre sexos.<sup>32</sup> La causa más importante de muerte prematura en estos pacientes es por meduloblastoma, pero este tiene mejor pronóstico que en la población general.<sup>31</sup>

### **3.C. FACTORES DE RIESGO**

Se han descrito numerosos factores implicados en el desarrollo del CBC. Existen factores de riesgo no modificables como la edad, el fototipo o los síndromes genéticos de predisposición a cáncer y otros modificables dependientes del estilo de vida, siendo el más importante la exposición a la luz UV.<sup>3</sup>

### 3.C.1. FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES

#### a) Edad.

Como se ha comentado anteriormente, el CBC aparece más frecuentemente en edades medias tardías de la vida, por lo que a mayor edad, mayor es el riesgo de desarrollar estos tumores.<sup>13</sup>

#### b) Fototipo.

Los individuos con piel y ojos claros y con tendencia a quemaduras presentan mayor riesgo. El mayor riesgo es para aquellos de fototipo I, que son susceptibles a quemaduras solares desde la infancia. Los pacientes de raza negra, por el contrario, tienen el menor riesgo, que llega a ser hasta 19 veces menor que para la población caucásica.<sup>3</sup>

#### c) Antecedente de CBC.

Se ha demostrado que los pacientes que presentan un CBC tienen más riesgo de desarrollar dos o más nuevos CBC primarios a la vez que el primero o años después.<sup>33</sup> En concreto, el haber presentado un CBC en el tronco de patrón histológico superficial confiere mayor riesgo para desarrollar más CBC en el futuro.<sup>34</sup>

#### d) Determinantes genéticos: genodermatosis con predisposición a cáncer y polimorfismos

Existen enfermedades hereditarias que condicionan una mayor susceptibilidad para el desarrollo de cánceres cutáneos debido a las alteraciones genéticas que las caracterizan.



## INTRODUCCIÓN

Entre ellas se encuentran el SG (del que se discute en profundidad más adelante), el xeroderma pigmentoso, el síndrome de Bazex, el síndrome de Rombo y el albinismo.<sup>3</sup>

Se ha estudiado mucho la relación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes reparadores del DNA con la aparición de CBC. Un ejemplo de ello es el polimorfismo p.T241M en el gen *XRCC3*, que se ha asociado con mayor riesgo de CBC en ambos sexos. El polimorfismo p.E185Q en el gen *NBS1* también produce un mayor riesgo de esta enfermedad en hombres pero no en mujeres.<sup>35</sup> Sin embargo, la evidencia es contradictoria y otros estudios no encuentran asociación entre alteraciones genéticas en genes reparadores y CBC.<sup>36</sup>

La presencia de SNPs en locus que codifican las tres enzimas detoxificadoras glutatión S-transferasa (*GSTM1*, *GSTM3*, *GSTT1*) y en el citocromo P450 (*CYP2D6*, *CYP1A1*) están asociados con mayor susceptibilidad para desarrollar CBC en el tronco.<sup>37</sup> Mientras que en el desarrollo de CBC de tronco puede existir una predisposición genética, la aparición de CBC en otras áreas no está relacionada con la predisposición genética individual sino con otros factores externos.<sup>38</sup>

Se ha demostrado que determinadas variantes en el gen *CTLA4* (implicado en la tolerancia a la luz UV) como el polimorfismo c.60C>T, que aumenta el riesgo de autoinmunidad, se asocian con menor incidencia de CCNM y especialmente de CBC.<sup>39</sup> Por otro lado, los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* y la ciclina *D1* se han descrito como predictores del número de CBC.<sup>40</sup>

### e) Presencia de otras lesiones cutáneas.

Las cicatrices de quemaduras térmicas o de vacunas tienen mayor riesgo de desarrollar un CBC en su interior.<sup>3</sup> Así mismo, el nevus sebáceo de Jadassohn puede servir de base para otros tumores como el CBC, hallado en un 0,8-1,1% de las muestras histopatológicas.<sup>41,42</sup>

### f) Inmunosupresión crónica.

La inmunosupresión crónica se ha relacionado con mayor riesgo de CBC, aunque dicho riesgo es menor que para el CEC. Existen dos grupos principales de riesgo, los pacientes con infección por VIH y los trasplantados de órganos sólidos, debido principalmente a la medicación inmunosupresora.

Se ha demostrado una mayor incidencia de CCNM en pacientes VIH+ frente a los que no presentan la enfermedad, con una odds ratio de 2,1 (intervalo de confianza 95% 1,9-2,3). Este riesgo es mayor para CEC que para CBC, con una odds ratio de 2,1 (intervalo de confianza 1,8-2,3).<sup>43</sup>

El CEC y CBC representan más del 90% de los cánceres cutáneos en pacientes trasplantados, afectando a más del 50% de estos enfermos. El tipo de tumor más frecuente es el CEC, con una frecuencia de aparición entre 65 y 250 veces más que en la población general. Aunque la incidencia de CBC en trasplantados es menor, se ha estimado que estos pacientes tienen 10 veces más riesgo que los individuos sanos. El riesgo de CEC aumenta de manera exponencial en estos pacientes, mientras que el de CBC lo hace de manera lineal.<sup>44</sup> Se han descrito otros factores de riesgo añadidos como una mayor edad en el

## INTRODUCCIÓN

momento del trasplante, sexo masculino, fototipo bajo, antecedente de exposición solar y factores genéticos. Existe controversia en la literatura médica en relación a un posible mayor riesgo dependiendo del órgano trasplantado.<sup>45</sup>

El mayor riesgo de CCNM en pacientes trasplantados de órganos sólidos se debe fundamentalmente a la medicación inmunosupresora, ya que al suspenderse ésta disminuye progresivamente la incidencia de estos tumores.<sup>46</sup> El papel de los glucocorticoides como factor de riesgo de desarrollo de CCNM, a pesar de su acción inmunosupresora, no está demostrado.<sup>47</sup>

Se ha publicado también un mayor riesgo de CCNM en pacientes que han recibido trasplante de progenitores hematopoyéticos.<sup>48,49</sup> El trasplante alogénico se asocia con un riesgo aumentado de CBC (odds ratio 3,1; IC95% 1,9-5,2) y sobre todo de CEC (odds ratio 18,3; IC95% 4,1-81,8). El riesgo de CBC es mayor en pacientes en los que se ha empleado irradiación corporal total dentro del tratamiento de acondicionamiento. Los pacientes con trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos tienen un riesgo similar de desarrollar CBC que los trasplantados renales, pero un menor riesgo de CEC. Por otro lado, los pacientes con trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos no tienen un mayor riesgo de CCNM.<sup>50</sup> Parece existir un mayor riesgo de CCNM en pacientes trasplantados que sufren enfermedad injerto contra huésped crónica,<sup>48</sup> pero hacen falta más estudios que lo confirmen.

### 3.C.2. FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES

#### a) Luz ultravioleta.

La exposición a la luz UV es uno de los principales factores de riesgo de CBC esporádico.<sup>15</sup> Ésta puede ser recibida por la exposición solar de manera recreacional o mediante lámparas artificiales, empleadas tanto de manera terapéutica en consultas de Dermatología como de manera extrahospitalaria para el bronceado.<sup>15,51,52</sup>

La luz UV tiene el mismo efecto carcinogénico en CBCs esporádicos que en el SG ya que las células de los pacientes afectados por esta enfermedad tienen la misma capacidad para reparar el DNA y responder al daño producido por la luz UV. Esto explica por qué los CBC en pacientes con SG afectan tanto a áreas expuestas como no expuestas a la luz, ya que su patogenia parece estar más ligada a alteraciones del ciclo celular.<sup>53</sup>

a.1) Exposición recreacional a la luz UV. La exposición a la luz UV proveniente de la radiación solar explica por sí sola el 37% de la variedad de incidencia de CBC en los diferentes países. La incidencia de CBC es mayor en países con latitudes más cercanas al ecuador. Concretamente, un aumento de  $1 \text{ kJ/cm}^2$  en la radiación UV (el equivalente a la diferencia entre Barcelona y Copenhague) produce un aumento de incidencia global de CBC de un 67%, siendo de un 70% en varones y un 60% en mujeres. Este hecho ha sido demostrado en la cohorte de enfermeras de EEUU, donde se ha documentado un mayor riesgo de CBC y CEC en mujeres que viven en zonas con radiación UV intermedia (media en agosto de 6) y alta (media en agosto mayor o igual a 7) en comparación con aquellas que viven en zonas de baja radiación UV (menor o igual a 5 en agosto).<sup>15</sup> Se ha estimado la

## INTRODUCCIÓN

radiación UV umbral para el desarrollo de enfermedad, que es menor para el CBC que para el CEC (8000-35000 horas frente a 70000 horas respectivamente).<sup>13</sup>

a.2) Exposición artificial a la luz UV. La terapia con luz UV se emplea como tratamiento de múltiples dermatosis como la psoriasis o la dermatitis atópica. Para ello se emplean tanto la radiación ultravioleta A (UVA) como ultravioleta B (UVB) de banda ancha o estrecha. Se ha asociado clásicamente la terapia con psoralenos y UVA (PUVA) con la aparición de CEC y CBC, sin haberse podido comprobar hasta ahora.<sup>3</sup> Tanto la fototerapia con UVA y UVB han sido descritas como causantes de CBC mediante mutaciones en el gen *p53* y probablemente en *PTCH*,<sup>54</sup> aunque la frecuencia de mutaciones en ambos genes en pacientes que han recibido fototerapia es similar a la población general con CBC.<sup>55</sup> Existen otras investigaciones con resultados contradictorios sobre la asociación de CBC y fototerapia con UVA. Según Archier y cols el tratamiento con más de 100 sesiones de UVA aumenta el riesgo de CBC,<sup>52</sup> aunque de acuerdo con el reciente estudio prospectivo publicado por Stern y cols la exposición a UVA, incluso a altas dosis y en gran número de sesiones, no incrementa el riesgo de CBC.<sup>56</sup>

En un estudio reciente se objetiva que la mayor parte de los pacientes que usan lámparas UV para el bronceado lo hacen en negocios (86.4%-95.1% según las cohortes) mientras que una minoría se broncea en el domicilio. El uso de lámparas de radiación ultravioleta en centros de bronceado aumenta también el riesgo de CBC (odds ratio 1,69; intervalo de confianza al 95% de 1,15-2,48) y de melanoma (odds ratio 1,82; intervalo de confianza al 95% de 1,47-2,26). No se ha objetivado aumento de riesgo de CBC en los que usan lámparas UV en domicilio, debido probablemente al pequeño tamaño muestral.<sup>51</sup> La

## INTRODUCCIÓN

exposición a estos dispositivos a edades tempranas se relaciona con el desarrollo de CBC precoz (odds ratio de 1,6, intervalo de confianza al 95% 1,3-2,1).<sup>57</sup>

### b) Factores ambientales.

Se ha comunicado la relación entre la aparición de CBC y exposición crónica a arsénico entre 30 o 40 años antes. El arsénico puede ser ingerido a través de agua contaminada, marisco o a través de medicación como inhaladores para el asma.<sup>58,59</sup> El arsénico se ha relacionado también con cánceres de pulmón y vejiga.<sup>59</sup> La exposición a arsénico en el trabajo (minería, industria metalúrgica, fabricación y uso de productos para la agricultura y conservantes de la madera, industria de vidrio, fabricación de semiconductores electrónicos y fábricas de pigmentos) junto con la exposición solar aumenta el riesgo de CCNM, fundamentalmente en mujeres (odds ratio 10.22, intervalo de confianza 95% 2,48–42,07);<sup>60</sup> sin embargo, esta relación entre CCNM y arsénico puede ser modificada por polimorfismos en genes de reparación por escisión de nucleótidos.<sup>61</sup> Curiosamente en 2013 se describió que el trióxido de arsénico puede disminuir el crecimiento de algunos CBC por la interacción con la vía de señalización hedgehog (Hh).<sup>62</sup>

### c) Radiaciones ionizantes.

Las radiaciones ionizantes, los rayos X y los rayos Grenz se asocian a mayor riesgo de CBC, limitado a la zona irradiada y con un periodo de latencia de 20 años aproximadamente. Por este motivo la utilización de radiaciones ionizantes en el tratamiento de dermatosis inflamatorias ha caído en desuso.<sup>63,64</sup>

### d) Tabaco y alcohol

La correlación entre el hábito tabáquico y la aparición de CBC no está demostrada y se han publicado estudios con resultados contradictorios.<sup>3</sup>

También existe controversia respecto a la relación de la toma de alcohol y CBC. En un trabajo reciente no se ha observado asociación entre ingesta enólica y desarrollo de CBC,<sup>65</sup> aunque otro estudio de casos y controles encuentra asociación entre el alcohol y el CBC de características agresivas.<sup>66</sup>

### e) Fármacos

La aplicación tópica de mostazas nitrogenadas aumenta el riesgo de CBC, particularmente el localizado en área genital.<sup>3</sup>

El antecedente de uso de fluorouracilo tópico se ha relacionado recientemente con un mayor riesgo de CBC morfeiforme con una odds ratio de 2,49 ( $p=0,04$ ), pero no incrementa el riesgo global de CBC. Esto es probablemente debido a que es una terapia efectiva frente a los CBC superficiales, pero no actúa contra los CBC morfeiformes, provocando un sesgo.<sup>67</sup>

Se ha descrito también un mayor riesgo de CBC en pacientes con sobrepeso y obesidad tratados con diuréticos, pero no en aquellos con normopeso.<sup>68</sup>

#### **4. PATOGENIA MOLECULAR**

El CBC, tanto en su forma esporádica como en el contexto de genodermatosis, puede aparecer como resultado de diferentes mecanismos etiopatogénicos que afectan a distintos genes o vías de señalización.

La etiopatogenia del CBC esporádico y el SG ha sido desconocida hasta hace unos años. En 1992 se mapeó el locus para el gen responsable del SG en el cromosoma 9q22.3-9q31.<sup>24,69,70</sup> En 1996 Hahn y cols demostraron pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 9q22.3 de un gen supresor tumoral denominado *patched 1 (PTCH1)*, que presentaba homología con el gen *PTC* de *Drosophila*.<sup>71</sup>

La patogenia molecular, tanto del CBC esporádico como del SG, está ligada a sobreexpresión de la vía de señalización Hh, en la que interviene *PTCH1*.<sup>72</sup> Las mutaciones afectando al gen *PTCH1* se detectan en el 50% de los pacientes afectados de SG,<sup>23</sup> y con menor frecuencia están mutados otros genes de la vía de Hh.<sup>27</sup> La ruta Hh fue descrita por primera vez en *Drosophila*,<sup>73</sup> y se encuentra conservada desde las moscas a los humanos.<sup>74</sup> Se trata de una vía de señalización esencial durante el desarrollo, ya que interviene en la polaridad tisular y la población de células madre.<sup>74</sup>

En los mamíferos está compuesta por cuatro elementos principales (figura 3):

1- Ligandos Hedgehog (LHH) de PTCH 1: Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH), y Desert Hedgehog (DHH).

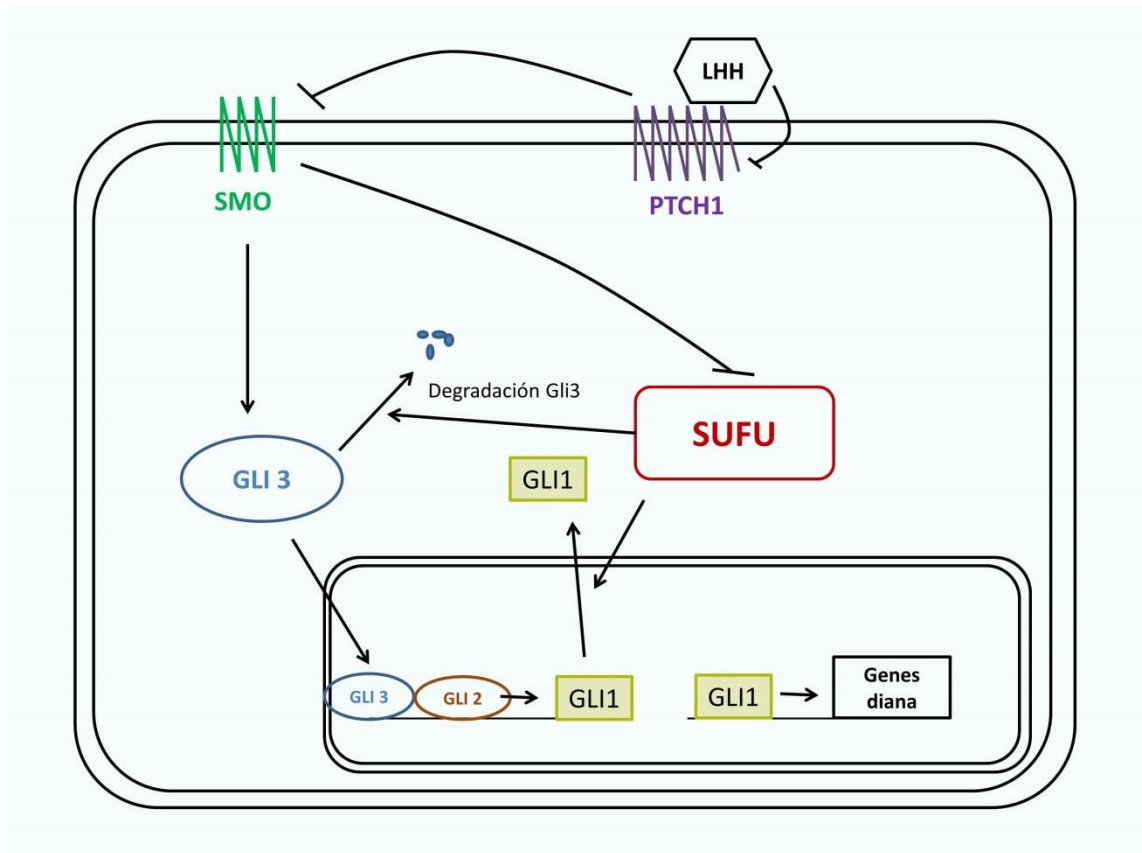
2- El receptor PTCH1



## INTRODUCCIÓN

3- La proteína transductora de señales smoothed (SMO)

4- Los factores de transcripción Gli1, Gli2, Gli3<sup>74</sup>



**Figura 3.** Esquema de la vía Hedgehog. LHH: Ligandos Hedgehog de PTCH1: *Sonic hedgehog*, *Indian Hedgehog* y *Desert hedgehog*

Dentro de la vía Hh existen dos tipos de señalización: la vía de señalización canónica y la no canónica.

La vía canónica sigue el esquema de pasos expuesto en la figura 3, que finaliza con la transcripción de genes implicados en el aumento de la supervivencia celular y mitosis por medio de los factores de transcripción Gli.<sup>75</sup> En esta vía PTCH1 inhibe constitutivamente la actividad de la proteína SMO, que se encuentra anclada a dicho receptor. La unión de los

## INTRODUCCIÓN

LHH a PTCH1 suprime su actividad inhibitoria sobre SMO. Una vez liberada, SMO se trasloca al extremo del cilio primario para ejercer su función, que tiene como resultado la activación de los factores de transcripción Gli.<sup>76,77</sup> En vertebrados existen 3 proteínas Gli. GLI 1 y GLI2 tienen función activadora, mientras que GLI3 impide la transcripción de los genes diana,<sup>76</sup> entre los que se encuentran los propios genes *Gli*, *PTCH1*, los genes del factor de crecimiento transformante beta (*TGF-β*) y *Bcl-2*.<sup>78</sup>

En la vía no canónica la acción efectora es independiente de las proteínas Gli. Dicha vía está compuesta a su vez por dos subvías: tipo 1 y tipo 2. En la tipo 1 PTCH1 ejerce su función supresora tumoral mediante la inducción de la apoptosis. Para producir la muerte celular programada, PTCH1 se une a un complejo multiproteico que en estudios in vitro puede ser disuelto por los LHH pero no puede ser bloqueado por antagonistas de SMO. Esto indica que la vía no canónica tipo 1 se activa independientemente de SMO. Sin embargo, SMO sí interviene en la vía de señalización no canónica tipo 2, regulando la actina del citoesqueleto y promoviendo la tubulogénesis mediante la activación de la familia Rho de pequeñas GTPasas. Esta vía se ha demostrado funcionando en células endoteliales, fibroblastos y en axones y espinas dendríticas de las neuronas.<sup>75</sup>

Aproximadamente el 90% de los CBC esporádicos tienen mutaciones identificables por lo menos en un alelo del gen *PTCH1*, y un 10% presentan mutaciones activadoras en la proteína SMO.<sup>72</sup>

El SG es una enfermedad hereditaria autosómica dominante, con alta penetrancia y expresividad variable, que depende también de otros factores genéticos como la pigmentación cutánea.<sup>76</sup> Se han detectado mutaciones en *PTCH1* en alrededor de un 50%

## INTRODUCCIÓN

de los pacientes con esta enfermedad. En un 20-30% de los casos estas mutaciones son de novo.<sup>30</sup> En el resto de los casos pueden existir mutaciones en otros genes de la vía como *PTCH2*, *Suppressor of fused (SUFU)*, *SMO* o *GLI*.<sup>79</sup> Así mismo, existe la infrecuente posibilidad de mosaicismo somático, producido por una mutación en una etapa precoz del desarrollo embrionario. Si la mutación es precoz y no hay mutación en una proporción de células suficiente pueden no encontrarse mutaciones en sangre periférica, que sí estarán presentes en la muestra tumoral.<sup>30</sup>

Los pacientes con SG nacen en su mayoría con una mutación heredada en uno de los alelos de *PTCH1*. La mayor parte de esas mutaciones representan un alelo nulo y codifican una proteína truncada. Para que se produzca la enfermedad se debe cumplir el fenómeno del “Doble hit” de Knudson. En este modelo, el primer “hit” o evento sería la mutación heredada y el segundo evento se correspondería con una mutación adquirida sobre el otro alelo sano del gen, que puede producirse por factores externos como la luz UV.<sup>27</sup> Por el contrario, los CBC esporádicos se producen por mutaciones adquiridas que activan la vía y pueden coexistir con mutaciones en otros genes como p53.<sup>80</sup>

La vía Hh es necesaria durante el periodo embrionario, pero en la vida adulta queda inactivada excepto en células madre, piel y folículo piloso.<sup>81</sup> La activación aberrante de esta ruta en otras áreas puede regular el número de células cancerosas e influir en su microambiente, y se ha demostrado causante de otros tumores como el meduloblastoma, rhabdomiosarcoma, esófago de Barrett, tumores de estómago, páncreas o hígado, además del CBC.<sup>74,81</sup>

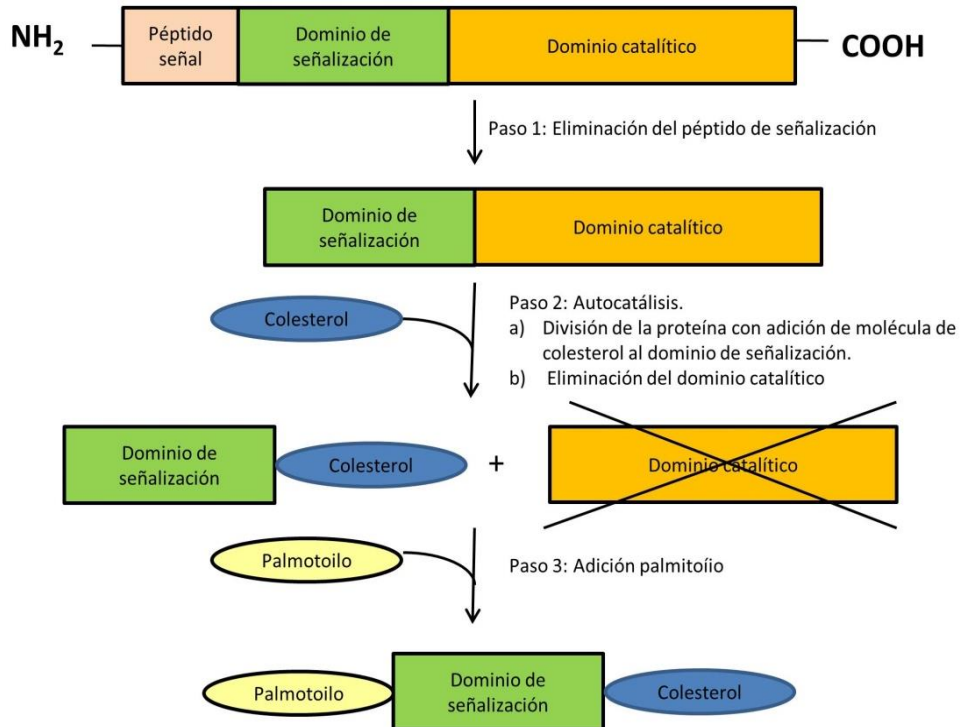
#### 4.A. LIGANDOS HEDGEHOG

La familia de genes de los *LHH* está compuesta por los tres miembros comentados anteriormente: *SHH*, *IHH* y *DHH*. *SHH* es el que se expresa más ampliamente de los tres. El gen *SHH* codifica una proteína de 45 kDa, que sufre una serie de procesos hasta convertirse en activa (figura 4). La proteína recién formada tiene tres partes: en el extremo amino-terminal se encuentra el dominio de señalización, en el carboxi-terminal el dominio catalítico, y en el centro el dominio de señalización. En el primer paso de su procesamiento el extremo amino-terminal se separa del resto de la proteína. Posteriormente el dominio catalítico y el de señalización se separan y una molécula de colesterol se une al extremo carboxi-terminal del dominio de señalización. Por otro lado, el dominio catalítico es eliminado. La proteína se transforma en activa una vez se une a ella un palmitoílo en el extremo amino-terminal, para lo que se requiere la acción de la enzima Skinny Hedgehog aciltransferasa.<sup>82</sup>

Se han descrito diversos correceptores de los ligandos *SHH*, *IHH* y *DHH*, que incluyen CDO (cell adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes), BOC (brother of CDO), GAS 1 (Growth arrest specific 1) y glipicano 5 (GPC5).<sup>74</sup> Se ha demostrado que la proteína CDO coopera con la proteína GAS 1 para promover la señal de *SHH*, posiblemente favoreciendo la presentación del ligando *SHH* al receptor *PTCH*, o tal vez uniéndose a *PTCH* en la membrana formando el complejo receptor de *SHH*.<sup>83</sup> *GPC5* tiene también efecto estimulador de la vía Hh favoreciendo la unión de los *LHH* a *PTCH1*. El wnt inhibitory factor-1 (*WIFI*) puede regular la señalización de los *LHH* mediante la

## INTRODUCCIÓN

asociación con CDO, BOC o GPC5. Por el contrario, glicano 3 tiene un efecto inhibitorio de la vía Hh una vez se une a los ligandos SHH, IHH y DHH.<sup>74</sup>



**Figura 4.** Procesamiento de la proteína Sonic hedgehog. Modificado de Am J Med Genet A.

2003;123A:5-28

SHH interviene, entre otras funciones, en el desarrollo del cerebro, la médula espinal, el esqueleto axial y las extremidades. Esta ruta de señalización está involucrada en el mantenimiento de la notocorda, del tubo neural en el desarrollo embrionario y de las

estructuras de la línea media. Por ello su ausencia condiciona ausencia de estructuras distales de extremidades y ciclopía. La pérdida de función de esta vía también provocaría ausencia o alteraciones en la médula espinal y en las costillas.<sup>84</sup> En la piel, la ruta de señalización iniciada por SHH es imprescindible para el mantenimiento de la población de células madre y para regular el desarrollo de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas.<sup>85</sup>

### **4.B. RECEPTOR PTCH1**

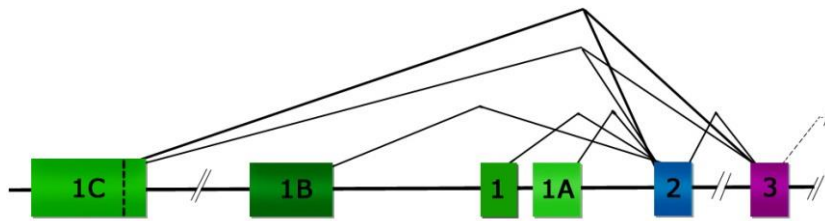
El gen *PTCH 1* es el homólogo humano del gen *patched* de *Drosophila*. Como se ha comentado anteriormente, está localizado en la región 9q22.3.<sup>71</sup> Está constituido por 23 exones, con un tamaño total de 50 kb. Codifica la glicoproteína transmembrana PTCH1, compuesta por 1447 aminoácidos.<sup>86</sup>

#### **4.B.1. ESTRUCTURA DEL GEN *PTCH1***

Este gen presenta cierta complejidad en el extremo 5' ya que esta región puede tener procesamiento alternativo. La expresión alternativa del primer exón es un mecanismo frecuente que dota de una mayor complejidad al proteoma y permite conseguir la expresión selectiva de un mismo gen en cada tejido.<sup>87,88</sup> En el caso de *PTCH1* este fenómeno puede ser el que explique cómo un mismo gen interviene tanto en el crecimiento tumoral como en el desarrollo embrionario.<sup>89</sup>

## INTRODUCCIÓN

Se calcula que más del 55% de todos los genes y al menos un 74% de los genes con múltiples exones sufren procesamiento alternativo en humanos.<sup>88</sup> En la región 5' de *PTCH1* se han descrito 5 exones diferentes que se procesan de manera alternativa como exón 1: exones 1Ckid, 1C, 1B, 1 y 1A, dispuestos en sentido 5' a 3' (figura 5).<sup>90</sup> Estas isoformas codifican proteínas con distinto extremo amino-terminal: PTCH1-1Ckid, PTCH1-1C, PTCH1-1B, PTCH1-1, PTCH1-1A. Estas variaciones en el extremo amino-terminal afectan a la cantidad total y a la solubilidad de estas proteínas.<sup>91</sup>



**Figura 5.** Representación esquemática del extremo 5' del exón 1 de *PTCH1*.

Modificado de Shimokawa y cols. *Oncogene*. 2007; 26: 4889–96.

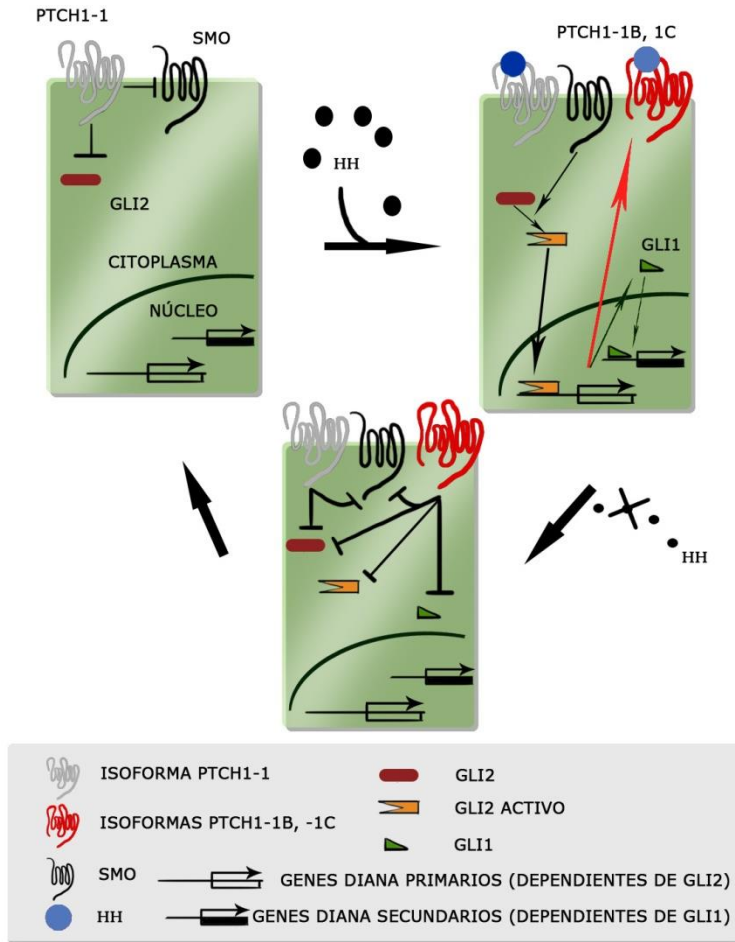
La función de estas variantes de *PTCH1* es la inhibición de la vía Hh. De entre ellas, la proteína *PTCH1-1B* es la única que inhibe completamente la acción de *SMO* y su expresión se encuentra aumentada en los CBC.<sup>87,91</sup> El resto de proteínas traducidas mediante el splicing alternativo se expresan en la mayoría de los tejidos.<sup>89,91</sup> La expresión de estas isoformas está regulada además por los factores de transcripción *GLI1* y *GLI2*, que son resultado de la activación de la vía Hh. Los promotores alternativos de los exones 1b y 1c presentan sitios de unión de *GLI1*, por lo que la activación de la ruta de señalización Hh conduce a un aumento en la transcripción de estos exones.<sup>90</sup>

## INTRODUCCIÓN

El procesamiento alternativo del exon 1 ha generado un modelo dinámico de la vía Hh que incluye a las diferentes variantes de PTCH1 y que explicaría como, según la disponibilidad de ligando, se producen cambios activadores o inhibidores de esta ruta de señalización. En este modelo la vía se puede encontrar en tres estados: preactivación, activación y postactivación. En el estado preactivo se expresa la isoforma PTCH1-1, que tiene capacidad para inhibir SMO; además PTCH1-1B, -1C y GLI1 no se expresan. El estado activo se produce al unirse el LHH a PTCH1-1; se suprime la inhibición sobre SMO y se transcriben PTCH1-1B, -1C y GLI1, aunque con predominancia de PTCH1-1B sobre PTCH1-1C. La presencia de LHH va a continuar ejerciendo supresión sobre la actividad inhibitoria de PTCH1-1B y -1C, pero si se consume el LHH o éste deja de existir, PTCH1-1B y -1C actúan inhibiendo la traducción de las proteínas SMO, GLI1 y GLI2 (figura 6).<sup>90</sup>



## INTRODUCCIÓN



**Figura 6.** Esquema del modelo dinámico propuesto por Shimokawa y cols incorporando las distintas isoformas de *PTCH1*. Modificado de Shimokawa y cols. *Oncogene*. 2007; 26: 4889–96.

El gen *PTCH* presenta también procesamiento alternativo del exón 10, lo que genera una isoforma que pierde 52 aminoácidos en el segundo y tercer dominios transmembrana, cuyo efecto funcional todavía se desconoce.<sup>88</sup>

Otro exón alternativo descrito es el 12 b, situado entre los exones 12 y 13. Este exón tiene un codón de stop, por lo que codifica una proteína (*PTCH12B*) truncada. *PTCH12B*

## INTRODUCCIÓN

no sólo carece de actividad inhibitoria sobre la vía, sino que además tiene un efecto inhibitorio sobre PTCH1, por lo que esta segunda proteína pierde su actividad supresora. Se ha demostrado que PTCH12B se encuentra expresada en meduloblastomas, además de en algunas líneas celulares.<sup>88,92</sup>

### 4.B.2. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA PTCH1

La proteína codificada por el gen *PTCH1* es una glicoproteína de 1450 aminoácidos. Está compuesta por 12 dominios transmembrana, extremos amino y carboxi-terminal intracelulares, dos bucles extracelulares, un gran bucle intracelular y un dominio sensible a esterol (figura 7).<sup>82</sup>

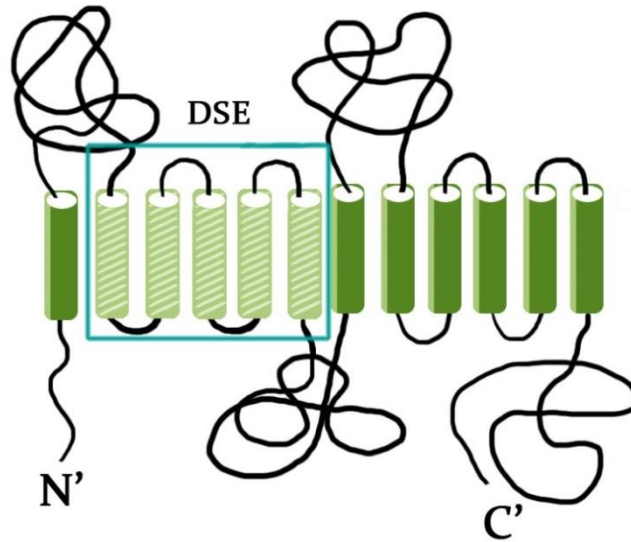
Los dos grandes bucles extracelulares sirven de unión al LHH.<sup>82,93</sup> Si un dominio extracelular se encuentra afectado por una mutación en *PTCH1* no se puede producir la unión entre el LHH y el receptor, y PTCH1 sigue manteniendo la inhibición sobre SMO.<sup>82</sup>

El dominio sensible a esterol (DSE) comprende los dominios transmembrana 2 a 6. Parece tener un papel importante en la función de PTCH1 al participar en la homeostasis del colesterol y la movilización de colesterol y otros lípidos, así como de proteínas unidas a los mismos.<sup>86,94</sup> Este dominio es necesario para el funcionamiento de la proteína Niemann-Pick tipo C, que a su vez está íntimamente relacionada con PTCH1.<sup>95</sup>

Se ha postulado que SMO interacciona con los extremos amino y carboxilo terminal (que se aproximan en torno al dominio sensible a esterol)<sup>87</sup> y el gran bucle intracelular de

## INTRODUCCIÓN

PTCH1.<sup>96</sup> Se ha demostrado que las diferentes isoformas de PTCH1, aunque sean distintas entre sí, son capaces de unirse a SMO.<sup>87</sup>



**Figura 7.** Estructura del receptor transmembrana *PTCH1*. Modificado de Cohen MM. *Am J*

*Med Genet A.* 2003;123A:5–28.

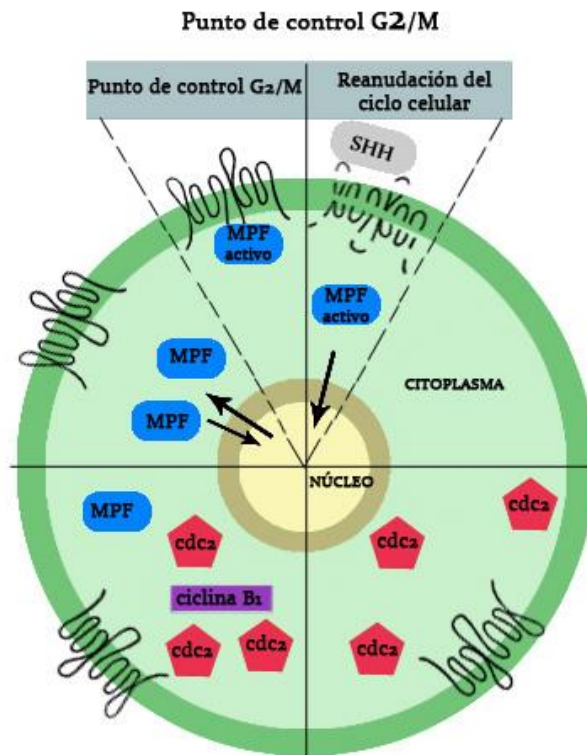
### 4.B.3. RELACIÓN DE PTCH1 CON EL CICLO CELULAR

Se ha demostrado que la proteína PTCH1 interviene en la regulación del ciclo celular. Para que la célula entre en mitosis se requiere la activación del factor promotor de la fase M (MPF), que está compuesto por dos proteínas: cdc2 y ciclina B1. Cdc2 es una quinasa que se expresa durante el ciclo celular, pero se activa únicamente en la transición G2/M. Por otro lado, la ciclina B1 no se almacena en el interior de la célula hasta la fase S y alcanza los máximos niveles en la fase G2.<sup>97</sup> El daño producido por la radiación UV impide que la ciclina B1 entre en el núcleo, e induce un paso de ciclina B1 desde el núcleo

## INTRODUCCIÓN

al citoplasma para retrasar la mitosis hasta que el daño pueda ser reparado.<sup>98</sup> De esta manera, la localización de la ciclina B1 en la célula es uno de los elementos de control en la transición G2/M.

PTCH1 puede interaccionar con la proteína ciclina B1 fosforilada, y con el complejo ciclina B1 y Cdc2. La unión entre PTCH1 y ciclina B1 se produce en el gran bucle intracelular del receptor, que abarca los aminoácidos 559-750. PTCH1 secuestra a la ciclina B1 activa uniéndose ella en la membrana celular e impidiendo su traslocación al núcleo, con lo que se para el ciclo celular en fase G2. Al unirse el LHH a PTCH1 se rompe la unión entre ciclina B1 y PTCH1, con lo que la célula entra en fase de mitosis (figura 8).<sup>97</sup>



**Figura 8.** Modelo de regulación del factor promotor de la fase M por PTCH1.

Modificado de Barnes y cols. *EMBO J.* 2001;20:2214-23.

### 4.B.4. DETECCIÓN DE MUTACIONES PATOGÉNICAS EN GEN DEL RECEPTOR PTCH 1

Como se ha comentado anteriormente, mediante el análisis de secuencias se pueden detectar mutaciones que afectan al gen *PTCH1* en hasta el 80% de los CBC esporádicos en pacientes de raza caucásica<sup>26</sup> y en alrededor del 50-58% de los pacientes afectados de SG.<sup>23,99</sup>

#### a) CBC esporádicos

En población caucásica y asiática se ha identificado *PTCH1* como el gen mutado con más frecuencia. En un estudio en población alemana en el que se incluyeron 42 CBC esporádicos, se identificaron mutaciones en *PTCH1* en el 67% de los casos, en *SMO* en el 10% y en *p53* en el 40%, sin hallar mutaciones en *GLI1* ni en otros oncogenes. Al ampliar este estudio mediante análisis de pérdida de heterocigosidad empleando 6 marcadores de microsatélites la tasa de detección de alteraciones en *PTCH1* aumentó hasta el 83%. De esos casos, un 42% presentaban inactivación bialélica de *PTCH1*.<sup>100</sup>

Otro gran estudio sobre mutaciones en *PTCH1* en CBC esporádicos encontró mutaciones en este gen en el 48% de sus casos, encontrando alteraciones inducidas por la radiación UV (cambios C>T o CC>TT) en el 68% de los casos mutados.<sup>101</sup>

Existen pocos estudios sobre población asiática. Un estudio reciente en 31 CBC esporádicos de población china encontró una frecuencia similar de mutaciones en *PTCH1* (54.8%), pero con un porcentaje de pérdida de heterocigosidad del 43,5%, menor que en los anteriores estudios (analizado por determinación de polimorfismos de un nucleótido).<sup>102</sup>

## INTRODUCCIÓN

Otro estudio en población coreana analizó las mutaciones en *PTCH1* y *p53* en 15 CBC esporádicos. Encontraron un 40% de mutaciones en *PTCH1* con pérdida de heterocigosidad en el 53% de los casos (determinada mediante marcadores de microsatélites). Sin embargo, no había pérdida de heterocigosidad en *p53*, que estaba mutado en el 33% de las muestras. En estos casos, no relacionaron la pérdida de heterocigosidad en *PTCH1* con la agresividad tumoral. Describieron cambios C>T y CC>TT inducidos por la radiación UV tanto en *PTCH1* como en *p53*, pero más frecuentes en este segundo gen. De ello se deduce que la luz UV produce con mayor frecuencia daño sobre *p53* (inactivándolo) que sobre *PTCH1*, sobre el que actuarían además otros factores mutagénicos. Sin embargo, de los 4 tumores analizados con “firma” de daño UV en *PTCH1*, 3 presentaban también mutaciones por daño UV en *p53*.<sup>103</sup>

### b) Síndrome de Gorlin.

Se estima que el 65% de las mutaciones en *PTCH1* en pacientes con SG son sin sentido o nonsense. El 16% son mutaciones de pérdida de sentido o missense, provocando la aparición de un codón que codifica para un aminoácido diferente, pudiendo o no resultar en una proteína incapaz de cumplir su función. El 13% de las mutaciones afectan a los sitios de splicing y únicamente un 6% son grandes duplicaciones, deleciones o reordenamientos que afectan un exón completo, a varios exones o a toda una región cromosómica.<sup>104</sup>

4.B.5. LOCALIZACIÓN DE LAS MUTACIONES QUE AFECTAN A *PTCH1*

En el mayor estudio sobre mutaciones en *PTCH1* en SG, CBC esporádicos, CBC asociados a xeroderma pigmentoso y meduloblastomas se encuentra una mayor frecuencia de mutaciones en los dos grandes bucles extracelulares y el gran bucle intracelular de la proteína. Sin embargo, los SNPs exónicos están más presentes en el DSE y la segunda mitad de la proteína, lo que indica una mayor variabilidad con respecto a la primera mitad (tabla 1).<sup>86</sup>

En el SG la mayoría de las mutaciones nonsense presentes en la línea germinal se concentran en los dos bucles extracelulares, el intracelular y el extremo amino terminal. En el extremo amino terminal se ha descubierto una acumulación de mutaciones alrededor de los aminoácidos 86-97, coincidente con una zona de secuencias repetidas, que podrían dar lugar a errores de deslizamiento de la polimerasa en la replicación. Las mutaciones missense se concentran en los dominios transmembrana, especialmente en el 4º, que pertenece al DSE.<sup>86</sup>

En los CBC esporádicos las mutaciones se agrupan en el primer bucle extracelular, el intracelular y el dominio carboxilo terminal. Se han encontrado mutaciones nonsense y missense recurrentes en los residuos 663-694 tanto en pacientes con SG, CBC esporádicos, CBC asociados a xeroderma pigmentoso y en meduloblastomas, y este podría constituir un punto caliente dentro del gen. En CBC esporádicos y en mayor medida en los asociados a xeroderma pigmentoso se han identificado mayor número de mutaciones relacionadas con la luz UV, sobre todo consistentes en cambio CC>TT. A diferencia de los CBC esporádicos, en los asociados al xeroderma pigmentoso estas mutaciones se concentran en

## INTRODUCCIÓN

el bucle intracelular, lo que puede deberse a que esta región sea más sensible a la radiación UV.<sup>86</sup>

Hasta el momento no se han estudiado las posibles mutaciones en el exón 1b debido en parte a que presenta una secuencia rica en GC que dificulta técnicamente su estudio.<sup>105</sup>



## INTRODUCCIÓN

*Tabla 1. Topología de la proteína PTCH1 (datos obtenidos de [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) y función conocida de cada región.*

REGIÓN	NÚMERO CODON	LONGITUD	FUNCIÓN CONOCIDA
<b>Extremo amino-terminal (citoplasmático)</b>	1-100	100	Unión SMO
<b>1º dominio transmembrana</b>	101-121	21	
<b>1º gran bucle extracelular</b>	122-436	315	Unión a LHH
<b>2º dominio transmembrana</b>	437-457	21	DSE
<b>Dominio de unión (citoplasmático)</b>	458-472	15	DSE
<b>3º dominio transmembrana</b>	473-493	21	DSE
<b>Dominio de unión (extracelular)</b>	494-501	8	DSE
<b>4º dominio transmembrana</b>	502-522	21	DSE
<b>Dominio de unión (citoplasmático)</b>	523-547	25	DSE
<b>5º dominio transmembrana</b>	548-568	21	DSE
<b>Dominio de unión (extracelular)</b>	569-577	9	DSE
<b>6º dominio transmembrana</b>	578-598	21	DSE
<b>Gran bucle intracelular</b>	599-748	150	Unión a Ciclina B1
<b>7º dominio transmembrana</b>	749-769	21	
<b>2º gran bucle extracelular</b>	770-1027	258	Unión a LHH
<b>8º dominio transmembrana</b>	1028-1048	21	
<b>Dominio de unión (citoplasmático)</b>	1049-1055	7	
<b>9º dominio transmembrana</b>	1056-1076	21	
<b>Dominio de unión (extracelular)</b>	1077-1083	7	
<b>10º dominio transmembrana</b>	1084-1104	21	
<b>Dominio de unión (citoplasmático)</b>	1105-1121	17	
<b>11º dominio transmembrana</b>	1122-1141	20	
<b>Dominio de unión (extracelular)</b>	1142-1154	13	
<b>12º dominio transmembrana</b>	1155-1175	21	
<b>Extremo carboxi-terminal (citoplasmático)</b>	1176-1447	272	Unión SMO

*Abreviaturas. SMO: smoothed; LHH: Ligando Hedgehog; DSE: dominio sensible a esterol*

## 4.C. OTRAS PROTEÍNAS DE LA VÍA HEDGEHOG

### 4.C.1 SMOOTHENED

El gen *SMO* se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, en la banda 7q31-32. El gen está compuesto por 12 exones que ocupan 24 kb y se transcribe en un RNA mensajero (mRNA) mensajero de 3.8 kb, con una fase de lectura abierta de 2.4 kb.<sup>106</sup> La proteína tiene 7 dominios transmembrana y pertenece a la familia Frizzle de receptores de 7 dominios transmembrana.<sup>107</sup> La activación del receptor SMO se produce en presencia de los LHH en dos etapas: la fosforilación del extremo carboxi-terminal por la acción de varias proteínas kinasas entre las que destaca la protein kinasa A (PKA), y su posterior traslocación a la membrana celular mediante vesículas citoplasmáticas.<sup>81</sup>

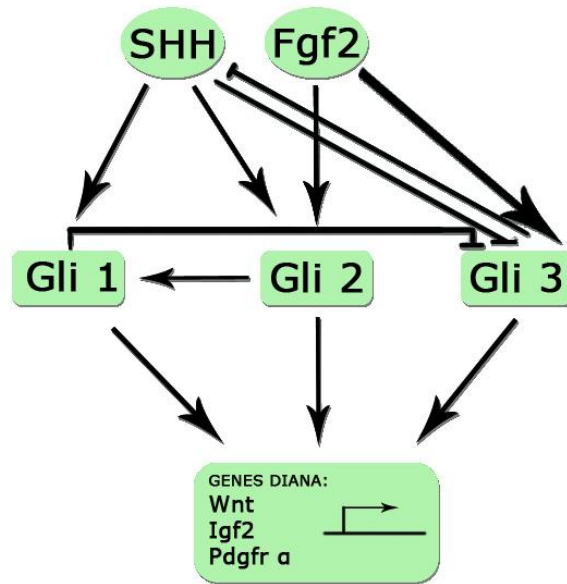
*SMO* es un protooncogen que da lugar a tumor si se encuentra mutado. Como se ha comentado anteriormente, PTCH1 ejerce acción inhibitoria sobre SMO. Cuando se une el LHH cesa esta inhibición y SMO activa la vía de señalización. Además, en ausencia de PTCH1 o cuando éste se encuentra mutado, SMO activaría constitutivamente la vía canónica de señalización Hh. Sin embargo existe un control sobre esta vía dependiente de los niveles de las proteínas que lo componen: por un lado la señalización de SMO induce la transcripción de PTCH1, que actúa inhibiendo la actividad de SMO; por otro lado, los niveles de SMO dependen de la concentración de HH con lo que existiría un segundo control sobre la vía.<sup>108</sup> SMO además es un elemento fundamental en la vía de señalización no canónica tipo 2,<sup>75</sup> como se ha comentado anteriormente.

### 4.C.2. FAMILIA GLI

La familia de genes Gli codifican proteínas de transcripción con dedos de zinc. Se identificaron por primera vez mediante la amplificación del gen Gli1 en glioblastoma.<sup>109,110</sup> La función de Gli1 es activadora, y la de Gli 2 y Gli3 puede ser activadora o supresora.

Al activarse SMO se trasloca al cilio primario y promueve la transcripción de las proteínas Gli. A continuación, Gli forma un complejo con SUFU y KIF-7 y se trasloca de nuevo al cilio. Esta traslocación impide la acción de PKA sobre Gli, que degrada estas proteínas mediante fosforilación. Además, la traslocación libera Gli de SUFU, con lo que puede pasar al núcleo y activar la transcripción de genes proliferativos entre los que se encuentran el propio *Gli1*, *PTCH1* y *cliclina D1*.<sup>76</sup>

Gli 1 y Gli3 inhiben su expresión mutuamente. Por el contrario, Gli2 aumenta la de Gli1. La estimulación de la vía Hh induce la expresión de Gli1 y Gli2 y reprime la de Gli3. El factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 estimula Gli2 y Gli3. Los genes diana finales que serán transcritos favorecen la proliferación y supervivencia, entre los que se encuentran Wnt, factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa y factor de crecimiento de insulina tipo 2 (figura 9).<sup>82,111</sup>



**Figura 9.** Modelo de interacción de las proteínas Gli. Modificado de Cohen y cols. *Am J Med*

*Genet A.* 2003;123A:5-28

#### 4.C.3. SUFU

*SUFU* es un gen supresor tumoral que regula negativamente la vía Hh mediante la interacción con las proteínas Gli. Se caracteriza por tener un dominio PEST, formado por una secuencia de aminoácidos rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina. Este dominio se encuentra en proteínas que sufren una degradación rápida.<sup>112</sup> Se han descubierto tres transcritos diferentes de *SUFU* derivados de splicing alternativo.<sup>113</sup>

*SUFU* contiene otros dos dominios principales: una región conservada en el extremo carboxi-terminal que se une al dominio amino-terminal y se requiere para la unión de las proteínas Gli a la región amino-terminal.<sup>114</sup> *SUFU* regula negativamente la vía Hh

## INTRODUCCIÓN

formando complejos con las tres proteínas Gli, con lo que inhibe su función activadora de la transcripción.<sup>115</sup> La acción inhibitoria de SUFU se realiza mediante diferentes mecanismos: inicialmente se creía debida en al secuestro de Gli en el citoplasma (con lo que se impedía que pasara al núcleo y ejerciera su función),<sup>116,115</sup> pero también se ha demostrado que interviene en la estabilización de estas proteínas (SUFU antagoniza la proteína Spop, encargada de la degradación de Gli2 y Gli3) y en su procesamiento.<sup>115</sup>

Recientemente se ha demostrado que la inactivación de SUFU en la epidermis es suficiente para inducir CBC, aunque por el contrario la inactivación simultánea de SUFU y Kif7 (otra proteína implicada en la regulación de las proteínas Gli) conlleva el desarrollo de CBC superficial.<sup>115</sup>

### **4.D. INTERACCIÓN DE LA VÍA HEDGEHOG CON OTRAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN**

La vía de señalización Hh interactúa con otras vías entre las que se encuentran la del TGF- $\beta$ , el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor de crecimiento insulín-like (IGF), factor de necrosis tumoral (TNF) y Wnt, de modo que todas ellas modulan la patología del cáncer (figura 10).<sup>76</sup>

- Vía de señalización Wnt. La ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina tiene como diana la región determinante de codificación de la proteína de unión. Ésta se une al mRNA de Gli 1 y lo estabiliza, favoreciendo el crecimiento tumoral. Por otro lado la ruta Hh puede

## INTRODUCCIÓN

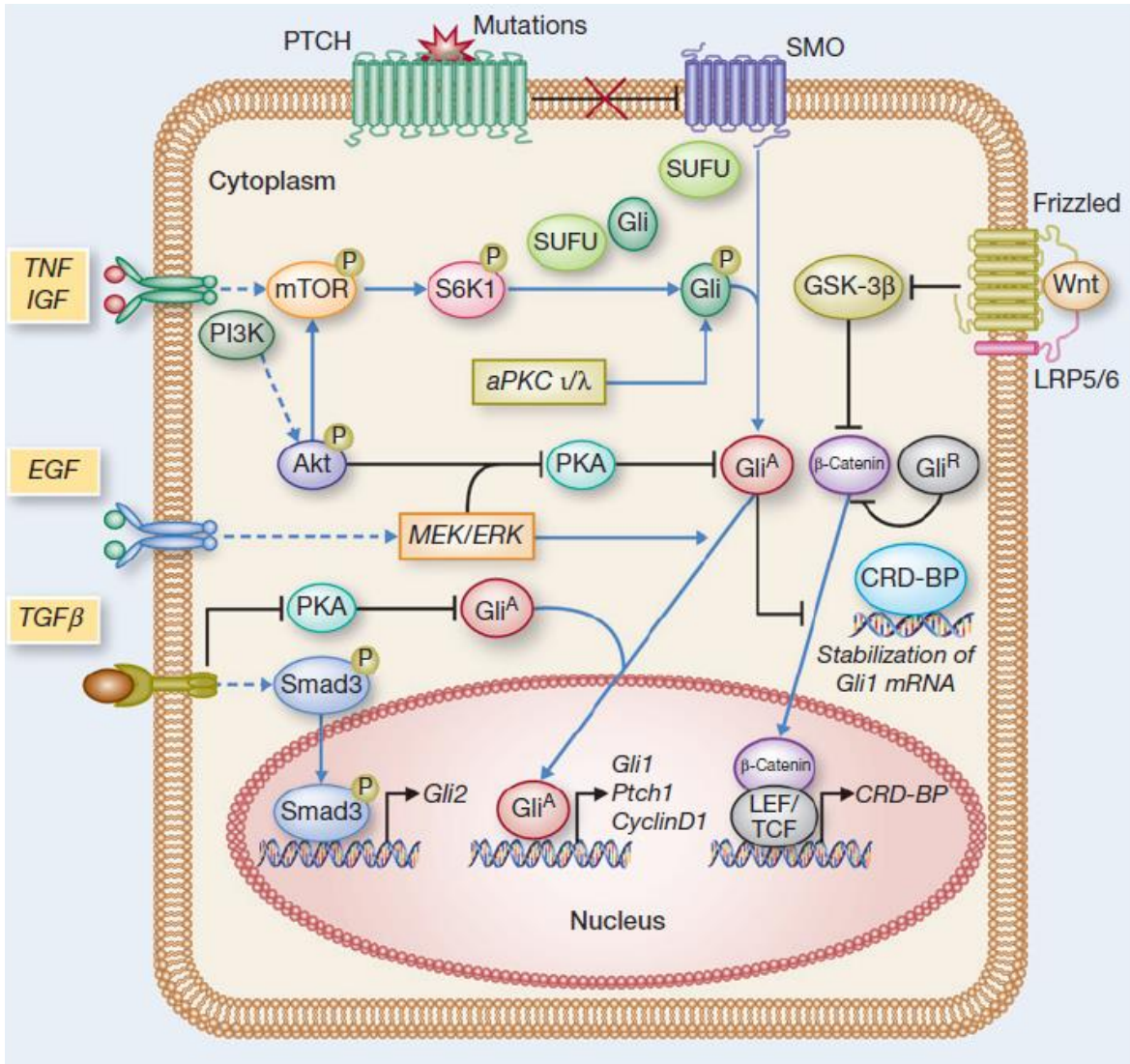
regular la vía Wnt impidiendo el paso al núcleo de la  $\beta$ -catenina.<sup>76</sup> Se ha demostrado aumento de la actividad de la vía Wnt en CBCs.<sup>72</sup>

- Vía mammalian target of rapamycin (mTOR)/S 6 kinasa 1(S6K1). La activación de esta ruta promueve la actividad transcripcional de Gli1, liberándolo de su inhibidor SUFU. Se trata, por tanto, de una activación de la vía Hh independiente de SMO. La inhibición de mTOR/S6K1 mediante rapamicina aumenta los efectos de SUFU y la silenciamiento de la señalización de la vía Hh. Esta interacción ha sido demostrada en cáncer de esófago.<sup>117</sup>

- Vía IGF/Fosfoinosítido-3-quinasa (PI3K)/Akt. La activación de PI3K–Akt impide la fosforilación de las proteínas Gli1 y Gli 2 por parte de PKA, que tiene como resultado la degradación de las proteínas Gli. De esta manera, la activación de la ruta IGF/PI3K/Akt aumenta la actividad de Gli1 y Gli2.<sup>72,76</sup>

- Vía EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK y vía del TGF- $\beta$ . Al igual que la vía anterior, ambas inhiben la acción de PKA sobre Gli. Además, TGF- $\beta$  puede inducir la expresión de Gli-2 por medio de la proteína Smad-3.<sup>76</sup>

## INTRODUCCIÓN



*Figura 10. Esquema de interacción entre la vía Hedgehog y otras rutas de señalización. Extraído de Athar y cols. Cancer Res; 74; 4967–75.*

## **5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS**

### **5.A. HISTOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN DEL CARCINOMA BASOCELULAR**

El CBC es un tumor de crecimiento lento con muy baja mortalidad.<sup>3</sup> El CBC esporádico aparece preferentemente en áreas fotoexpuestas, fundamentalmente en cara y cuello (80%). La segunda localización por frecuencia es el tronco (15%), y en los casos restantes se encuentra en extremidades. De manera excepcional se localizan en área genital, mamas, axilas o palmas y plantas.<sup>2,4</sup> Las localizaciones más frecuentes cambian en el SG: los hombres tienden a tener más lesiones en el tercio superior de espalda, extremidades superiores y la zona M facial, mientras que en las mujeres los CBC se desarrollan en mayor número en el cuero cabelludo, espalda y extremidades inferiores.<sup>28</sup> Aunque los CBC en el SG afectan tanto a zonas fotoexpuestas como a no fotoexpuestas, existe un ligero predominio en áreas expuestas, lo que puede indicar que la radiación solar influye en la patogénesis tumoral.<sup>118</sup>

Histológicamente el CBC se caracteriza por tumores compuestos por agregados de células que recuerdan a las de la capa basal de la epidermis y el folículo piloso.<sup>119</sup> Estas células se denominan células basaloides, y tienen un núcleo hipercromático y escaso citoplasma.<sup>120</sup> Se ordenan frecuentemente “en empalizada” en la periferia tumoral, separándose del estroma por espacios ópticamente vacíos en las preparaciones histológicas.<sup>119</sup> Los agregados de células basaloides se organizan en forma de lóbulos, islotes, nidos o cordones.<sup>78</sup> Pueden contener depósitos de calcio en el interior tumoral, amiloide, o tener un estroma fibromixoide.<sup>120</sup> Además pueden existir cambios quísticos o



## INTRODUCCIÓN

necrosis central en el interior del tumor.<sup>78</sup> Al contrario que los tricopiteliomas los CBC expresan Bcl-2 y su estroma no expresa CD-34. La expresión de Ber-EP4 en los CBCs es positiva y negativa en los CECs.<sup>120</sup> Además, expresan de manera constante CK5 y CK14, mientras que la expresión de CK 19 es variable.<sup>3</sup>

Los CBCs tienen diferentes patrones de crecimiento a nivel histológico, y algunas de estas variantes tienen características clínicas que los diferencian de las demás.<sup>78</sup> La proporción de cada subtipo histológico de CBC es similar tanto en los pacientes que presentan CBC esporádicos como en el SG.<sup>28</sup>

- CBC nodular. Es el subtipo más frecuente y representa al 50-60% de estos tumores.<sup>2,78</sup> Afecta típicamente a áreas fotoexpuestas, generalmente en cabeza y cuello.<sup>3</sup> Se caracteriza por nódulos de células tumorales basaloides rodeados de una “empalizada” periférica, que se extienden hasta dermis reticular o incluso más profundamente.<sup>121</sup> Pueden mostrar distintos tipos de diferenciación: quística, adenoidea, infundibuloquística, pigmentada y basoescamosa o metatípica.<sup>78,119</sup> Característicamente los nódulos tienen límites bien definidos y el estroma circundante es ligeramente mixoide.<sup>122</sup> Clínicamente se presenta como una pápula o placa perlada de crecimiento lento, con borde sobreelevado, telangiectasias y, ocasionalmente, costra o ulceración central (figura 11).<sup>4,123</sup>



**Figura 11.** *Carcinoma basocelular nodular*

- CBC superficial. Es el segundo subtipo más frecuente y constituye aproximadamente un 15% de los CBC.<sup>78</sup> Se localizan típicamente en el tronco, y se caracterizan por pequeñas proyecciones de células basaloides desde la epidermis y los anejos hacia la dermis papilar, en uno o múltiples focos tumorales.<sup>3,122,121</sup> Clínicamente se presentan como una pápula o placa eritematosa y descamativa poco sobreelevada, con un margen perlado fino y posibles erosiones y costras en la superficie (figura 12).<sup>4,78,123</sup> Puede confundirse clínicamente con enfermedad de Bowen, psoriasis, dermatitis subaguda y crónica, tiñas o queratosis liquenoides.<sup>78,123</sup> Es importante tener en cuenta que el borde verdadero de esta variante tumoral se encuentra habitualmente más allá del borde visible clínicamente. Además, los CBC superficiales de tamaño mayor de 1,5 centímetros de diámetro presentan frecuentemente componente infiltrativo.<sup>123</sup>



**Figura 12.** *Carcinoma basocelular superficial.*

- CBC micronodular. Se asemeja al CBC nodular, pero sus nódulos son de menor tamaño, similares a los del folículo piloso.<sup>78,121</sup> El contorno tumoral es bien definido y redondeado, pero a diferencia del CBC nodular el estroma no es de predominio mixoide y tiene mayor contenido de colágeno.<sup>122</sup> Puede presentar infiltración perineural y con mayor frecuencia los márgenes quirúrgicos pueden infraestimarse.<sup>121</sup>

- CBC infiltrante. Representa un 5% de todos los CBCs y se localiza en cabeza y cuello de adultos mayores.<sup>78</sup> Histológicamente se caracteriza por pequeños grupos de células tumorales que no ocupan la totalidad del espacio que infiltran. La dermis no se encuentra alterada y no presenta fibrosis entre los haces tumorales. Además, al infiltrar de manera difusa, el ratio tumor/dermis es bajo, por lo que en las preparaciones histológicas se aprecia más la dermis que el tumor.<sup>123</sup> No tiene características clínicas especiales,<sup>78</sup> aunque en algunos casos son placas poco sobreelevadas, de aspecto cicatricial, que asemejan a un CBC morfeiforme.<sup>123</sup> Sin embargo, a diferencia del CBC morfeiforme o esclerodermiforme, el CBC infiltrativo no presenta fibrosis en el estroma.<sup>121</sup>

## INTRODUCCIÓN

- CBC morfeiforme, de tipo esclerosante, desmoplásico, fibrosante o cicatricial.

Constituye un 3% de los CBCs y se localiza fundamentalmente en la cabeza y cuello de ancianos.<sup>78</sup> Son tumores planos caracterizados por áreas de fibrosis entre los islotes de células tumorales. Algunos CBC morfeiformes no muestran fibrosis en la dermis del borde tumoral, haciendo que estas zonas se asemejen a un CBC infiltrativo. Clínicamente son pápulas o placas poco sobreelevadas, de coloración amarillenta o blanquecina, que asemejan placas de morfea o una cicatriz. No suelen ulcerarse. Tienden a extenderse de manera lateral en la dermis en vez de profundizar hacia tejido celular subcutáneo o infiltrar las capas musculares.<sup>123</sup> Es difícil distinguir clínicamente los márgenes<sup>78</sup> y se trata de una variante con mayor agresividad.<sup>3</sup>

- CBC metatípico o basoescamoso. Es una forma infrecuente que combina características histológicas de CBC con CEC, con áreas de diferenciación basaloide y otras de diferenciación escamosa, con posible queratinización focal. Clínicamente puede crecer tan rápido como un CEC e incluso metastatizar.<sup>123</sup>

- Fibroepitelioma de Pinkus. Es una forma rara que aparece preferentemente en áreas no fotoexpuestas del tronco en adultos entre los 40-60 años.<sup>124</sup> Las células basaloideas se anastomosan entre sí en la dermis y tienen un aspecto en red que se dispone sobre un estroma pálido.<sup>3</sup> Inicialmente son lesiones planas, asintomáticas, de lento crecimiento que pueden evolucionar a grandes tumores.<sup>124</sup>

- CBC queratótico. En la clasificación propuesta por LeBoit para la OMS en 2005 figura el CBC queratótico, caracterizado por la presencia de queratina en el interior de las islas tumorales. La arquitectura principal de estos tumores se asemeja a la de los CBC

## INTRODUCCIÓN

nodulares. La queratinización puede ser laminada de tipo infundibular, bien hialina de tipo triquilemal, o bien con células fantasma queratinizadas con diferenciación pilomatricial. Puede existir también calcificación distrófica. Se distingue del CBC basoescamoso por la presencia de pequeños quistes de queratina. Además, el CBC basoescamoso es habitualmente de mayor tamaño y de límites menos circunscritos.<sup>121</sup>

- Otras variantes. En la clasificación de la OMS se reflejan otras variantes infrecuentes, como son el CBC adenoide, el CBC quístico y el CBC infundibuloquístico.<sup>121</sup>

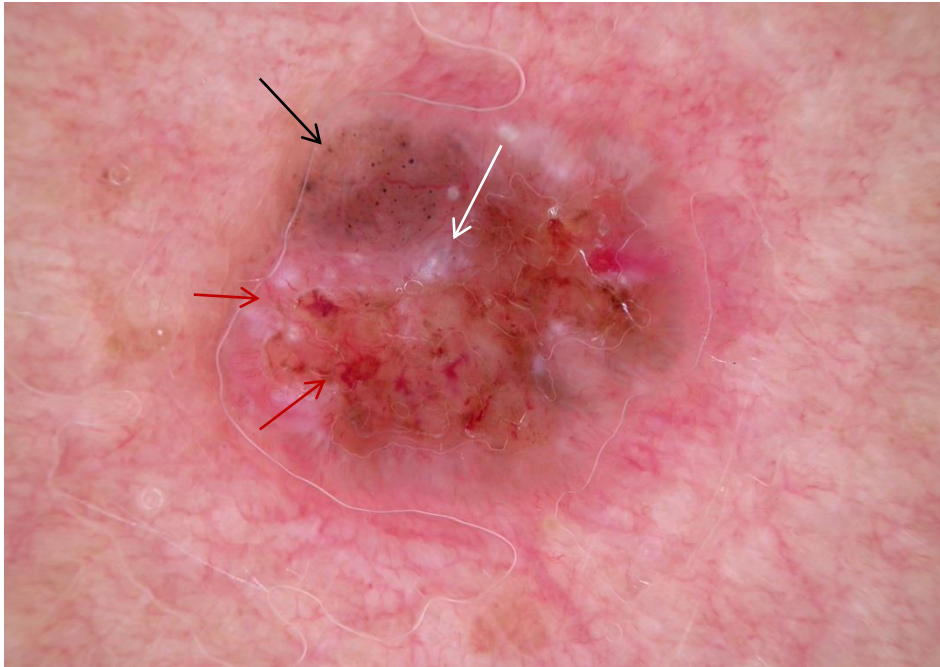
Se ha descrito también un patrón mixto, caracterizado por mezcla de dos variantes de CBC en el mismo tumor, generalmente nodular y micronodular. En una gran serie de 1039 tumores el 38,5% de las muestras presentaron un patrón mixto, seguido por las variantes histológicas nodular (21%), superficial (17%), micronodular (15%), infiltrativo (7%) y morfeiforme (1%).<sup>122</sup>

Todas las variantes de CBC pueden presentar o no pigmento, visible clínica e histológicamente. En la serie anterior de 1039 CBC el 6,7% de los tumores presentaron pigmento. Las variantes histológicas pigmentadas más comunes en ese estudio fueron nodular/micronodular y superficial, distribuyéndose con la misma frecuencia que los CBC no pigmentados.<sup>125</sup>

La dermatoscopia es una herramienta útil para diagnosticar los CBCs y fundamentalmente para diferenciar los pigmentados del melanoma. Los criterios dermatoscópicos incluyen la ausencia de criterios de lesión melanocítica y la presencia de al menos uno de las siguientes características: nidos ovoides azul-gris, glóbulos múltiples

## INTRODUCCIÓN

azul-gris, áreas en hoja de arce, estructuras en rueda de carro, erosiones múltiples, ulceración, telangiectasias arborescentes, telangiectasias finas superficiales, puntos grisáceos “al enfocar”, áreas rojo-blanquecinas desestructuradas y crisálidas (manchas blanquecinas de pequeño tamaño) (figura 13).<sup>126,127</sup>



**Figura 13.** *Dermatoscopia de un carcinoma basocelular. Se pueden apreciar nidos ovoides y glóbulos azul-gris (flecha negra), telangiectasias enfocadas (flecha roja) y áreas rojo blanquecinas (flecha blanca).*

### **5.B. FACTORES DE RIESGO Y PRONÓSTICO EN FUNCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE CADA CARCINOMA BASOCELULAR**

Los CBCs son tumores con baja mortalidad pero pueden infiltrar de manera agresiva los tejidos de alrededor y destruirlos.<sup>3</sup> Presentan un crecimiento lento y muy bajo poder metastásico, que oscila entre el 0,0028% al 0,55% de los casos. Las metástasis son más frecuentes en tumores de cara y orejas, y el primer sitio en el que se encuentran son los ganglios linfáticos locorreionales, seguido del hueso, pulmón e hígado.<sup>4</sup>

Entre los factores de riesgo que condicionan una mayor agresividad se encuentran el diámetro mayor de 2 cm, la localización en la cara (sobre todo en la zona de la mitad de la cara, nariz y orejas), la larga evolución, los bordes afectados en la extirpación, los patrones histológicos morfeiforme y basoescamoso y la invasión perineural o perivascular.<sup>3,4</sup> Los tumores con bordes mal definidos o que en profundidad abarcan más del área clínicamente visible se asocian frecuentemente con márgenes positivos y por tanto tienen mayor riesgo de recurrencia.<sup>4</sup>

En el SG los CBC tienden a asentarse en áreas que condicionan un mayor riesgo, como la zona M en los hombres y el cuero cabelludo en mujeres. Aunque la frecuencia de cada subtipo es similar a lo publicado para la población con CBC esporádicos, la mayor frecuencia en estas localizaciones confiere un mayor riesgo.<sup>28</sup>

**5.C. MANIFESTACIONES CUTÁNEAS Y EXTRACUTÁNEAS DEL SÍNDROME DE GORLIN. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS RECOMENDADAS.**

El SG se transmite de manera autosómica dominante, con alta penetrancia y expresividad variable, incluso en miembros de la misma familia. Esto implica que las distintas manifestaciones clínicas que caracterizan a esta enfermedad se presentan de manera diferente y con diversos grados de agresividad en cada paciente. Hasta la fecha no se ha conseguido establecer una correlación entre el fenotipo y el genotipo.<sup>104</sup>

El SG se diagnostica con arreglo a una serie de criterios diagnósticos: dos mayores o uno mayor y dos menores. La primera serie de criterios diagnósticos fue propuesta por Evans en 1993, pero posteriormente otros autores propusieron otras clasificaciones: Shanley en 1994, Kimonis en 1997 y 2004 y Jones en 2011 (tablas 2a y 2b).<sup>26,29,30,128,129</sup> En 2011 se publicó un documento de consenso con nuevos criterios diagnósticos; en este trabajo se incluyó por primera vez el estudio molecular como criterio diagnóstico, siendo necesarios para el diagnóstico dos criterios mayores, un criterio mayor y dos menores o un criterio mayor y la confirmación molecular.<sup>130</sup> Sin embargo, no existe un estudio hasta la fecha que evalúe la sensibilidad y especificidad de las diferentes propuestas de criterios diagnósticos.<sup>104</sup>



## INTRODUCCIÓN

**Tabla 2a.** *Diferentes criterios diagnósticos publicados en el síndrome de Gorlin*

	EVANS 1993	KIMONIS 1997	KIMONIS 2004
<b>CRITERIOS MAYORES</b>	≥ 2 CBCs, 1 CBC en < 30 años o > 10 nevus basocelulares	≥ 2 CBCs o 1 CBC en < 20 años	≥ 2 CBCs o 1 CBC en < 20 años
	> 1 queratoquiste odontogénico con confirmación histológica o un quiste óseo polioestótico	Queratoquistes odontogénicos con confirmación histológica	Queratoquistes odontogénicos con confirmación histológica
	≥ 3 pits palmoplantares	≥ 3 pits palmoplantares	≥ 3 pits palmoplantares
	Calcificación lamelar o en < 20 años de la hoz cerebral	Calcificación bilamelar de la hoz cerebral	Calcificación lamelar de la hoz cerebral
		Costillas bífidas, fusionadas o muy separadas	Anomalías costales: bífidas, sinostosis, hipoplásicas
			Imágenes radiolucientes en llama en las falanges
			Braquimetaropia-braquimetatarsia en las 4 extremidades
			Meduloblastoma
			Fibroma ovárico
		Antecedentes familiares de SG	Familiar de primer grado con SG
<b>CRITERIOS MENORES</b>	Anomalías esqueléticas: costillas bífidas, fusionadas, separadas o vértebras bífidas, en cuña o fusionadas.	Anomalías esqueléticas: deformidad de Sprengel, deformidad pectoral, sindactilia	Espina bífida oculta u otras anomalías vertebrales
		Anomalías radiológicas: puente de la silla turca, anomalías vertebrales (hemivértebras, fusión o elongación de cuerpos vertebrales), defectos de modelado o radiolucencias en llama en manos o pies	
	Circunferencia occipito-frontal > p97 con abombamiento frontal	Macrocefalia tras ajuste por altura	
	Fibroma ovárico o cardiaco	Fibroma ovarico	
	Meduloblastoma	Meduloblastoma	
	Malformaciones congénitas: labio o paladar hendido, polidactilia, anomalías oculares (catarata, coloboma, microftalmia)	Malformaciones congénitas: paladar o labio hendido, abombamiento frontal, rasgos faciales toscos, hipertelorismo	Hipertelorismo o telecantus
			Abombamiento frontal
			Braquimetaropia-metatarsia

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 2b.** *Diferentes criterios diagnósticos publicados en el síndrome de Gorlin*

	JONES 2011	BREE 2011
<b>CRITERIOS MAYORES</b>	Múltiples CBC (> 5 CBC) o un CBC en < 30 años	CBC en < 20 años o número excesivo de CBC para la exposición solar y fototipo
	Calcificación lamelar de la hoz cerebral o evidencia de calcificación en < 20 años	Calcificación lamelar de la hoz cerebral
	Queratoquistes mandibulares	Queratoquistes mandibulares en < 20 años
	≥ 2 pits palmo-plantares	Pits palmo-plantares
	Familiar de primer grado con SG	Familiar de primer grado con SG
		Meduloblastoma
<b>CRITERIOS MENORES</b>	Meduloblastoma en la infancia	
	Quistes linfomesentéricos o pleurales	Quistes linfomesentéricos
	Macrocefalia (circunferencia occipitofrontal > p97)	Macrocefalia
	Labio o paladar hendido	Labio o paladar hendido
	Anomalías vertebrales o costales como costillas bífidas/separadas/extra o vértebras bífidas	Anomalías costales
	Polidactilia preaxial o postaxial	Otras anomalías esqueléticas y cambios radiológicos (anomalías vertebrales, cifoescoliosis, 4 metacarpiano corto, polidactilia postaxial)
	Fibromas ováricos o cardíacos	Fibromas ováricos o cardíacos
	Anomalías oculares (cataratas, defectos del desarrollo, cambios pigmentarios del epitelio de la retina)	Anomalías oculares (estrabismo, hipertelorismo, catarata congénita, glaucoma, coloboma)

5.C.1. MANIFESTACIONES CUTÁNEAS

- Carcinoma basocelular, cuyas características se han comentado anteriormente.

- Pits palmoplantares. Son una manifestación frecuente y se encuentran entre el 70-87% de los enfermos según las series.<sup>29,128</sup> Entre el 30% y el 65% de los pacientes con SG presentan pits palmo-plantares antes de 10 años de edad, aumentado este porcentaje hasta el 80% a los 15 años.<sup>31</sup> Son depresiones puntiformes, de 2-3 mm de diámetro, que aparecen en palmas y en plantas y más raramente en otras áreas como el dorso, laterales de dedos y pliegues interdigitales.<sup>29</sup> Su color es variable, pero pueden ser mejor visualizados tras sumergir las manos en agua durante 10 minutos (figura 14).<sup>27</sup> Histológicamente son áreas de hipoqueratosis bien definidas, con hipogranulosis variable, paraqueratosis e hiperplasia de células basales, que forman empalizada en la periferia.<sup>131</sup>



*Figura 14. Pits palmoplantares*

## INTRODUCCIÓN

- Otras manifestaciones cutáneas. Hasta un 50% de los menores de 20 años y el 70% de los mayores de 20 años presentan nevus melanocíticos múltiples que pueden crecer rápidamente en un inicio, pero posteriormente se mantienen estables. Se han descrito quistes de millium hasta en un 30% de los pacientes, sobre todo en el párpado inferior y ocasionalmente en la frente. Así mismo, se pueden identificar quistes epidermoides en hasta el 50% de los enfermos, habitualmente localizados en el tronco.<sup>31</sup> La presencia de quistes epidermoides subconjuntivales es un hallazgo infrecuente y hasta la fecha se ha descrito únicamente en pacientes con SG.<sup>132</sup>

### 5.C.2. MANIFESTACIONES EXTRACUTÁNEAS

#### 5.C.2.a. Anomalías en el desarrollo

- Queratoquistes mandibulares u odontogénicos. Están presentes entre el 74-90% de los pacientes con SG.<sup>29,104</sup> Pueden iniciarse a los 4-5 años y su inicio se correlaciona con la edad del enfermo, apareciendo en el 75% de los casos antes de los 20 años.<sup>29</sup> Es rara su aparición en mayores de 30 años. Aparecen en áreas con dientes y se cree que provienen de la lámina dentaria. Son asintomáticos, se localizan en ambos lados de la mandíbula y habitualmente son múltiples en los pacientes con SG, con una media de 5 por enfermo (figura 15). Se caracterizan por presentar una capa fibrosa fina externa revestida en el interior por epitelio escamoso estratificado.<sup>31</sup> Se ha descrito su malignización ocasional dado lugar a ameloblastomas<sup>104</sup> y más raramente carcinoma epidermoide.<sup>27</sup>

## INTRODUCCIÓN



**Figura 15.** *Quistes odontogénicos.* Extraído de: Fujii et al. *Pediatr Int.* 2014;56:667-74.

- Manifestaciones no tumorales del sistema nervioso central. La más frecuente es la calcificación de la hoz del cerebro (figura 16). Está presente en el 65-79% de los enfermos, aunque también se encuentra en sanos, aunque con menor frecuencia.<sup>26,29,31,128</sup> Este hallazgo no se detecta en la infancia precoz<sup>79</sup> pero sí a partir de la adolescencia, encontrándose en el 37% de los menores de 20 años y en el 79% de los mayores de 20 años.<sup>26</sup> Son más raras la calcificación de la tienda del cerebelo, del ligamento petroclinoide y del diafragma sellae, así como el aspecto de puente de la silla turca. Existe retraso mental hasta en el 5% de los pacientes.<sup>31</sup>



**Figura 16.** *Calcificación de la hoz del cerebro. Extraído de Kimonis et al. Genet Med. 2004;6:495-502.*

- Características físicas. Los pacientes con esta enfermedad tienen una estatura alta a expensas fundamentalmente de aumento de tamaño de la mitad inferior del cuerpo.

- Anomalías faciales. Se ha detectado macrocefalia por encima de p95 en el 50% e hipertelorismo de más de 2 desviaciones estándar en el 42%-70%,<sup>29,31,133</sup> asociado en muchos casos a telecantus.<sup>29</sup> También se ha descrito mayor frecuencia de abombamiento de los huesos frontal, biparietal o temporal.<sup>27</sup> El paladar o labio hendido es un evento raro, que se manifiesta en el 5% de los pacientes. Recientemente se ha descrito un nuevo signo, la hiperplasia bilateral de los procesos coroideos mandibulares, que puede ser de utilidad en el diagnóstico precoz de esta enfermedad en población pediátrica.<sup>31</sup>

## INTRODUCCIÓN

- Alteraciones en vertebras y costillas. Entre el 38-49% de los pacientes presentan anomalías costales,<sup>29,134</sup> siendo la más común la presencia de costillas bífidas (26%), afectando la tercera, cuarta y quinta costilla.<sup>26</sup> Otras alteraciones costales, de mayor a menor frecuencia son: costillas separadas, fusionadas, ausentes, costillas cervicales y costillas rudimentarias.

Las malformaciones congénitas vertebrales también son frecuentes en estos pacientes. La más común es la escoliosis, presente en el 31-43% de estos pacientes,<sup>26,31</sup> pero la diferencia de frecuencia respecto a la población general no es estadísticamente significativa.<sup>26,29</sup> Es significativamente más frecuente que en individuos no afectados el proceso espinoso bífido, que aparece hasta en el 94% de los pacientes frente al 46% de la población general. Otras alteraciones menos comunes, en orden decreciente de frecuencia son: espina bífida oculta (presenta en un 19% de los pacientes, pero la diferencia con respecto a la población general no es estadísticamente significativa), hemivértebras, cuerpos vertebrales elongados, espondilolistesis y fusión de cuerpos vertebrales (estas dos últimas con diferencias no estadísticamente significativas).<sup>26</sup>

- Alteraciones de la escápula. Entre ellas destaca la elevación congénita de la escápula o enfermedad de Sprengel. Están presentes de manera variable en las series publicadas, con cifras entre el 11% y el 22% de los pacientes.<sup>26,31,134</sup>

- Alteraciones en miembros. La anomalía más relevante es el hallazgo de radiolucencias con forma de llama en radiografías de manos, un hallazgo presente en el 30% de los enfermos. Se ha descrito una mayor tasa de defectos de modelaje en manos y pies, de sindactilia, polidactilia y de acortamiento del quinto metacarpiano, pero no existen

## INTRODUCCIÓN

diferencias estadísticamente significativas con respecto a su frecuencia en la población general.<sup>27,26</sup>

- Alteraciones oculares y auditivas. Además del hipertelorismo, se ha descrito una mayor prevalencia de exoftalmus, nistagmo rotatorio, estrabismo interno, cataratas congénitas, coloboma del iris y coroides y microftalmia.<sup>31,133</sup> Entre las anomalías otológicas destacan la otosclerosis, la sordera de conducción y el angulamiento posterior de las orejas.<sup>133</sup>

- Otras. Los quistes linfomesentéricos y pleurales así como los quistes óseos polioestóticos se han descrito en estos pacientes, pero son un hallazgo infrecuente.<sup>31,135</sup>

### 5.C.2.b. Tumores no cutáneos

- Meduloblastoma. Es el tumor maligno cerebral más frecuente en la población pediátrica. La mayor parte de los casos son esporádicos, pero existen formas asociadas a síndromes genéticos entre los que destaca el SG.<sup>136</sup> El meduloblastoma aparece en un 1-5% de los enfermos con SG<sup>29,128</sup> y muchas veces es la primera manifestación de esta enfermedad.<sup>136</sup> Se desarrolla de media a los 2 años de edad, mientras que en la población general aparece entre los 7-8 años de edad.<sup>29,31,136</sup> Es más frecuente en varones que en mujeres, con un ratio 1,9:1.

El estudio molecular reciente de los meduloblastomas ha asociado las variantes histológicas desmoplásica y nodular con el SG e implicación patogénica de la vía Hh.<sup>136,137</sup>



## INTRODUCCIÓN

Se ha descrito clásicamente un mejor pronóstico en meduloblastomas asociados a SG, pero este dato puede estar infraestimado ya que aquellos pacientes que mueren de meduloblastoma en la infancia no han podido desarrollar otras manifestaciones y por tanto no son diagnosticados de esta enfermedad.<sup>136</sup> Esto viene apoyado por estudios moleculares recientes, en los que se concluye que el pronóstico de los meduloblastomas con alteraciones de la vía Hh es intermedio, con tasas de supervivencia global entre 60-80%.<sup>137</sup>

El tratamiento estándar es la cirugía en combinación con radio y quimioterapia. Sin embargo, el tratamiento radioterápico puede conducir a la aparición de CBC (además de meningioma, ependimoma y sarcomas) sobre el área de radiación en pacientes con SG, con un aumento de la morbi-mortalidad. Por esta razón es necesario identificar a estos pacientes para optimizar el tratamiento adyuvante.<sup>136</sup> Un 5% de los niños menores de 3 años y un 4,5% de los menores de 5 años con meduloblastoma tienen SG según algunas series, y de estos enfermos el 90% tienen signos radiológicos añadidos con características de esta enfermedad que permiten el diagnóstico de sospecha.<sup>138</sup>

- Fibromas ováricos y cardíacos. Los fibromas cardíacos son infrecuentes y se encuentran en un 2% de los enfermos. Están presentes ya en el nacimiento o al poco de nacer.<sup>104</sup> No son malignos pero pueden causar arritmias graves e insuficiencia cardíaca al causar estenosis valvular y dificultar la eyección.<sup>79</sup>

Los fibromas ováricos son generalmente un hallazgo incidental en una ecografía o en cesáreas.<sup>104</sup> Su prevalencia es desconocida, ya que no son detectados a no ser que causen síntomas o se encuentren calcificados.<sup>79</sup> En las distintas series se encuentra entre el 14-24% de las mujeres con SG<sup>29,128</sup> y suelen ser bilaterales hasta en el 75% de los casos.<sup>31</sup> Son

## INTRODUCCIÓN

asintomáticos y pueden aumentar de tamaño con el tiempo y calcificarse, pero su transformación maligna es infrecuente. Pueden causar problemas de fertilidad si producen torsión ovárica.<sup>104</sup>

- Otros tumores. Se han descrito meningiomas asociados a SG hasta en el 5% de los pacientes.<sup>26</sup> En algunos casos, estos tumores pueden aparecer en el área tratada con radioterapia (Rxt), con una latencia de 24 +/- 10 años.<sup>29</sup> Raramente pueden aparecer otros tumores craneales como astrocitoma, craneofaringioma y oligodendroglioma, muchas veces en el campo de Rxt.<sup>31</sup>

Otros tumores se han asociado de manera más infrecuente con esta enfermedad. Se han publicado 7 pacientes con SG que presentaron rabiomioma fetal.<sup>79,139,140</sup> Se han descrito también otros tumores y hamartomas como leiomiomas intestinales y mesentéricos, leiomiosarcomas, linfangioma adrenal quístico, adenoma tiroideo, linfangiomioma, melanoma, mesenquimoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, seminoma, schwannoma, adenoma pleomórfico parotídeo, carcinoma adenoide quístico de glándula salivar y tumores adrenales.<sup>31</sup>

### 5.C.2.c. Otras manifestaciones

Entre el 5 y el 10% de los varones afectados sufren hipogonadismo hipogonadotropo.<sup>31</sup> Se han descrito también casos aislados de criptorquidia e hipospadias.<sup>29</sup> Alrededor del 5% de los pacientes tienen alteraciones renales como riñón en herradura, agenesia renal unilateral, quistes renales y duplicación de la pelvis renal y uréter.<sup>31</sup>

### 5.C.3. PRUEBAS DIAGNOSTICAS COMPLEMENTARIAS Y RECOMENDACIONES PARA EL SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON SINDROME DE GORLIN

Existen escasas publicaciones en la literatura médica sobre qué pruebas diagnósticas deben ser realizadas en los pacientes con SG y no es hasta 2011 cuando se publica un documento de consenso que enumera las exploraciones complementarias recomendadas para el diagnóstico y seguimiento de estos enfermos.

En primer lugar, es importante minimizar las radiaciones ionizantes y es preferible emplear la resonancia magnética o la ecografía en los casos en que sea posible.

En todos los casos se recomienda una historia clínica completa que incluya antecedentes neonatales (hidrocefalia, macrocefalia, criptorquidia...), desarrollo psicomotor, intervenciones quirúrgicas (tumores cerebrales, labio o paladar hendido, extirpaciones cutáneas...) e historia de exposición a luz UV o radiaciones.<sup>130</sup>

La exploración física debe incluir la búsqueda de alteraciones faciales con medición de la circunferencia occipito-frontal ajustándola por la altura y un examen esquelético para detectar deformidad de Sprengel, escoliosis o anomalías del pectus. La evaluación dermatológica es importante y debe estar centrada fundamentalmente en la detección de CBC, pits palmoplantares y alteraciones de los dedos.<sup>29,104,130</sup> La valoración dermatológica debe realizarse anualmente hasta la aparición del primer CBC y, posteriormente, tan frecuente como sea necesario.<sup>130</sup> Así mismo, se recomienda evaluación oftalmológica basal y anual durante la edad pediátrica y en la edad adulta si existen síntomas.<sup>104,130</sup> Se

## INTRODUCCIÓN

recomienda además valoración psicológica y, en la edad pediátrica, seguimiento del desarrollo psicomotor y detección de dificultades del aprendizaje.<sup>130</sup>

El estudio genético puede ser de importancia y constituye uno de los criterios mayores propuestos en el consenso de 2011;<sup>130</sup> sin embargo, sólo se consigue demostrar mutación en *PTCH* en alrededor del 60-80% de los pacientes que cumplen criterios clínicos diagnósticos<sup>27,30</sup> y además es una técnica cara.<sup>27,130</sup> Por ello, en este documento se recomienda realizar estudio genético en tres supuestos: en el diagnóstico prenatal si se conoce la mutación en la familia; para un diagnóstico de confirmación en pacientes que presentan algunos signos de enfermedad pero no cumplen los criterios diagnósticos; o como test predictivo en individuos con riesgo de presentar la enfermedad, que no cumplen criterios diagnósticos pero tienen un familiar afectado.<sup>130</sup>

### 5.C.3.a. Pruebas complementarias en paciente pediátrico

Es importante tener en cuenta la edad de aparición de las manifestaciones de la enfermedad para elegir las pruebas diagnósticas necesarias.

Se recomiendan radiografías simples de cráneo, parrilla costal y columna vertebral para descartar varios de los criterios menores de la enfermedad presentes desde el nacimiento.<sup>29</sup> Además, las radiografías de manos y pies pueden ser útiles para detectar los criterios menores que se manifiestan en estas localizaciones.<sup>26</sup>

## INTRODUCCIÓN

El riesgo de meduloblastoma es mayor entre los 2 y 3 años de edad, pero puede aparecer hasta los 7 años. Por ello, se recomienda seguimiento neurológico y resonancia magnética cerebral anual hasta los 7-8 años de edad.

Los queratoquistes odontogénicos aparecen a partir de los 4 años de edad, por lo que se recomienda ortopantomografía digital anual en los pacientes con sospecha o diagnóstico confirmado desde que el niño colabore hasta la aparición del primer queratoquiste.<sup>29,130</sup> Otros autores recomiendan el inicio del cribado a los 8 años.<sup>104</sup> Esta exploración debe repetirse cada 6 meses hasta que pasen dos años sin nuevas lesiones o hasta que el paciente cumpla 21 años.<sup>130</sup>

También se recomienda una ecografía en mujeres asintomáticas en la menarquia o a los 18 años (o antes si existen síntomas) para descartar fibromas ováricos.<sup>29,130</sup> Aunque los fibromas cardiacos son infrecuentes y asintomáticos, puede realizarse un ecocardiograma en el primer año de vida para detectarlos.<sup>104,130</sup>

### 5.C.3.b. Diagnóstico de síndrome de Gorlin en el paciente adulto

Si se sospecha esta enfermedad en el adulto pueden realizarse las pruebas anteriores ya que los síntomas ya se habrán desarrollado.

Se recomienda una resonancia cerebral basal, ortopantomografías anuales si el paciente presenta síntomas y una ecografía ginecológica basal.<sup>130</sup> La radiografía craneal

para el diagnóstico de calcificación de la hoz cerebral puede ser de utilidad,<sup>26,104</sup> teniendo en cuenta que este hallazgo se produce a partir de la adolescencia.

En el paciente adulto puede ser necesario consejo genético y ayuda psicológica. Si el paciente tiene antecedente de meduloblastoma se recomienda seguimiento anual en Neurología. En mujeres es importante la valoración ginecológica y obstétrica para descartar fibromas ováricos, consejo prenatal y seguimiento del embarazo para detección precoz de signos de la enfermedad en el feto (fibromas cardíacos, macrocefalia o hidrocefalia).<sup>130</sup>

### **6. PREVENCIÓN PRIMARIA DEL CARCINOMA BASOCELULAR**

Los pacientes con alto riesgo de desarrollar CBC y especialmente los afectados con SG necesitan protegerse de la radiación UV, para lo que se recomienda evitar la exposición solar, sobre todo en las horas centrales del día y emplear ropa para cubrirse, gafas de sol y crema fotoprotectora de factor alto.<sup>31,133</sup>

Entre los fármacos sistémicos empleados para la quimioprevención de CBC en SG y pacientes de alto riesgo se ha propuesto la isotretinoína oral; para conseguir que se retrase el desarrollo de CBC en pacientes con SG deben emplearse altas dosis durante largos periodos, lo que conlleva una intensificación de los efectos secundarios. Además, las lesiones recurren al suspender el fármaco.<sup>133</sup> Se ha ensayado también la quimioprevención con tazaroteno en pacientes con SG, sin haberse encontrado un efecto quimiopreventivo o quimioterapéutico.<sup>141</sup>

## **7. TRATAMIENTO**

Debido a que el CBC tanto esporádico como en el SG raramente metastatiza, su tratamiento se basa en el control local de la enfermedad.<sup>4</sup> Los objetivos principales del tratamiento que marca la NCCN (National Comprehensive Cancer Network) son la curación con la mayor preservación de la función y cosmeticidad.<sup>142</sup>

El tratamiento del CBC puede ser tanto quirúrgico como no quirúrgico.<sup>4</sup> Algunas de las técnicas como la Rxt, crioterapia, curetaje y la terapia fotodinámica no permiten tener la confirmación histológica de la completa desaparición del tumor y por ello se emplean fundamentalmente en el tratamiento de tumores de bajo grado. La excepción es la Rxt, que, aunque no permite la confirmación de ausencia tumoral, tiene un papel importante en el manejo del CBC de alto riesgo.<sup>143</sup> Por tanto, para elegir la modalidad de tratamiento es necesario catalogar el CBC como de bajo o alto riesgo. Los factores clínicos que definen el alto riesgo son: crecimiento infiltrativo en los bordes, tamaño (mayor de 1 cm en cabeza y cuello y mayor de 2 cm en resto del cuerpo), localización (riesgo intermedio en frente, mentón, mejillas, cuero cabelludo y cuello; alto riesgo en nariz y áreas periorificiales) e historia de Rxt previa.<sup>144</sup> Entre los factores histológicos de alto riesgo se encuentran la invasión perineural y los subtipos histológicos morfeiforme, esclerosante, infiltrante y metatípico, con controversia acerca de la agresividad del subtipo superficial.<sup>144,145</sup>

## 7.A. TRATAMIENTO QUIRURGICO

### 7.A.1. TÉCNICAS NO ABLATIVAS

Tanto la extirpación quirúrgica simple como la cirugía de Mohs son especialmente efectivas en el cuerpo, con tasas de curación a 5 años del 99%. En la cabeza este porcentaje es menor y disminuye al aumentar el tamaño tumoral, siendo del 97% si el diámetro es menor de 6 mm y del 92% si el diámetro es igual o mayor a 6 mm.<sup>4</sup>

#### - Extirpación quirúrgica con control de márgenes

Consiste en la extirpación tumoral aplicando un margen de seguridad. Los bordes laterales y profundos son examinados en muestras congeladas intraoperatorias o mediante cortes verticales de la pieza quirúrgica en parafina.<sup>143</sup>

Las tasas de recidiva varían en función del cirujano, el tipo de tumor, la localización, el tamaño y si es recurrente.<sup>123</sup> Esta técnica se considera efectiva en CBC primarios, con una tasa de recurrencia menor del 2% en 5 años.<sup>142,143</sup> Se aconseja una escisión que abarque el tejido celular subcutáneo si la localización anatómica lo permite.<sup>143</sup> El margen lateral recomendado para lesiones menores de 2 cm es de 4-5 mm, con lo que se extirparían por completo el 95% de los CBC. En CBC grandes o esclerodermiformes las tasas de escisión completa disminuyen al 82% con 5 mm de margen lateral, por lo que el margen debe ser mayor.<sup>143,145,146</sup>

La escisión incompleta ocurre en un 5-7% de los casos y se produce cuando uno de los márgenes está afectado por el tumor o se encuentra muy cerca. El riesgo de recurrencia



## INTRODUCCIÓN

es mayor si se encuentran afectados simultáneamente los bordes lateral y profundo y cuando la escisión incompleta se produce sobre un CBC recurrente, sobre todo los tratados con Rxt previa.<sup>143</sup> Los márgenes positivos, más frecuentes en lesiones faciales y CBC esclerodermiformes, se asocian con una tasa de recurrencia del 26% a los 5 años, mientras que los tumores de estas características con bordes libres recidivan en un 14%.<sup>145</sup>

El CBC recurrente es más difícil de tratar y muestra tasas de curación inferiores a las de CBC primarios; en estos casos se recomienda extirpación con márgenes laterales de 5-10 mm.<sup>143,145</sup>

La extirpación y análisis posterior de márgenes quirúrgicos es un buen tratamiento para el CBC primario (fuerza de recomendación A, nivel de evidencia I), para el CBC de alto riesgo extirpado de manera incompleta con anterioridad y para el CBC recurrente, incluyendo un margen periférico de 5-10 mm (fuerza de recomendación A, nivel de evidencia II).<sup>143</sup>

### - Extirpación mediante cirugía de Mohs

La cirugía micrográfica de Mohs (CMM) es una técnica para la extirpación de tumores cutáneos complejos o de márgenes más definidos, en la que se estudian histológicamente el 100% de los bordes quirúrgicos. Para poder analizar los márgenes de la pieza quirúrgica, el cirujano la divide en partes que orienta en el espacio y que son incluidas de manera individual en moldes de parafina para el análisis histológico.<sup>147</sup> Mediante esta técnica la tasa de curación a 5 años de CBC primarios es del 99%, y del 94,4% en CBC recurrentes.<sup>145</sup>

## INTRODUCCIÓN

Las CMM está indicada para el tratamiento del CBC si el tumor asienta sobre localización de alto riesgo (área centrofacial, periorbitaria, nariz, labios y orejas); cuando mide más de 2 cm; si pertenece a los subtipos histológicos morfeiforme, infiltrativo, micronodular y basoescamoso, o presenta infiltración perineural; cuando la definición clínica de los márgenes es difícil; y si se trata de un tumor recurrente.<sup>143</sup>

La academia americana de dermatología, junto con el colegio americano de cirugía de Mohs y las sociedades americanas de cirugía dermatológica y cirugía de Mohs han establecido criterios menos estrictos. Consideran apropiado el uso de CMM no sólo en CBC recurrentes y primarios agresivos independientemente de la localización, sino también en CBC primarios nodulares de cabeza y cuello, genitales, areolas mamarias, manos, pies, tobillos y área pretibial. Además, se establece como apropiado el empleo de CMM en tratamiento de CBC sobre áreas previamente irradiadas, sobre cicatrices traumáticas, úlceras, zonas de inflamación crónica y en síndromes genéticos.<sup>147</sup>

A pesar de estas indicaciones, en un ensayo controlado no se encontraron diferencias significativas entre la extirpación quirúrgica convencional y la CMM en el tratamiento de CBC primarios faciales.<sup>148</sup> No obstante, algunos autores creen que pueden existir sesgos en relación con la randomización y estiman corto el periodo de seguimiento.<sup>149</sup> No se han encontrado ensayos clínicos aleatorizados sobre el tratamiento quirúrgico del área periocular.<sup>150</sup>

La CMM es un buen tratamiento para CBC de alto riesgo primario y recurrente (fuerza de recomendación A, nivel de evidencia I).<sup>143</sup>

### 7.A.2.TÉCNICAS ABLATIVAS

Se emplean preferentemente en el tratamiento de CBC de bajo riesgo.<sup>143</sup>

#### - Curetaje y electrocoagulación

Se reserva para CBC primarios de bajo riesgo (bien definidos, de pequeño tamaño, de histología no agresiva) y fuera de la localización de cara y cuello.<sup>143,145</sup> En estos casos, la tasa de curación a los 5 años es entre el 92%-97% según las series,<sup>142,145</sup> aunque estas cifras disminuyen al 79% en localizaciones de alto riesgo y al 73% para variantes histológicas de alto riesgo;<sup>142</sup> puede asociarse posteriormente con crioterapia,<sup>151</sup> imiquimod y terapia fotodinámica (TFD) con mayor eficacia. No es recomendable en CBC recurrentes<sup>143</sup> ni para los de gran tamaño o de alto riesgo.<sup>145</sup>

Esta técnica se considera un buen tratamiento para CBC de bajo riesgo con fuerza de recomendación A y nivel de evidencia II, pero un mal tratamiento para CBC de alto riesgo y recurrente con fuerza de recomendación D y nivel de evidencia II.<sup>143</sup>

#### - Crioterapia

Las indicaciones y resultados son similares a las del curetaje y electrocoagulación.<sup>4,145</sup> También se considera un buen tratamiento para CBC de bajo riesgo con fuerza de recomendación A y nivel de evidencia II.<sup>143</sup>

### - Láser CO<sub>2</sub>

No es un tratamiento extendido y existe poca evidencia científica al respecto. Se recomienda únicamente como tratamiento en lesiones de bajo riesgo.<sup>145</sup> Puede ser un tratamiento efectivo para CBC de bajo riesgo con fuerza de recomendación C y calidad de evidencia III.<sup>143</sup>

## 7.B. TRATAMIENTO NO QUIRURGICO

### 7.B.1. QUIMIOTERAPIA TÓPICA

- 5-Fluorouracilo (5FU). Es un análogo de timidinas que se une a la enzima timidilato sintasa e inhibe la conversión de deoxiuridina al nucleótido de timidina, con la consecuente disminución de la síntesis de DNA. Su formulación al 5% es la aprobada para el tratamiento de CBC, y debe ser aplicada durante 2 a 4 semanas.<sup>152</sup> El tratamiento tópico con 5FU puede valorarse en CBC de bajo riesgo extrafaciales y de espesor fino, pero no es eficaz en los invasivos.<sup>152,153</sup>

### 7.B.2 INMUNOTERAPIA TÓPICA

- Imiquimod. Es un inmunomodulador que actúa como agonista de los receptores Toll-like (TLR) 7 y 8, con activación posterior del factor nuclear kappa beta (NFκβ). Su acción conlleva la liberación de múltiples citoquinas entre las que se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa y el interferón alfa y gamma.<sup>152</sup> La formulación en crema al 5% está aprobada para la utilización en CBC superficiales, empleándola 1 vez al día 5 días por

## INTRODUCCIÓN

semana durante 6 semanas,<sup>152,154</sup> con una tasa de curación histológica del 82-90% a las 12 semanas.<sup>154,155</sup> Se ha descrito una tasa de recurrencia del 20,6% a los dos años en los pacientes respondedores.<sup>155</sup> Las reacciones locales moderadas a severas ocurren en el 87% de los pacientes, incluyendo la erosión en el 36% y la ulceración en el 22% de los CBC tratados.<sup>154</sup> Imiquimod no está indicado en CBC morfeiforme, infiltrativo, recurrente, o en lesiones en la cabeza.<sup>4</sup> Su utilidad en el tratamiento de CBC nodulares es dudosa, aunque ayuda a mejorar las tasas de curación si se aplica tras el curetaje de las lesiones.<sup>143</sup>

Este tratamiento es considerado bueno para CBC primarios pequeños superficiales con fuerza de recomendación A y nivel de evidencia I. Puede tener un papel en el tratamiento de CBC primarios nodulares, con fuerza de recomendación C y nivel de evidencia I.<sup>143</sup>

### 7.B.3. TERAPIA FOTODINÁMICA

La TFD se realiza administrando de manera sistémica o tópica sobre el tumor un agente fotosensibilizador o un profármaco fotosensibilizante, que son activados por la luz. El más empleado es el ácido 5 aminolevulínico (ALA), un precursor de la ruta metabólica del grupo hemo. Al añadir de manera exógena ALA, se produce acúmulo de protoporfirina IX en el tumor que no puede ser transformada por la enzima ferroquelatasa, ya que esta enzima tiene baja actividad en tumores como el CBC. La protoporfirina IX es fotosensibilizante y expuesta a la luz con filtro rojo (con una longitud de onda aproximada

## INTRODUCCIÓN

de 630 nm) origina la destrucción tumoral.<sup>156</sup> La protoporfirina IX formada se metaboliza en 48 horas,<sup>157</sup> por lo que durante ese tiempo es recomendable evitar la exposición solar.

La TFD con ALA tópico empleado en dos ciclos se ha demostrado eficaz para el tratamiento CBC superficial. La tasa de desaparición tumoral inicial en un estudio fue del 95% con una recurrencia al año del 18%.<sup>158</sup> En otro trabajo, la tasa de desaparición tumoral fue del 90% al inicio, con una recurrencia del 4,8% al año.<sup>159</sup> En un ensayo que compara el uso de TFD con ALA frente a crioterapia en CBC superficiales se demostró una mejor respuesta clínica a los 12 meses de la TFD (5% vs 13%), pero en histología se encontró tumor residual en el 25% de los casos tratados con TFD frente al 15% con crioterapia, lo que podría indicar que la observación clínica puede infraestimar los datos de persistencia o recidiva tumoral.<sup>160</sup>

El metilaminolevulinato es un éster del ALA, más lipofílico, con mejor penetrancia en la piel y mayor afinidad hacia las células neoplásicas.<sup>157</sup> Las tasas de desaparición completa de CBC superficiales primarios tratados con TFD con MAL a los 3 meses es del 92-97% siguiendo protocolos de tratamiento único o doble (separado por una semana), con retratamiento a los tres meses en los casos necesarios mediante dos ciclos separados por una semana. Las tasas de recurrencia anuales fueron del 9% al año y del 22% a los 5 años de seguimiento.<sup>161,162</sup> El uso de TFD con MAL también se ha estudiado en el tratamiento de CBC nodulares. En un ensayo clínico randomizado comparativo con cirugía se encontró una mejor respuesta no significativa de la cirugía frente a la TFD (98% frente a 91% al inicio y 96% frente a 83% a los 12 meses). La diferencia sí fue estadísticamente significativa para los resultados cosméticos a las 12 y 24 meses, a favor de la TFD.<sup>157</sup>

## INTRODUCCIÓN

Las guías de tratamiento de CBC de la asociación británica de dermatología, las guías propuestas por el grupo británico de fotodermatología y las guías europeas de TFD evalúan la TFD con ALA y MAL como un tratamiento eficaz para CBC superficiales primarios con nivel de evidencia I y fuerza de recomendación A.<sup>143,163,164</sup> Las dos guías británicas consideran la TFD con MAL un tratamiento razonable en CBC nodulares de bajo riesgo, sobre todo adecuado en los casos en que los resultados quirúrgico van a ser subóptimos, con nivel de evidencia I y fuerza de recomendación B.<sup>143,163</sup> Por el contrario, las guías europeas recomiendan el tratamiento con TFD de CBC nodulares finos y de bajo riesgo con un nivel de evidencia I y fuera de recomendación A.<sup>164</sup>

La TFD con MAL en el tratamiento de CBC en pacientes con SG se considera efectiva y segura, permitiendo el tratamiento de múltiples lesiones simultáneamente y de grandes áreas corporales. Se pueden tratar todos CBC superficiales de cualquier tamaño, así como CBC nodulares menores de 2 mm de espesor. Se aconseja un adecuado manejo del dolor cuando se traten áreas extensas.<sup>165</sup>

### 7.B.4. RADIOTERAPIA

La Rxt es una opción como terapia adyuvante para tumores primarios o recurrentes, CBC localizados en áreas de difícil tratamiento, y es el tratamiento de elección en pacientes con CBC de alto riesgo que no son candidatos a cirugía o presentan tumores irsecables.<sup>4,143</sup> Actualmente la Rxt incluye la radioterapia superficial (adecuada para tumores de unos 6 mm de profundidad), el baño de electrones (con mayor energía, penetra

## INTRODUCCIÓN

en mayor profundidad) y la braquiterapia (útil en lesiones que asientan en superficies curvas). Antes de realizar el tratamiento es necesario establecer un balance entre la probabilidad de destrucción tumoral y el riesgo de radionecrosis. La Rxt es habitualmente bien tolerada en cabeza y cuello, con la excepción de párpados y puente nasal.<sup>143</sup> La Rxt no está indicada en áreas de traumatismos repetidos, como las piernas y el tronco, y debe ser empleada con precaución en el párpado inferior y canto interno del ojo por riesgo añadido de ectropion, epífora y cataratas.<sup>145</sup>

Las tasas de curación son altas si se hace una buena selección de los pacientes: en una serie de 412 pacientes se obtuvo una tasa de curación a 5 años del 90,3%, similar al 90,7% encontrada en los 247 pacientes tratados con cirugía.<sup>166</sup> Una revisión de los estudios publicados entre 1947 y 1989 estimaba una tasa de curación a 5 años con Rxt del 91,3% en CBC primarios<sup>167</sup> y del 90,2% en CBC recurrentes.<sup>168</sup> Por otro lado, un estudio randomizado comparó la eficacia de Rxt frente a cirugía en CBC faciales menores de 4 cm, encontrando tasas de curación a 4 años del 92,5% con Rxt frente al 99,3% de la cirugía (la mayoría fueron intervenido mediante cirugía de Mohs), con mejores resultados cosméticos. Por todo ello, se recomienda cirugía en CBC menores de 4 cm en cara.<sup>169</sup>

No se recomienda la Rxt en pacientes menores de 60 años debido al potencial carcinogénico y a la menor cosmetividad secundaria al desarrollo de telangiectasias y atrofia,<sup>4,145</sup> aunque las técnicas actuales y el tratamiento fraccionado obtienen mejores resultados en este sentido.<sup>143</sup> Así mismo, se desaconseja el empleo de Rxt en pacientes con SG ya que tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores sobre el campo de radiación.<sup>136</sup>



## INTRODUCCIÓN

La aparición de CBC sobre área de Rxt es un factor de alto riesgo y condiciona una mayor recurrencia.<sup>142</sup> La Rxt está contraindicada en los CBC recurrentes ya tratados previamente con esta técnica; además, debe ser evitada en pacientes con SG porque pueden desarrollar CBC sobre el área de radiación.<sup>143</sup>

Las guías británicas recomiendan la Rxt con un nivel de evidencia I y una fuerza de recomendación A en el tratamiento de CBC primario y recurrente no tratado previamente con Rxt.<sup>143</sup>

### 7.B.5. OTROS TRATAMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

Se han descrito otros tratamientos locales para el tratamiento de CBC, como el ingenol mebutato, el 5-FU intralesional o el interferón- $\alpha$  intralesional, pero ninguno de ellos presenta evidencia suficiente en el momento actual como para que sea recomendado.<sup>170</sup>

En el SG se ha descrito el empleo de crema de tretinoína al 0,1% para tratamiento de áreas extensamente afectadas. Los pacientes en este tratamiento deben ser evaluados cada 3 meses y las lesiones que aumenten de tamaño en las revisiones deben ser extirpadas.<sup>31</sup>

### 7.C. TRATAMIENTO BASADO EN LA PATOGENIA MOLECULAR

#### 7.C.1. VISMODEGIB (GDC-0449)

Fue aprobado por la Food and Drug Administration en enero de 2012 para el tratamiento de CBC metastásico, recurrente o localmente avanzado.<sup>171</sup> Este fármaco se une e inactiva específicamente al receptor SMO con la consiguiente inhibición de las proteínas GLI, lo que finalmente se traduce en supresión de la proliferación y del crecimiento tumoral.<sup>81</sup>

Se han llevado a cabo ensayos clínicos sobre Vismodegib en CBC localmente avanzado y metastásico y en SG, empleando una dosis de 150 mg/día del fármaco.<sup>172,173,174</sup> En estos estudios se ha estimado la gravedad de los efectos adversos mediante la escala de la National Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events (version 3.0): grado 1 reacción adversa leve, grado 2 moderada, grado 3 severa, grado 4 discapacitante o que pone en peligro la vida, y grado 5 que causa la muerte.<sup>175</sup> Casi todos los pacientes presentaron efectos adversos, la mayor parte grado 2-3, entre los que destacan calambres musculares, fatiga, disgeusia, anorexia, alopecia y pérdida de peso. Una minoría de pacientes presentaron efectos adversos grado 4 de diversa índole: hiponatremia asintomática, shock hipovolémico, infarto de miocardio, enfermedad meníngea y accidente cerebrovascular.<sup>172,173</sup> Además, en uno de los ensayos hubo tres casos de muerte de causa desconocida. Estos pacientes presentaban a nivel basal factores de riesgo significativos, y se desconoce si hay relación estos eventos y el fármaco.<sup>173</sup> Se ha descrito también un aumento de queratoacantomas en pacientes tratados con vismodegib en los distintos ensayos, pero aún no se conoce el mecanismo por el que esto ocurre.<sup>76</sup>

## INTRODUCCIÓN

La tasa de respuesta al fármaco ha sido diferente según los grupos de pacientes. En uno de los ensayos se obtuvieron un 30,3% de respuestas parciales y ninguna respuesta completa en el grupo de CBC metastásico, con una duración media de respuesta de 7,6 meses, y una supervivencia media libre de progresión de 9,5 meses. En el grupo de CBC localmente avanzado se encontró una tasa global de respuesta del 43%, con un 20,6% de respuestas completas y un 22,2% de respuestas parciales. La duración media de la respuesta y la supervivencia media libre de progresión fue idéntica a la del grupo de CBC metastásico.<sup>173</sup>

En CBC de pacientes con SG se objetivó una tasa de aparición de nuevos CBC operables inferior en pacientes tratados con vismodegib que en los que recibieron placebo (2 frente a 29 casos por grupo y año,  $p < 0.001$ ). Vismodegib también redujo el tamaño de los tumores preexistentes, expresado como el porcentaje de cambio en la suma de los diámetros mayores (-65% frente a -11%,  $p = 0.003$ ). Los pacientes con Vismodegib precisaron una menor cantidad de cirugías que el grupo placebo (media de cirugías por pacientes 0,31 frente a 4,4 con placebo,  $p < 0,001$ ).<sup>174</sup> Además, se ha observado una disminución en tamaño de los queratoquistes odontogénicos de pacientes con SG en tratamiento con vismodegib.<sup>176</sup>

Se ha observado que de manera rápida se crean resistencias a vismodegib que comprometen su eficacia, y se cree que nuevas mutaciones en SMO son las responsables de la resistencia adquirida.<sup>76,81</sup> Yauch y cols identificaron la mutación heterocigota con pérdida de sentido o missense c.1679G>C, que producía el cambio de ácido aspártico por histidina en el codón 473. Esta mutación no tenía efecto sobre la señalización Hh, pero sí

## INTRODUCCIÓN

impedía la unión de vismodegib a SMO.<sup>177</sup> Dijkgraaf y cols demostraron que la mutación adquirida en SMO p.E518A también era causante de resistencia a vismodegib, pero podía ser compensada por el bis-amida compuesto 5.<sup>178</sup>

### 7.C.2. ITRACONAZOL Y ARSÉNICO

Itraconazol es un inhibidor de SMO que actúa de manera distinta a otros inhibidores de SMO, impidiendo la acumulación de esta proteína en el cilio primario.<sup>179</sup> Se ha demostrado que tanto itraconazol como el trióxido de arsénico, solos o en combinación, inhiben la vía Hh in vitro e impiden el crecimiento tumoral en meduloblastomas y CBC de ratones con SMO mutado resistente a otros inhibidores de esta proteína.<sup>62</sup> El arsénico y sus derivados bloquean la acumulación de Gli-2 en el cilio primario, lo que conlleva a una disminución de los niveles de esta proteína.<sup>180</sup>

Se ha llevado a cabo un ensayo clínico fase II en humanos para el tratamiento de CBC con itraconazol a dosis de 100 mg/12 horas o 200 mg/12 horas. Itraconazol se asoció con dos efectos adversos en los 19 pacientes tratados (astenia como grado 2 e insuficiencia cardiaca congestiva como grado 4). Se observó una disminución significativa de la proliferación celular en un 45%, reducción significativa de la actividad de la vía Hh del 65%, y del área tumoral en un 24%. Los tumores de pacientes tratados previamente con vismodegib no mostraron cambios, al igual que los que recibieron placebo.<sup>181</sup>

### 7.C.3. FORMULACIONES TÓPICAS.

Se ha realizado dos ensayos clínicos hasta la fecha con inhibidores tópicos de la vía Hh. En el primero de ellos se empleó el fármaco CUR61414, efectivo en estudios en ratones. Sin embargo, este tratamiento resultó ineficaz sobre CBC en seres humanos.<sup>182</sup> En el segundo ensayo clínico se empleó el fármaco LDE225 al 0,75% en crema en 8 pacientes con SG, obteniendo una reducción en tamaño tumoral e incluso aclaramiento clínico a las 4 semanas en 12 de los 13 CBC tratados, con buena tolerancia.<sup>183</sup>



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**





## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CBC es el tumor más frecuente en la raza caucásica<sup>2,3,4</sup> y está asociado a múltiples factores de riesgo entre los que destaca la luz ultravioleta.<sup>4</sup> El SG es una enfermedad genética cuya manifestación principal es la aparición de múltiples CBC, entre otros rasgos clínicos.<sup>3</sup>

Se ha demostrado el papel patogénico principal del gen *PTCH1* tanto en el CBC asociado a SG como en el CBC esporádico. Este gen pertenece a la ruta de transmisión de señales de Hh, implicada en procesos de proliferación y supervivencia celular. No obstante, sólo la mitad de los pacientes con SG presentan mutaciones patogénicas en el gen *PTCH1*,<sup>23,99</sup> cifra que aumenta hasta el 70% en los CBC esporádicos, aunque en estado de heterocigosis.<sup>77,100</sup> En un pequeño porcentaje de los pacientes con SG y de los CBC esporádicos se han descrito mutaciones en otros genes de la vía Hh.<sup>75,76</sup> En CBC esporádicos, además, se ha determinado el papel de mutaciones en p53, provocadas sobre todo por la luz UV.<sup>100</sup> Sin embargo, a parte de lo anteriormente descrito, se han publicado pocos estudios hasta la fecha que analicen la presencia y relevancia de otras alteraciones genéticas en los CBC asociados a SG y esporádicos. Nos planteamos estudiar las alteraciones en el gen *PTCH1* y determinar si existen otras alteraciones genéticas que puedan influir en el desarrollo tumoral.

Mediante este estudio pretendemos también caracterizar clínica y molecularmente una población de pacientes con SG. Hasta este momento no se ha encontrado correlación genotipo-fenotipo en estos pacientes, e intentamos corroborarlo en nuestros pacientes. Por otro lado, nos planteamos determinar posibles correlaciones entre características clínicas, anatomopatológicas y moleculares en los CBC esporádicos.



## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

En nuestro trabajo nos hemos propuesto analizar las características clínicas de una serie de pacientes con CBC asociado a SG y CBC esporádico. Estudiaremos, además, las características moleculares de muestras de sangre periférica y de tumor de cada uno de estos pacientes.

Para ello nuestros objetivos han sido:

1. Estudiar las características clínicas de la serie de pacientes con SG y compararlo con las series publicadas hasta la fecha, para identificar similitudes y diferencias relevantes.
2. Intentar definir el papel del estudio genético en el SG y valorar en qué ocasiones resulta más rentable.
3. Analizar los aspectos clínicos de la serie de pacientes con CBC esporádico y compararlo con otras series publicadas para determinar si presentan unas características similares.
4. Establecer una correlación entre características clínicas, anatomopatológicas y moleculares de los CBC asociados a SG y CBC esporádicos. Intentar determinar variables clínicas que predispongan a un subtipo histológico concreto.
5. Buscar la presencia de mutaciones en *PTCH1* en la sangre periférica y en la muestra tumoral de pacientes con CBC asociado a SG y con CBC esporádico, para determinar si la única afectación de este gen condiciona la enfermedad.
6. Identificar mediante CGH-array (CGH) otros posibles genes o regiones cromosómicas implicadas en el desarrollo tumoral en los dos grupos poblacionales.



## MATERIAL Y MÉTODOS





## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. GENERALIDADES

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca y en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Salamanca.

Se estudiaron muestras de DNA obtenidas de sangre periférica y de tumor de 5 pacientes con CBC asociados a SG y de 15 pacientes menores de 60 años con CBC esporádicos confirmados hisopatológicamente. Todos los pacientes con SG cumplían criterios clínicos de la enfermedad, tanto según la lista de criterios clásica propuesta por Evans y posteriormente por Kimonis, como la más recientes de Bree y Jones.

Los pacientes diagnosticados de SG fueron atendidos en los Servicios de Dermatología de distintos hospitales: dos pacientes procedían del Hospital Niño Jesús de Madrid, uno del Complejo hospitalario Universitario de A Coruña y dos recibieron asistencia en el Complejo Asistencial de Salamanca. Catorce de los 15 pacientes con CBCs esporádicos fueron atendidos en el Servicio de Dermatología el Complejo Asistencial de Salamanca. Un paciente fue tratado en el Complejo Asistencial de Zamora.

Los pacientes fueron debidamente informados de la naturaleza y objetivos del estudio y todos firmaron el consentimiento informado para la extracción de una muestra de sangre y de tumor para realizar el estudio genético, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Complejo Hospitalario de Salamanca.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudió el gen PTCH en el DNA de todas las muestras. Primero se analizó dicho gen en las muestras tumorales, y posteriormente se confirmó en sangre periférica la presencia o ausencia de polimorfismos o mutaciones detectados en el tumor.

**2. SEGUIMIENTO CLÍNICO**

Se analizaron los parámetros clínicos de todos los pacientes mediante revisión de historias clínicas de los hospitales correspondientes. Se solicitó a los dermatólogos responsables de los pacientes afectados de SG que completaran una hoja de recogida de datos clínicos, basada en las listas de criterios de Evans, Kimonis, Bree y Jones (tablas 3a-d). En los 14 pacientes con CBCs esporádicos atendidos en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca se repitió la anamnesis y exploración física a cargo del investigador principal tanto al inicio del estudio como al finalizar el periodo de seguimiento y se recogieron los datos reflejados en las tablas 4a-f.

*Tablas 3a, 3b, 3c y 3d: Relación de las variables clínicas y del estudio genético en los pacientes afectados de síndrome de Gorlin*

<b>3.A. DATOS DE FILIACIÓN</b>
<b>Código identificación</b>
<b>Edad al rellenar formulario</b>
<b>Sexo</b>

<b>3.B. CRITERIOS CLÍNICOS</b>
<b>Múltiples carcinomas basocelulares</b>
<b>Queratoquistes odontogénicos en mandíbulas</b>
<b>3 o más pits palmoplantares</b>
<b>Calcificación bilamelar de hoz cerebral</b>
<b>Familiar de 1r grado afectado de Sd. Gorlin</b>
<b>Meduloblastoma</b>
<b>Costillas bífidas, fusiformes o muy separadas</b>
<b>Macrocefalia(determinada tras ajuste por altura)</b>
<b>Paladar o labio hendido</b>
<b>Frente abombada</b>
<b>Hipertelorismo</b>
<b>Deformidad de Sprengel</b>
<b>Deformación pectoral</b>
<b>Sindactilia</b>
<b>Anomalías vertebrales</b>
<b>Defectos radiológicos en manos y pies</b>
<b>Fibroma ovárico</b>

<b>3.C. OTROS DATOS</b>
<b>Retraso mental</b>
<b>Otras alteraciones (especificar)</b>
<b>Otros tumores (especificar)</b>

<b>3.D. RESULTADOS ESTUDIO GENÉTICO</b>
<b>Mutación patogénica en muestra tumoral</b>
<b>Mutación patogénica en muestra de sangre periférica</b>
<b>Mutación silenciosa o polimorfismo en muestra tumoral</b>
<b>Mutación silenciosa o polimorfismo en muestra de sangre periférica</b>

*Tablas 4a-f: Relación de las variables clínicas, técnicas diagnósticas y del estudio genético en los pacientes afectados de con carcinomas basocelulares esporádicos*

<b>4.A. DATOS PERSONALES</b>
<b>Código identificación de las muestras: sangre periférica, tumor, número de historia clínica y número de biopsia</b>
<b>Sexo</b>
<b>Raza</b>
<b>Fototipo</b>

<b>4.B. ANTECEDENTES FAMILIARES</b>
<b>Antecedentes familiares de carcinoma basocelular</b>
<b>Antecedentes familiares de Síndrome de Gorlin</b>
<b>Antecedentes familiares de carcinoma epidermoide</b>
<b>Antecedentes familiares de melanoma</b>

<b>4.C. ANTECEDENTES PERSONALES</b>
<b>Presencia o ausencia de dermatitis actínica crónica</b>
<b>Tipo de daño actínico</b>
<b>Antecedente personal de carcinoma epidermoide</b>
<b>Antecedente personal de melanoma</b>
<b>Antecedente personal de tricoblastoma</b>
<b>Antecedente personal de otras dermatosis</b>
<b>Tipo de exposición solar</b>
<b>Exposición o no a carcinógenos</b>
<b>Exposición a agentes físicos</b>
<b>Inmunosupresión</b>

<b>4.D. ANTECEDENTES PERSONALES DE CARCINOMA BASOCELULAR</b>
<b>Edad de aparición del primer carcinoma basocelular (puede coincidir o no con el estudiado)</b>
<b>Localización del primer carcinoma basocelular (puede coincidir o no con el estudiado)</b>
<b>Número de carcinomas basocelulares hasta el momento de inicio del estudio</b>
<b>Meses de seguimiento</b>
<b>Número de carcinomas basocelulares diagnosticados durante el seguimiento</b>

<b>4.E. CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR A ESTUDIO</b>
<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS</b>
<b>Edad de aparición</b>
<b>Localización</b>
<b>Tiempo de evolución en meses</b>
<b>Diámetro en cm</b>
<b>Tratamientos previos de la lesión: crioterapia, terapia fotodinámica, imiquimod, cirugía convencional o electrocirugía, radioterapia.</b>
<b>Forma clínica</b>
<b>Recidiva durante el tiempo de seguimiento</b>
<b>CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS</b>
<b>Patrón anatomopatológico y diferenciación</b>
<b>Presencia o no de elastosis solar en la muestra y su localización en la dermis</b>
<b>Presencia o no de afectación perineural</b>
<b>Afectación de los bordes y del fondo quirúrgico por el tumor</b>

<b>4.F. RESULTADOS ESTUDIO GENÉTICO</b>
<b>Mutación patogénica en muestra tumoral</b>
<b>Mutación patogénica en muestra de sangre periférica</b>
<b>Mutación silenciosa o polimorfismo en muestra tumoral</b>
<b>Mutación silenciosa o polimorfismo en muestra de sangre periférica</b>

### **3. ESTUDIO GENÉTICO**

#### **3.A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE DNA**

##### **3.A.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE DNA DE SANGRE PERIFÉRICA**

El DNA genómico de alto peso molecular se extrajo a partir de la obtención de 10 ml de sangre periférica de los pacientes mediante venopunción antecubital y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

Las muestras de sangre periférica fueron centrifugadas y resuspendidas para aislar la interfase de células leucocitarias, las cuales se resuspendieron posteriormente en tampón Fornace (0.25M sacarosa; 50mM Tris-HCl pH 7.5; 25 mM KCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>); EDTA 0.5 pH 8, que es un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; proteinasa K 20 mg/L, que degrada las proteínas; y dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%, que rompe las membranas celulares. Esta mezcla se incubó a 55° C durante unas 16 horas. Tras ello se purificó el DNA tratándolo con una mezcla de fenol tamponado y cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (CIAA) y centrifugando posteriormente para aislar las fases. Con este tratamiento el DNA quedaba en la fase acuosa, que se limpió de otros residuos mezclándola, de nuevo, con CIAA y posteriormente centrifugando para separar las dos fases: una que contenía el DNA y otra en la que se encontraban los detritos celulares. Tras este paso se añadió etanol absoluto frío a la fase acuosa para provocar la precipitación del DNA. Dicho DNA se recuperó, se lavó con etanol al 70% y, finalmente se resuspendió en ddH<sub>2</sub>O.



## MATERIAL Y MÉTODOS

La concentración y el grado de contenido proteico de DNA fueron calculados tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en el espectrofotómetro automático de DNA / RNA (GeneQuant, Pharmacia), siguiendo la fórmula:

---

$$\mu\text{g de DNA / mL} = (\text{DO } 260) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

---

(Nota: 50 es un factor de corrección introducido, ya que la unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es un valor de absorbancia que tiene 50  $\mu\text{g}$  de DNA / mL).

El cociente  $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$  se utilizó para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2.

Valores inferiores a los señalados indicaban contaminación por proteínas o solventes orgánicos. En estos casos, se procedió a realizar una nueva purificación del DNA.

Valores superiores se debían a un exceso de RNA, que se eliminó tratando la solución de DNA con RNAsa y purificando de nuevo, según el método descrito anteriormente por Sambrook y cols.<sup>184</sup>

La muestra de DNA obtenida, con una concentración aproximada entre 1000 y 1500  $\mu\text{g/mL}$ , se almacenó en tubos Eppendorff® a  $-20^\circ \text{C}$ , con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como la posible contaminación bacteriana.

### 3.A.2. OBTENCIÓN DE DNA A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE TUMOR

Además de estudiar el DNA genómico obtenido a partir de una muestra de sangre periférica con el método anteriormente descrito, se estudió el DNA del tumor. La muestra tumoral se extrajo mediante un punch de 3-4 mm obtenido del centro de la lesión extirpada. De esta manera se dejó suficiente material neoplásico que permitiera la confirmación anatomopatológica del diagnóstico clínico, así como de la ausencia de infiltración tumoral en bordes o fondo de la pieza quirúrgica.

El proceso de extracción se llevó a cabo en frío, manteniendo los tubos Eppendorf® que contenían las muestras dentro de un recipiente con hielo para evitar la degradación del material genómico. Se homogeneizó la muestra de tejido en 425  $\mu$ L de tampón Fornace (0.25M Sacarosa; 50mM Tris-HCl pH: 7.5; 25mM KCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>) mediante Politron®. Entre el uso con una muestra y la siguiente el Politron se limpiaba empleando 6 tubos de ensayo: los dos primeros con agua destilada tratada con pirocarbonato de dietilo (dH<sub>2</sub>O DEPC), el tercero con dH<sub>2</sub>O DEPC y SDS al 10% a partes iguales, el cuarto con dH<sub>2</sub>O DEPC y NaOH 10 mM a partes iguales y los dos últimos con dH<sub>2</sub>O DEPC.

Una vez homogeneizada la muestra se añadieron 20  $\mu$ L de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0,5M, un quelante de aniones metálicos como el calcio o magnesio que inhibe la acción de las nucleasas y por tanto protege el DNA. A continuación se mezcló la muestra con 5  $\mu$ L de Proteinasa K 20 mg/mL, cuya función es digerir proteínas y de esta manera eliminar contaminación de la muestra. Tras mezclar bien la muestra con estos reactivos mediante Vortex®, se añadieron 45 $\mu$ L de SDS al 10%. Seguidamente se cerraron los Eppendorf y se taparon con parafilm, para dejarlos en baño de 55°C durante un tiempo

## MATERIAL Y MÉTODOS

de entre 12 a 48 horas. Durante este tiempo actuaban sobre la muestra por un lado la Proteinasa K digiriendo proteínas, y por otro el SDS solubilizando dichas proteínas, así como otros componentes de tejidos y membrana.

La extracción del DNA se realizó a continuación a temperatura ambiente mezclando cada una de las muestras incubadas con 250  $\mu\text{L}$  de fenol tamponado y 250  $\mu\text{L}$  de CIAA. Se centrifugó cada muestra a máxima potencia durante 5 minutos y posteriormente se aisló la fase acuosa que contenía el DNA y RNA del tejido. Se volvió a añadir 250  $\mu\text{L}$  de fenol tamponado y 250  $\mu\text{L}$  de CIAA, repitiendo el mismo proceso para disminuir la contaminación de las muestras. Tras este paso se añadieron 1000 $\mu\text{L}$  de etanol 100% frío y se centrifugó la muestra para provocar la precipitación del DNA. Una vez eliminado el sobrenadante se aisló el DNA de cada tumor. Éste se lavó añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, centrifugando para que el pellet de DNA precipitara en el fondo del Eppendorf y retirando el sobrenadante.

Una vez seco, el pellet de DNA fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada. La concentración y el grado de contenido proteico de DNA fueron calculados tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en el espectrofotómetro automático de DNA / RNA (GeneQuant, Pharmacia), mediante el método anteriormente descrito.

### **3.B. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR**

Las muestras de DNA fueron amplificadas mediante PCR.

La amplificación se llevó a cabo con el producto comercial Master Mix (Promega®). Esta amplificación se realizó en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$  que contenía: 12.5  $\mu\text{L}$  de Master Mix (Promega®); 9.5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas; 2  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido cebador (20 mM) (sentido y anti-sentido); y 1  $\mu\text{L}$  del DNA obtenido mediante el procedimiento anteriormente descrito (concentración= 0,1-0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Para asegurar la ausencia de contaminación y la especificidad de las reacciones, para cada muestra se utilizó una reacción a modo de control negativo, que contenía todos los reactivos citados excepto el DNA molde.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador automático y la manipulación post-PCR se llevó a cabo en un laboratorio distinto del utilizado para la extracción del DNA.

Para amplificar los diferentes exones del gen PTCH, partimos de un programa estándar de PCR, adaptado en cada caso a cada exón. El programa de PCR se indica en la tabla 5.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 5.** *Condiciones del programa estándar de PCR*

	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
<b>Desnaturalización</b>	95°C	5 minutos	1
<b>Desnaturalización</b>	95°C	30 segundos	40
<b>Anillamiento</b>	Adaptados a cada exón		
<b>Extensión</b>	72°C	30 segundos	
<b>Extensión final</b>	72°C	10 minutos	1

N: número de ciclos, variable dependiendo de cada exón estudiado

Se estudiaron los exones 2 a 23 del gen PTCH. Estos exones fueron amplificados empleando los oligonucleótidos de la tabla 6. Además se recogen en esta tabla las condiciones específicas de cada exón, no incluidas en la tabla 5.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 6.** Condiciones específicas de amplificación de los exones del gen *PTCH* y oligonucleótidos empleados

EXÓN	SECUENCIA 5'-3'	Tª A	Tpo. A	TAM
<b>2F*</b>	CCACGGCTGTTGGGGGCTCAC	58°C	30	320 pb
<b>2R*</b>	CTCTAGGTGTGCGCTGGCGAATATC			
<b>3F</b>	GAGTTTGCAGTGATGTTGCTATTC	58°C	30	287 pb
<b>3R</b>	ACCGCCTTACCTGCTGCTC			
<b>4F</b>	GAGAAAATTTTGTCTCTGCTTTTCA	56°C	30	105 pb
<b>4R</b>	GGCCATGCGTTAAGGTTAAGG			
<b>5F</b>	GCAAAATTTCTCAGGAACACC	56°C	30	249 pb
<b>5R</b>	TGGAACAAACAATGATAAGCAA			
<b>6F</b>	CCTACAAGGTGGATGCAGTG	58°C	30	335 pb
<b>6R</b>	TTTGCTCTCCACCCTTCTGA			
<b>7F</b>	GTGACCTGCCTACTAATTCCC	58°C	30	294 pb
<b>7R</b>	GGCTAGCGAGGATAAGGGTTTA			
<b>8F</b>	GAGGCAGTGAAACTGCTTC	58°C	30	256 pb
<b>8R</b>	TTGCATAACCAGCGAGTCTG			
<b>9F</b>	GTGCTGTGCGAGGCTTGTG	58°C	30	281 pb
<b>9R</b>	AGAAGCAGGAGCAGTCATGG			
<b>10F</b>	TTCGGCTTTTGTCTGTGC	58°C	30	242 pb
<b>10R</b>	CCGGTGGCATTGTCAAC			
<b>11F</b>	GTGTTAGGTGCTGGTGGCA	58°C	30	253 pb
<b>11R</b>	CTTAGGAACAGAGGAAGCTG			
<b>12F</b>	GACCATGTCCAGTGCAGCTC	58°C	30	211 pb
<b>12R</b>	CGTTCAGGATCACCACAGCC			
<b>13F</b>	AGTCCTCTGATGGGGCGGAG	58°C	30	222 pb
<b>13R</b>	CCATTCTGCACCCAATCAAAAAG			
<b>14F</b>	AAAATGGCAGAATGAAAGCACC	56°C	30	540 pb
<b>14R</b>	CTGATGAACTCCAAAGTTCTG			
<b>15F</b>	GACAGCTTCTTTGTCCAG	58°C	30	424 pb
<b>15R</b>	ACGCAAAAGACCGAAAGGACGA			
<b>16F</b>	CTCAGTCTCCTCAGCCCACC	58°C	30	271 pb
<b>16R</b>	TGCAAGCAGCCTCCACCAG			
<b>17F</b>	AACCCATTCTCAAAGGCCTCTGTT	58°C	30	268 pb
<b>17R</b>	CACCTCTGTAAGTTCCAGACCT			
<b>18F</b>	AACTGTGATGCTCTTCTACCCTGG	58°C	30	410 pb
<b>18R</b>	AAACTTCCCGCTGCAGAAAGA			

Tª A. → Temperatura de anillamiento

Tpo. A. → Tiempo de anillamiento en segundos

Tam. → Tamaño

\* 2 µl de DNA y 0,5 µl de MgCl<sub>2</sub>

### 3.C. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR fueron separados de acuerdo a su tamaño mediante la electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% (Gibco-BRL) preparados con tampón TBE (Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0 mM pH=8.3).

El primer pocillo del gel se reservó para separar, en paralelo con las muestras a estudiar, un marcador de tamaño que corresponde al DNA del fago  $\Phi$ X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII. El marcador de tamaño elegido genera fragmentos de 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118 y 0.072 Kb. La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 120 voltios durante 30 minutos.

Para monitorizar la migración del DNA en el gel se utilizaron dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga añadido a la muestra: el xileno cianol, que migra con los fragmentos de 5 Kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5 Kb.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando Sbyr Safe® (0,5  $\mu$ L/mL), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254nm).

Los resultados obtenidos se visualizaron mediante un sistema de fotografía digital (Kodak DC40) acoplado a un programa informático de tratamiento de imágenes (Kodak Digital Science 1D).

### 3.D. SECUENCIACIÓN DEL DNA

Una vez que se comprobó en el gel de agarosa que el DNA se había amplificado y que no existía contaminación de las muestras se hizo secuenciación directa de todos los productos de PCR.

Primeramente se purificaron todas las muestras amplificadas, para así eliminar los restos de oligonucleótidos y dNTPs no utilizados en la reacción de amplificación. Para ello se emplearon de manera indistinta tanto la enzima EXOSAP-IT CLEAN UP® de Affymetrics INC como el kit comercial High Pure Product Purification Kit® de Roche, siguiendo las instrucciones del comerciante.

A continuación se preparó una muestra de cada exón y paciente con el oligo sentido y otra con el oligo antisentido a una concentración de 3 pmol en un volumen de 2  $\mu$ L. El DNA se preparó a una concentración de 40 – 60 ng para un volumen final de 8  $\mu$ L.

Las muestras amplificadas y purificadas fueron secuenciadas mediante el analizador genético ABI 3100 (Applied Biosystems) del Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.



### 3.E. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS

La lectura y tratamiento de las secuencias se realizó con el programa ApE – A plasmid Editor para Windows.

Para la búsqueda de mutaciones en homocigosis se empleó el programa UCSC Genome Bioinformatics:

<http://genome.ucsc.edu/index.html?org=Human&db=hg19&hgsid=284765991>

Para la actualización bibliográfica se utilizó la base de datos Medline de la National Library of Medicine: <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Para determinar si las mutaciones encontradas eran conocidas o no, se recurrió a la base de datos The Human Gene Mutation Database at the Human Institute of Medical Genetics in Cardiff “HGMD”: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>

### **3.F. ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DEL COMPORTAMIENTO TEÓRICO DE LAS MUTACIONES MISSENSE NO DESCRITAS**

El estudio del comportamiento teórico de las mutaciones missense en los diferentes genes se llevó a cabo mediante el empleo de tres programas informáticos (PolyPhen, Mutation taster y Pmut). Estos programas predicen el impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de la proteína y por tanto, catalogan la probabilidad de que una mutación sea patogénica o causante de enfermedad o por el contrario tenga un efecto neutro sobre la función de la proteína.

Estos programas consideran la posición en la que se produjo el cambio y el tipo de cambio, teniendo en cuenta las propiedades físicas y químicas de los aminoácidos que suelen ocupar una determinada posición. Por ejemplo, si una posición suele estar ocupada por aminoácidos polares sin carga como serina, treonina, cistina, tirosina, asparagina o glutamina, la aparición de un aminoácido no polar o hidrófobo en ese lugar, como la prolina, alanina, valina, leucina o la isoleucina, podría afectar a la estructura y función de la proteína.

#### **A. PolyPhen (Polymorphism Phenotyping):**

<http://www.bork.emblheidelberg.de/PolyPhen>

Este programa predice el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína humana, empleando consideraciones físicas y comparativas<sup>185,186</sup>

## MATERIAL Y MÉTODOS

La secuencia de la proteína se introduce en el programa en formato FASTA. Se lleva a cabo un alineamiento de la misma con las secuencias pertenecientes a las proteínas homólogas en las especies que se encuentren descritas en BLAST. El resultado del alineamiento múltiple es empleado por el software PSIC (Position-Specific Independent Counts) para calcular la matriz del perfil. Los elementos de la matriz (valores del perfil) son ratios logarítmicos que indican la probabilidad de que en una posición determinada se encuentre un aminoácido, frente a que este aminoácido se localice en cualquier posición (frecuencia de fondo). El programa PolyPhen analiza los valores absolutos de la diferencia entre los valores de perfil de las dos variantes alélicas en la posición polimórfica. Un valor muy alto de esta diferencia podría indicar que la sustitución estudiada aparece poco o nada en la familia de proteínas. PolyPhen también muestra el número de secuencias alineadas en la posición de búsqueda. Este número indica la credibilidad de los cálculos del valor del perfil.

Los resultados del estudio pueden determinar que el cambio es:

- Probablemente patogénico: existe una gran probabilidad de que afecte a la estructura o a la función de la proteína.
- Posiblemente patogénico: se cree que podría afectar a la función o estructura de la proteína.
- Benigno: es muy probable que carezca de efecto fenotípico.
- Desconocido: en algunos casos, la carencia de datos no permite que el programa pueda hacer una predicción.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La tabla 7 muestra las bases empleadas por el programa para llevar a cabo la predicción del efecto del SNP en la función y estructura de la proteína.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 7. Bases del programa PolyPhen**

Base			PREDICCIÓN	Base	Efecto
diferencia en valores de PSIC	Propiedades del sitio de sustitución	Propiedades del tipo de sustitución			
arbitraria	Sitio funcional+	arbitraria	Probablemente patogénica	Anotación secuencia	Sitio funcional
arbitraria	Sitio de formación de uniones++	arbitraria	Probablemente patogénica	Anotación secuencia	Estructural, formación de uniones
arbitraria	En región transmembrana	Diferencia de la matriz PHAT producida por la sustitución negativa	Posiblemente patogénica	Anotación secuencia	Sitio funcional, transmembrana
arbitraria	En región transmembrana		Posiblemente patogénica	Anotación secuencia	
<=0.5	arbitraria	arbitraria	Benigna	Alineamiento o múltiple	
>1.0	Átomos a menos de 3Å del ligando	arbitraria	Probablemente patogénica	Estructura	funcional, funcional site, ligand binding (2.2.3)
	Átomos a menos de 3Å del sitio de unión	arbitraria	Probablemente patogénica	Estructura	Sitio funcional, indirecto
En el intervalo (0.5..1.5]	Con accesibilidad <=15%	Cambio tendencia superficie accesible >=0.75	Posiblemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, alteración hidrofobicidad
		Cambio volumen cadena lateral >=60	Posiblemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, sobreempaquetamiento
		Cambio volumen cadena lateral <=-60	Posiblemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, creación de cavidad
	Con accesibilidad <=5%	Cambio tendencia superficie accesible >=1.0	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, alteración hidrofobicidad
		Cambio volumen cadena lateral >=80	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, sobreempaquetamiento
		Cambio volumen cadena lateral <=-80	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, creación de cavidad
En el intervalo (1.5..2.0]	Con accesibilidad <=5%	Cambio tendencia superficie accesible >=1.0	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, alteración hidrofobicidad
		Cambio volumen cadena lateral >=80	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, sobreempaquetamiento
		Cambio volumen cadena lateral <=-80	Probablemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, creación de cavidad
	arbitraria	arbitraria	Posiblemente patogénica	Estructura	Estructural, sitio encriptado, creación de cavidad
>2.0	arbitraria	arbitraria	Probablemente patogénica	Alineamiento o múltiple	

### **B. Mutation taster:** <http://www.mutationtaster.org>

Mutation taster es un programa bioinformático que emplea un clasificador bayesiano para predecir la probabilidad de patogenicidad de una mutación. El clasificador bayesiano se alimenta con los resultados de los test introducidos y las características de las alteraciones que son consultadas con las de referencia, con lo que calcula las probabilidades de que una mutación pueda ser causante de enfermedad o constituir un polimorfismo. Para esta predicción, las frecuencias de todas las características de cada mutación patogénica o polimorfismo se estudiaron en comparación con un set de más de 390000 mutaciones patogénicas conocidas extraídas de HGMD Professional y más de 6800000 polimorfismos incluidos en el 1000 Genomes Project (TGP).

Para el análisis de mutaciones con este programa primero hay que introducir en la página web [www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org) el nombre del gen y su símbolo. A continuación el programa pide el transcrito o Ensembl Transcript ID, que está formado por las siglas ENST seguidas de 11 cifras y corresponde con el código de identificación de dicho gen. Posteriormente puede introducirse la información que deseamos contrastar de dos maneras:

1- Vía secuencia: se introduce la secuencia del gen, poniendo el cambio de aminoácido entre corchetes. Por ejemplo, si existe una mutación puntual A>G y la secuencia que le sigue es TGTTTCATGAGTTTGGAGATAATACAGCAGGCTGT, la mutación se señalaría [A/G]TGTTTCATGAGTTTGGAGATAATACAGCAGGCTGT.

2- Búsqueda por medio de la posición del gen. Se debe poner el nombre del gen seguido de la mutación en el genómico. Por ejemplo, para consultar la delección g.28670\_28671delAG del gen AGRN, después de introducir el símbolo y transcrito del

## MATERIAL Y MÉTODOS

gen, hay que señalar la posición por encima y por debajo de la mutación que se encuentran sin alterar, y posteriormente borrar las bases que están delecionadas. En caso de que la mutación sea una inserción hay que indicar las posiciones por encima y por debajo de la mutación que están sin alterar y a continuación escribir las bases que son insertadas.

Los resultados de la predicción pueden ser los siguientes:

- Causante de enfermedad o disease causing: no es una variante conocida, pero es probablemente patogénica.

- Automáticamente causante de enfermedad o disease causing automatic: es una mutación patogénica conocida.

- Polimorfismo o polymorphism: mutación probablemente silenciosa.

- Automáticamente polimorfismo o polymorphism automatic: es un polimorfismo o mutación silenciosa conocida.

### **C. Pmut:** <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut>

Es un programa que predice si una mutación puede ser patogénica o neutral. Se basa en las características de la secuencia y en un software de una o dos redes neurales NN (neural network), que emplean bases de datos internas, predicción de estructura secundaria y conservación de la secuencia. Proporciona una respuesta afirmativa o negativa y un índice de credibilidad.<sup>187,188,189</sup>

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se introduce la secuencia proteica a estudiar en formato FASTA y se incluye la localización y el cambio aminoacídico que se produce. Proporciona resultados que varían en un rango de 0 a 1, donde un valor 0 indica que se trata de una mutación neutral y los valores más altos son patogénicos. También se muestra la mutación en relación a la estructura proteica. La tasa de error por falsos positivos es de un 21% y por falsos negativos es de un 17%. Si se incluye la estructura de la proteína, la tasa de falsos positivos se reduce a un 12% y la de falsos negativos a un 10%.



### 3.G. CGH-ARRAY

Los CGH- arrays se utilizan para detectar la presencia de ganancias o pérdidas de segmentos del genoma. Para el estudio con CGH-array pueden emplearse dos tipos de arrays: placas de cromosomas artificiales de bacterias (BAC arrays), o bien arrays de oligonucleótidos. En nuestro caso se han estudiado las variaciones en el número de copias de DNA en el genoma del paciente empleando CGH sobre arrays de oligonucleótidos.

Para realizar un estudio de CGH con arrays de oligonucleótidos se necesitan entre 500 y 1.000 ng de ADN tanto de la muestra problema como del control. A diferencia del CGH que emplea BACarrays en los que la muestra control se marca con el fluorocromo indocarbocianina (Cy3)-deoxicitidina 5'-trifosfato, en los arrays de oligonucleótidos la muestra tumoral es la que se marca con el fluorocromo Cy3, mientras que los DNA que se utilizan como controles se marcan con el marcador fluorescente indodicarbocianina (Cy5)-deoxicitidina 5'-trifosfato.

Se usaron como controles DNA humano del mismo sexo que cada muestra estudiada. Cada una de las muestras control, una femenina y otra masculina, consistían de un pool de DNA de linfocitos normales de varias personas sanas (G147A-G152A; Promega, Madison, Wisconsin, EEUU).

Se analizaron las muestras empleando el array NimbleGen Human CGH 4x72K Whole Genome v2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Esta plataforma de microarrays proporciona mediciones de 71.341 loci genómicos únicos. La hibridación, el análisis de las imágenes, la extracción de las intensidades de fluorescencia y sus  $\log_2$ , así

## MATERIAL Y MÉTODOS

como su posterior normalización, se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los DNA junto con el fluorocromo se desnaturalizaron a elevadas temperaturas (95°C) para su posterior marcaje por random primer por medio de los nucleótidos sin fluorescencia y la enzima Klenow, proceso que dura 2 horas y se realiza a 37°C protegido de la luz. Posteriormente se interrumpe el marcaje con EDTA y se precipita el DNA marcado con NaCl e isopropanol, eliminando así todos los componentes de la reacción anterior. El DNA marcado y purificado se hidrata en 25 µl de H<sub>2</sub>O y se mide la concentración de DNA obtenida en el NanoDrop. La cantidad de DNA que se hibrida en cada tipo de array depende principalmente del número de oligonucleótidos que se hayan incluido en el array (tabla 8).

**Tabla 8.** Principales características de los arrays de NimbleGen

TIPO DE ARRAY	4x72K	12x135K	TILING ARRAY 1X385K CHR7
<b>Cantidad de ADN de partida</b>	1µg	1µg	1µg
<b>Nº de oligonucleótidos</b>	72.000	135.000	385.000
<b>Nº muestras por array / nº de subarrays</b>	4/4	12/12	1/1
<b>Tamaño de oligonucleótido</b>	25	25	25
<b>Resolución</b>	42 Kb	21 Kb	1-500 pb
<b>Mapea</b>	Todo el genoma	Todo el genoma	Específico del cromosoma 7
<b>Cantidad de DNA marcado</b>	10µg	20µg	10µg

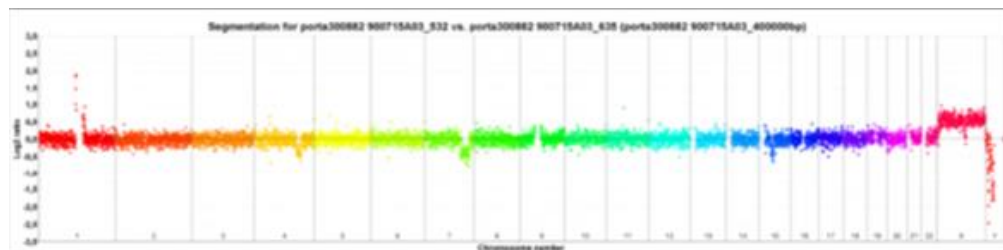
## MATERIAL Y MÉTODOS

Tanto el DNA control como el tumoral se mezclan en cantidades equimoleculares, se precipitan conjuntamente y se preparan para su hibridación junto al array. Para los formatos de 4 y de 12 subarrays es necesaria la incorporación de un identificador que permita el reconocimiento de cada muestra en el array. Estos identificadores se llaman STC (Sample Tracking Buffer) y son específicos para cada subarray. Esto facilita la identificación de un STC con su muestra y con una localización dentro del array. Una vez que está preparada la mezcla de hibridación el siguiente paso es su hibridación sobre el array a 42°C en la estación de hibridación NimbleGen (Roche NimbleGen, Madison, Wisconsin, EEUU) durante 16 a 20 horas. Transcurrido este periodo de tiempo se procede a los lavados del array con las diferentes disoluciones de lavado y su escaneado a las longitudes de onda de 532nm y 635nm en el escáner GenePix 4000B dual scanner (Axon Instruments, Burlingame, California, EEUU).

### Análisis de datos:

La imagen generada con el escáner se analiza mediante el programa NimbleGen Scan versión 2.5 (Roche NimbleGen, Madison, Wisconsin, EEUU). Mediante este programa se separan los diferentes subarrays y a cada uno de manera independiente se le coloca automáticamente una malla que identifica cada oligonucleotido del subarray. Además, para cada uno de ellos se calcula un valor de intensidad de los fluorocromos que posteriormente serán representados de manera ordenada para poder localizarlos dentro de sus respectivos cromosomas (figura 17). Además, el programa calcula el valor de los ratios a partir de los cuales se van a considerar ganancias o pérdidas de las regiones cromosómicas implicadas.

## MATERIAL Y MÉTODOS



*Figura 17. Representación gráfica del análisis de un array NimbleGen en una hibridación varón/mujer. En la figura se representan de manera ordenada desde la región 1p hasta el cromosoma Y todos los oligonucleótidos incluidos dentro del subarray. Cada color pertenece a un cromosoma.*





## RESVLTADOS





## RESVLTADOS

### **1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES CON SÍNDROME DE GORLIN**

#### **1.A. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

La edad media de los pacientes cuando se incluyeron en este estudio fue de 42,4 años, con una mediana de 49 años. Dos de los 5 pacientes (40%) eran mujeres y 3 (60%) hombres.

Todos los pacientes cumplían los diferentes criterios diagnósticos propuestos para el SG. La frecuencia de aparición de las distintas características clínicas se resume en la tabla 9, en la que se ordenan los criterios diagnósticos clínicos como criterios mayores o menores de acuerdo con el documento de consenso publicado por Bree y cols en 2011.

## RESULTADOS

**Tabla 9.** Criterios clínicos de síndrome de Gorlin

	PARÁMETROS CLÍNICOS	ABSOLUTO	FRECUENCIA
<b>CRITERIOS MAYORES</b>	≥ 2 CBCs o 1 CBC en < 20 años	5	100%
	Queratoquistes odontogénicos	4	80%
	≥ 3 pits palmoplantares	4	80%
	Calcificación bilamelar de la hoz cerebral	2	40%
	Meduloblastoma	1	20%
	Familiar de primer grado afectado	2	40%
<b>CRITERIOS MENORES</b>	Macrocefalia	4	80%
	Labio o paladar hendido	0	0%
	Anomalías costales	1	20%
	Otras anomalías esqueléticas y cambios radiológicos (anomalías vertebrales, cifoescoliosis, 4 metacarpiano corto, polidactilia postaxial)	2	40%
	Fibromas ováricos o cardíacos	1	20%
	Hipertelorismo	3	60%

Además de las características clínicas mencionadas, uno de los pacientes presentaba quistes aracnoideos. En cuanto a la esfera intelectual, un paciente tenía retraso mental y otro cociente intelectual disminuido, mientras que los 3 restantes no presentaban alteraciones.

## 1.B. ESTUDIO DEL GEN PTCH1

### 1.B.1 ESTUDIO DE *PTCH1* EN SANGRE PERIFÉRICA

De los 5 pacientes incluidos en el estudio, 4 presentaban mutaciones en sangre periférica en el gen *PTCH1* que podrían ser las causantes de la enfermedad. El análisis del gen *PTCH1* en sangre periférica demostró 7 mutaciones que se distribuyeron de la siguiente forma (tablas 10 y 12):

- Cuatro (57,14%) mutaciones patogénicas.
- Dos (28,57%) polimorfismos ya descritos en la literatura, uno de los cuales es una mutación silenciosa.
- Una (14,28%) mutación intrónica ya descrita en la literatura y considerada un polimorfismo.

#### - Mutaciones patogénicas exónicas en sangre periférica

Se han encontrado cuatro mutaciones en sangre periférica. Dos de ellas estaban previamente descritas en la literatura médica: c.386G>A; p.W129X reportada por Soufir y cols,<sup>190</sup> y c.403C>T; p.R135X por Wicking y cols (Tabla 10).<sup>191</sup>

## RESULTADOS

**Tabla 10.** Mutaciones patogénicas en sangre periférica de pacientes con Síndrome de Gorlin

MUTACIONES PATOGENICAS						
Número paciente	Exón	Mutación	Efecto en codificación		Dominio de PTCH1 afectado	Bibliografía
G1	2	c.385T>C	p.W129R		Primer dominio extracelular (unión ligando Hedgehog)	Este trabajo
G5	2	c.386G>A	p.W129X truncada	→proteína	Primer dominio extracelular (unión ligando Hedgehog)	Soufir (2006) <sup>190</sup>
G2	3	c.403C>T	p.R135X truncada	→ proteína	Primer dominio extracelular (unión ligando Hedgehog)	Wicking (1997) <sup>191</sup>
G3	14	c.2204_2205delTT	p.F735CfsX2 → cambio de fase de lectura y proteína truncada		Cuarto dominio citoplasmático (unión a ciclina B1)	Este trabajo

La mutación c.385T>C; p.W129R es una mutación missense no descrita hasta la fecha, en la que existe un cambio de triptófano por arginina en el codón 129. Los programas bioinformáticos PoliPhen-2, Pmut y Mutation taster predijeron que esta mutación era posiblemente causante de enfermedad (tabla 11).

**Tabla 11.** Predicción de los programas bioinformáticos PoliPhen-2, Pmut y Mutation taster para la mutación c.385C>T

Programa	Predicción	Valor	Referencia
<b>PoliPhen-2</b>	Patogénica	HumDiv prediction score= 1	0 neutral, 1 patogénica
<b>Pmut</b>	Patogénica	Neural Network= 0,9123	0 neutral, 1 patogénica
<b>Mutation taster</b>	Patogénica	AA change core= 101	0-225 (no influye en predicción)

## RESULTADOS

Otro dato que apoya la patogenicidad de esta mutación es el hecho de que el residuo de triptófano se encuentra muy conservado a lo largo de la evolución, por lo que un cambio a este nivel es probable que tenga efectos deletéreos (figura 18).

QUERY	CYIQKNCGKFLVVGLLIFGAFVGLKAAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVSRELNYTRQKI	-----
sp G3QYL0#1	CYIQKNCGKFLVVGLLIFGAFVGLKAAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVSRELNYTRQKI	-----
sp Q90693#1	CYIQKNCGKFLVVGLL-YSAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVSRELNYTRQKI	-----
sp F1NYG9#1	-----	-----	-----	-----	VGGRVSRELNYTRQKI	-----
sp F7DZP4#1	CYIQKNCGKFLVVGLLIFGAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVSRELNYTRQKI	-----
sp Q98SW6#1	CYIQKNCGKFLVVGLLIFGAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVSRELDYTRQKI	-----
sp F1QRE4#1	CYIQKNCGKFLVVGLLIFGAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp UPI00022B018D#1	CYIQKNCGKFLVVGLMIFGAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp UPI00016E939E#1	CYIQKNCGKFLVVGLMIFGAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp UPI00016E939D#1	CYIQKNCGKFLVVGLMIFGAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp F1QHX5#1	-----	-----	-----	-----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp F1R8E2#1	CYIQKNCGKFLVVGLLIFGAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp Q9W6T6#1	CYIQKNCGKFLVVGLLIFGAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp UPI00016E939F#1	CYIQKNCGKFLVVGLMIFGAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp G1RNA3#1	-----	-----	-----	-----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp UPI00016E93A0#1	CYIQKNCGKFLVVGLMIFGAFVGLRAANLETNVEEL	W	VE	----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp G3NVD8#1	-----	-----	-----	-----	VGGRVNQELKYTRQKI	-----
sp F1Q8S0#1	CHIQRHCGKVLFIGLLVFGALSVGLRVAAIETDIEKL	W	VE	----	AGSRVSKELRYTKEKQ	-----

**Figura 18.** Conservación del residuo de triptófano a lo largo de la evolución

La segunda mutación no descrita hasta la fecha, c.2204 2205delTT, produce un cambio de fase de lectura y origina un codón de parada prematuro y una proteína truncada, por lo que por su naturaleza es patógena.

### - Polimorfismos en sangre periférica

Se ha encontrado la mutación silenciosa c.1686C>A;p.A562A, descrita en la literatura y considerada un polimorfismo.<sup>105</sup> Se ha identificado además el polimorfismo c.3944C>T;p.P1315L, también descrito en la literatura.<sup>192</sup> Por último, se ha hallado la mutación intrónica c.2560+9G>C, que ya ha sido estudiada anteriormente por otros grupos y está presente en un 21% de la población, por lo que se considera un polimorfismo (Tabla 12).

**Tabla 12.** Polimorfismos en sangre periférica

POLIMORFISMOS						
Número paciente	Exón	Mutación	Efecto en codificación	Bibliografía	Frecuencia y efecto	
G1, G3	12	c.1686C>A	p.A562A	Fujii (2003) <sup>105</sup>	4,7%	
G1, G3, G4	23	c.3944C>T	p.P1315L	Asplund (2005) <sup>192</sup>	Frecuencia variable según poblaciones	
G1, G3	15	c.2560+9G>C	-	Pastorino y cols (2005) <sup>193</sup>	21%	

### 1.B.2 ESTUDIO DE *PTCH1* EN MUESTRA TUMORAL

#### - Mutaciones exónicas patogénicas en muestras tumorales

En las muestras de DNA tumoral de los pacientes con SG se encontraron las mutaciones presentes en sangre periférica. Además de las alteraciones halladas en sangre periférica, se descubrió en un tumor una nueva mutación causante de enfermedad (tabla 13).

**Tabla 13.** Mutación patogénica exónica en muestra tumoral, no presente en sangre periférica

MUTACIONES PATOGENICAS						
Número paciente	Exón	Mutación	Efecto en codificación	Dominio afectado	de <i>PTCH1</i>	Bibliografía
G5	23	c.4282G>A	p.E1428K	Extremo carboxi-terminal (unión SMO)		Este trabajo

## RESULTADOS

La mutación c.4283G>A; p.E1428K, encontrada en las muestras tumorales, es descrita por primera vez en este trabajo. Se trata de una mutación missense en la que se produce un cambio de ácido glutámico por lisina en el codón 1428. Dos de los tres programas bioinformáticos predijeron que esta mutación era probablemente patogénica (tabla 14).

**Tabla 14.** Predicción de los programas bioinformáticos para la mutación *c.4283G>A*

Programa	Predicción	Valor	Referencia
<b>PoliPhen-2</b>	Patogénica	HumDiv prediction score= 0,997	0 neutral, 1 patogénica
<b>Pmut</b>	Neutral	Neural Network= 0,4415	0 neutral, 1 patogénica
<b>Mutation taster</b>	Patogénica	AA change core= 56	0-225 (no influye en predicción)

A pesar de que uno de los programas considerara que la mutación no produce enfermedad, la presencia de ácido glutámico en esa posición del genoma está muy conservada a lo largo de la evolución, por lo que un cambio a este nivel puede resultar deletéreo (figura 19).



**Figura 19.** Conservación del residuo de ácido glutámico a lo largo de la evolución

## RESVLTADOS

En el estudio informático de la secuenciación del tumor G2 cabe destacar que únicamente se encontró una banda correspondiente al alelo con la mutación c.403C>T; p.R135X sin poder identificarse el alelo sano, como sí ocurría en el estudio de la sangre periférica de ese paciente. Esto podría deberse o bien a una pérdida del alelo sano o a la aparición en el alelo sano de la mutación ya existente en el alelo mutado, es decir, que la mutación c.403C>T se encontrara en homocigosis.



## RESULTADOS

### - Polimorfismos en muestras tumorales

Los polimorfismos y mutaciones intrónicas de las muestras tumorales correspondían con las mismas de sangre periférica y se encuentran resumidas en la tabla 15. Únicamente hay que resaltar que el paciente G4 presentaba la mutación c.3944C>T;p.P1315L en sangre periférica en un solo alelo estando el segundo alelo sano, pero en la secuenciación del DNA tumoral se apreciaba una única banda, lo que podría indicar que o bien se ha producido una pérdida del alelo sano o que en el alelo sano se ha desarrollado la misma mutación existente en el alelo mutado, o lo que es lo mismo, que la mutación c.3944C>T se encontraría en homocigosis.

### - Resumen de las mutaciones encontradas en los pacientes con síndrome de Gorlin.

En la tabla 15 se resumen las mutaciones presentes tanto en sangre periférica como en muestra tumoral de los 5 pacientes con SG estudiados.

## RESULTADOS

**Tabla 15.** Resumen de las mutaciones en muestras tumorales. Se diferencian las mutaciones patogénicas (rojo) de los polimorfismos ya conocidos tanto intrónicos como exónicos (azul).

PACIENTE	MUTACIONES EXÓNICAS PATOGENICAS	POLIMORFISMOS Y MUTACIONES MISSENSE SILENCIOSAS EXÓNICAS	MUTACIONES INTRÓNICAS
<b>G1 sangre</b>	c.385T>C;p.W129R	c.1686C>A/p.A562A c.3944C>T;p.P1315L	c.2560+9G>C
<b>G1 tumor</b>	c.385T>C;p.W129R	c.1686C>A/p.A562A c.3944C>T;p.P1315L	c.2560+9G>C
<b>G2 sangre</b>	c.403C>T;p.R135X		
<b>G2 tumor</b>	c.403C>T;p.R135X (una banda en secuenciación)		
<b>G3 sangre</b>	c.2204_2205delTT;p.F735Cfs X2	c.1686C>A/p.A562A c.3944C>T;p.P1315L	c.2560+9G>C
<b>G3 tumor</b>	c.2204_2205delTT;p.F735Cfs X2	c.1686C>A/p.A562A c.3944C>T;p.P1315L	c.2560+9G>C
<b>G4 sangre</b>		c.1686C>A/p.A562A c.3944C>T;p.P1315L	
<b>G4 tumor</b>		c.1686C>A/p.A562A c.3944C>T;p.P1315L (una banda en secuenciación)	
<b>G5 sangre</b>	c.386G>A;p.W129X		
<b>G5 tumor</b>	c.386G>A;p.W129X c.4282G>A;p.E1428K		

## **2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE PACIENTES CON CARCINOMA BASOCELULAR ESPORÁDICO**

### **2.A. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

Se han estudiado 15 pacientes con CBC esporádico. Las características clínicas de estos enfermos se muestran a continuación en las siguientes secciones: características basales, antecedentes familiares y personales de cáncer cutáneo, antecedentes personales de daño actínico, factores de riesgo, características clínicas y anatomopatológicas del tumor a estudio y número de CBC durante el seguimiento.

#### **- Características basales.**

Nueve (60%) de los pacientes eran varones y 6 (40%) mujeres, todos ellos de raza caucásica. Siete pacientes (47%) tenían un fototipo II de Fitzpatrick, seis (40%) un fototipo III, y dos pacientes (13%) compartían características de los fototipos II y III de Fitzpatrick sin poder etiquetarse como uno u otro.

La edad media  $\pm$  DE de aparición del tumor que se ha estudiado en este trabajo fue de  $52,73 \pm 10,05$  años, con una mediana de 55 años (figura 20).

#### **- Antecedentes familiares de cáncer cutáneo.**

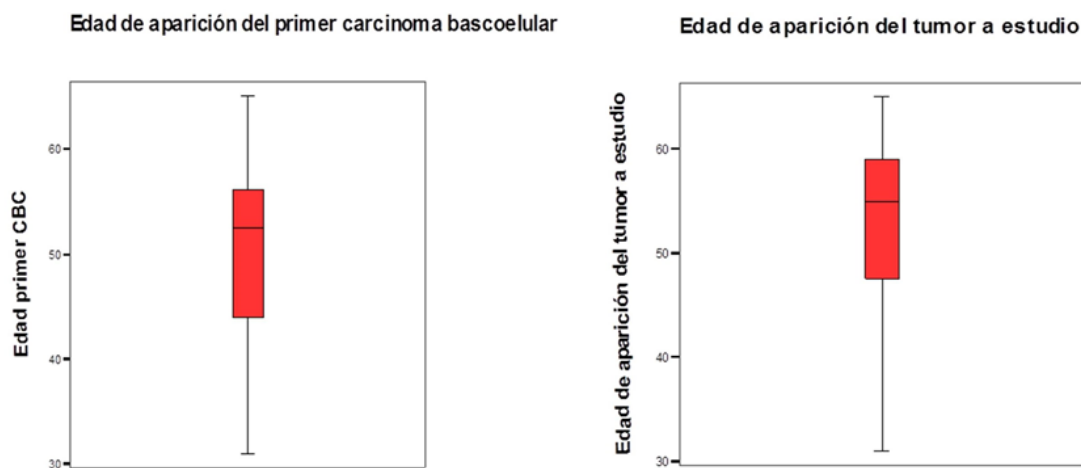
Dos (13%) pacientes tenían antecedentes familiares conocidos de CBC, mientras que los 13 (87%) restantes no los referían. Ninguno de los pacientes tenía antecedentes familiares de SG, carcinoma epidermoide o melanoma.

## RESULTADOS

### - Antecedentes personales de cáncer cutáneo.

Ninguno de los pacientes refirió antecedente personal de tricoblastoma, carcinoma epidermoide o melanoma.

En 6 (40%) pacientes el CBC estudiado en este trabajo era el primer tumor de este tipo que presentaban. Los 9 pacientes restantes (60%) habían sido tratados de otros CBCs con anterioridad. De manera global, la media del número de CBC previos se situó en 2,87 y la mediana en 2. La media  $\pm$  DE de edad de aparición del primer CBC fue de  $50,21 \pm 9$  años, con una mediana de 52,5 años (figura 20).



**Figura 20.** Edad de aparición del primer carcinoma basocelular y del carcinoma basocelular estudiado

La localización preferente del primer tumor fue la cara y orejas, encontrándose en 8 (53%) de los casos. Cuatro (27%) pacientes presentaron el primer CBC en los dos tercios

## RESVLTADOS

inferiores del tronco, 1 (7%) en cuello y escote, 1 (7%) en tercio superior de espalda y 1 (7%) en extremidades superiores.

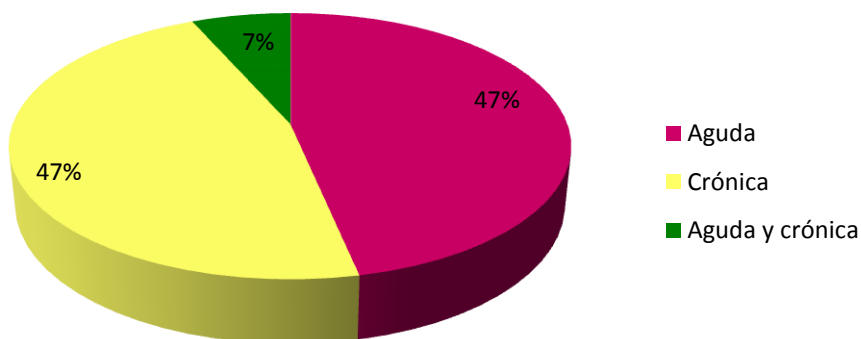
### - Antecedentes personales de daño actínico.

Once pacientes (73%) presentaban signos de daño actínico o dermatitis actínica crónica, mientras que 4 pacientes (27%) no la mostraban. Siete (47%) pacientes tenían lentigos actínicos, 2 (13%) léntigos y tengiectasias faciales no relacionadas con la rosácea, un paciente (7%) únicamente telangiectasias faciales, y un paciente (7%) cutis romboidal de la nuca. Únicamente 4 pacientes (27%) tenían antecedentes de queratosis o queilitis actínica.

### - Factores de riesgo.

Todos los pacientes referían antecedente de exposición solar: 7 (47%) de manera crónica, 7 (47%) de forma aguda y fundamentalmente antes de los 20 años, y 1 (7%) aguda y crónica según los momentos de su vida (figura 21).

**Grado de exposición solar**



**Figura**

*21. Gráfico de sectores que representa el grado de exposición solar*

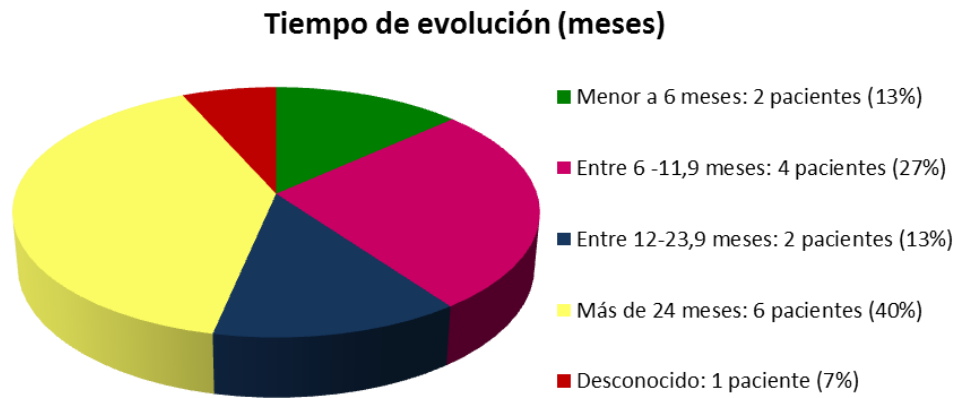
Únicamente 2 (13%) pacientes presentaron exposición a pesticidas, mientras que los 13 (87%) restantes negaban exposición a carcinógenos como arsénico o pesticidas.

Un paciente (7%) refería antecedente de exposición a la radiación UVA en un solárium, mientras que los 14 (93%) restantes negaban exposición a agentes físicos.

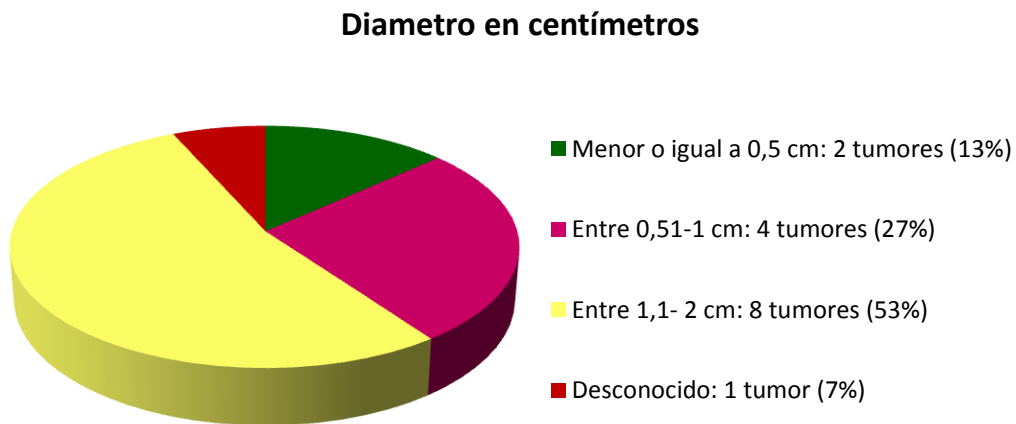
Un paciente (7%) se encontraba en tratamiento inmunosupresor de manera crónica con prednisona 7,5 mg/ día, frente al resto que no habían recibido nunca medicación inmunosupresora.

- Características clínicas del tumor a estudio. La edad media de aparición del tumor incluido en el estudio fueron 53 años, con una mediana de 55 años. Las características clínicas de los CBC se resumen en las figuras 22 a 25.

## RESVLTADOS



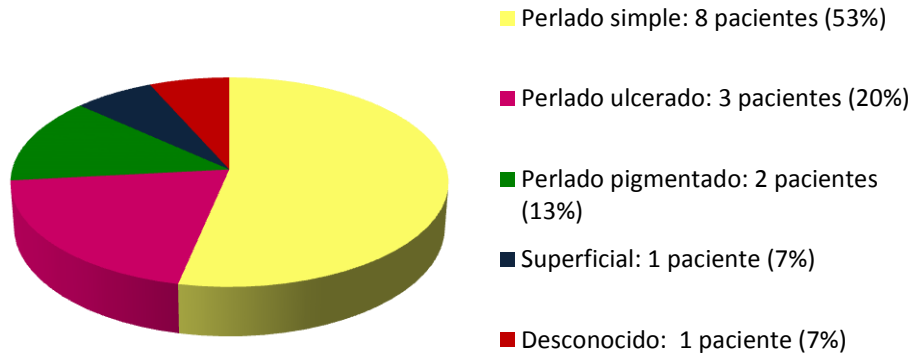
*Figura 22. Gráfico de sectores que representa el tiempo de evolución de los tumores estudiados*



*Figura 23. Gráfico de sectores que representa el diámetro en centímetros de los tumores estudiados*

## RESVLTADOS

### Formas clínicas



*Figura 24. Gráfico de sectores que representa las formas clínicas de los tumores estudiados*

### Localización del tumor



*Figura 25. Gráfico de sectores que representa la localización de los tumores estudiados.*



## RESVLTADOS

Dos de los tumores (13%) fueron tratados con imiquimod al 5% previamente y 1 (7%) fue tratado con crioterapia. El resto no habían sido tratados con anterioridad. Uno de los CBC que había sido tratado con imiquimod antes de incluirse en el estudio, y que presentaba histología de CBC superficial multifocal y bordes quirúrgicos de resección libres, recidivó durante el seguimiento. No hubo recidivas tumorales en el resto de los CBC.

### - Características anatomopatológicas del tumor a estudio.

Se estudió la presencia de elastosis solar alrededor del tumor para diferenciar aquellos que asentaban sobre áreas fotoexpuestas y con daño actínico de aquellos que no lo estaban. Se encontró elastosis solar en 9 pacientes (60%), que alcanzaba en 8 (89%) de los casos hasta dermis reticular. En uno de los pacientes no se pudo establecer la profundidad de la elastosis ya que fue estudiado otro centro.

El subtipo histológico de las muestras se resume en la tabla 16.

## RESULTADOS

**Tabla 16.** Subtipo histológico de los 15 tumores (global), de los que asientan sobre áreas con elastosis (elastosis) y de los que emergen de piel sin daño actínico (no elastosis)

SUBTIPO	GLOBAL	ELASTOSIS	NO ELASTOSIS
<b>Macronodular</b>	8 (53%)	4 (44%)	4 (67%)
<b>Micronodular</b>	1 (7%)	-	1 (17%)
<b>Superficial multicéntrico</b>	2 (13%)	1 (11%)	1 (17%)
<b>Macronodular y superficial</b>	3 (20%)	3 (33%)	-
<b>Infiltrativo</b>	1 (7%)	1 (11%)	-
<b>TOTAL</b>	15	9	6

En ninguno de los casos hubo invasión perineural o perivascular, y los bordes de resección se encontraban libres de tumor.

- Número de CBC durante el seguimiento. Se realizó un seguimiento de los pacientes durante una media de 18 meses, con una mediana de 13 meses. En este tiempo, únicamente un paciente (7%) presentó nuevos CBC, concretamente 11 tumores.

### 2.B. ESTUDIO DEL GEN *PTCH1*

Se estudiaron los exones 2 a 23 del gen *PTCH1*, tanto en sangre periférica como en la muestra tumoral de los 15 pacientes. Además, en 13 de los tumores se analizaron ganancias y pérdidas de segmentos cromosómicos mediante CGH-array (CGH).

## RESULTADOS

### 2.B.1 ESTUDIO DE *PTCHI* EN SANGRE PERIFÉRICA

En ninguno de los 15 pacientes se encontraron mutaciones patogénicas en el gen *PTCHI* en sangre periférica. Sin embargo, sí se encontraron 8 mutaciones no patogénicas:

- 3 (37,5%) mutaciones silenciosas no descritas previamente en la literatura
- 4 (50%) polimorfismos ya descritos
- 1 (12,5%) mutación intrónica ya descrita en la literatura y considerada un polimorfismo.

Estas mutaciones, así como su efecto, se resumen en la tabla 17.

## RESULTADOS

*Tabla 17. Mutaciones exónicas silenciosas y polimorfismos en sangre periférica*

MUTACIONES SILENCIOSAS					
Número paciente	Exón	Mutación	Efecto en codificación	Bibliografía	Frecuencia y efecto
<b>B7</b>	12	c.1641C>T	p.S547S	Este trabajo	Desconocido
<b>B1</b>	17	c.2787C>T	p.N929N	Este trabajo	Desconocido
<b>B8</b>	23	c.4128C>T	p.S1376S	Este trabajo	Desconocido
POLIMORFISMOS					
Número paciente	Exón	Mutación	Efecto en codificación	Bibliografía	Frecuencia y efecto
<b>B4, B9, B14</b>	12	c.1686C>T	p.A562A	Pastorino (2005) <sup>193</sup>	20% (genomed.org)
<b>B3, B10, B13</b>	12	c.1686C>A	p.A562A	Fujii (2003) <sup>105</sup>	4,7%
<b>B1, B6</b>	12	c.1665T>C	p.N555N	Pastorino (2005) <sup>193</sup>	8% (genomed.org)
<b>B1, B6, B7, B8 (una banda en secuenciación), B13</b>	23	c.3944C>T	p.P1315L	Asplund (2005) <sup>192</sup>	Frecuencia variable según poblaciones.
MUTACIÓN INTRÓNICA EN SANGRE PERIFÉRICA					
Número paciente	Exón	Mutación	Efecto en codificación	Bibliografía	Frecuencia
<b>B6, B9, B10, B13</b>	15	c.2560+9G>C	Neutral	Pastorino (2005) <sup>193</sup>	Polimorfismo: 21%

### 2.B.2. ESTUDIO DE *PTCHI* EN MUESTRA TUMORAL

En las muestras tumorales de los CBC esporádicos se identificaron 16 mutaciones en *PTCHI* no presentes en sangre periférica. Todas las mutaciones que habíamos encontrado en sangre periférica también se hallaron en las muestras tumorales, y no se indican por tanto a continuación para evitar redundancia. Las mutaciones exclusivas de muestras tumorales se distribuyeron de la siguiente manera:

- 8 (50%) mutaciones exónicas patogénicas. Estas mutaciones se han considerado causantes de enfermedad bien por su naturaleza o de acuerdo con los programas bioinformáticos de predicción. Cuatro de las mutaciones encontradas no han sido previamente descritas en la literatura médica.
- 1 (6,25%) mutación missense ya descrita en la literatura y considerada neutral.
- 3 (18,75%) mutaciones silenciosas no presentes en sangre periférica, además de las que sí que se encontraban en sangre periférica.
- 4 (25%) mutaciones intrónicas no presentes en sangre periférica. Dos de las 4 mutaciones no están descritas pero probablemente sean patogénicas ya que se encuentran en las posiciones -2 y -1 del exón y pueden alterar su procesamiento. Otra de las mutaciones afecta a la posición +15, por lo que es improbable que cause enfermedad. La última mutación intrónica encontrada es una variante conocida que se considera un polimorfismo.

De manera global, se han identificado mutaciones patogénicas en 10 de los 15 (67%) CBC analizados, todas ellas diferentes. Ocho de las mutaciones eran exónicas y 2 intrónicas, como se detalla más adelante.

## RESVLTADOS

Las características de las mutaciones encontradas en las muestras tumorales se resumen en las tablas 18, 20 y 21. Los polimorfismos presentes en estas muestras son los mismos que se encontraban en sangre periférica, y por tanto no están incluidos en las tablas.

### - Mutaciones exónicas patogénicas, de tipo missense, inserciones y deleciones

**Tabla 18. Mutaciones exónicas patogénicas en muestras tumorales.**

MUTACIONES PATOGENICAS						
Número paciente	Exón	Mutación	Efecto en codificación	Dominio de	de PTCH1	Bibliografía afectado
<b>B9</b>	2	c.328G>A	p.G110R		Primer dominio extracelular (unión ligando Hedgehog)	Este trabajo
<b>B3</b>	3	c.403C>T	p.R135X truncada → proteína		Primer dominio extracelular (unión ligando Hedgehog)	Wicking (1997) <sup>191</sup>
<b>B1</b>	3	c.478insA	p.Q160TfsX4 → cambio de fase de lectura y proteína truncada		Primer dominio extracelular (unión ligando Hedgehog)	Marsh (2005) <sup>194</sup>
<b>B15</b>	3	c.572insTATA	p.Y191YfsX → cambio de fase de lectura y proteína truncada		Primer dominio extracelular (unión ligando Hedgehog)	Este trabajo
<b>B4</b>	6	c.769_776delA CAAACTT	p.T257RfsX25		Primer dominio extracelular (unión ligando Hedgehog)	Este trabajo
<b>B7</b>	6	c.820C>T	p.Q274X → truncada proteína		Primer dominio extracelular (unión ligando Hedgehog)	Klein (2005) <sup>99</sup>
<b>B8</b>	8	c.1161G>A	p.W387X → truncada proteína		Primer dominio extracelular (unión ligando Hedgehog)	Hahn (1996) <sup>71</sup>
<b>B6</b>	17	c.2801insCGAC CCCGTCGCG TA	p.Y934fsX → cambio de fase de lectura y proteína truncada		4º dominio extracelular	Este trabajo

En las muestras de CBC encontramos 4 mutaciones patogénicas no descritas previamente en la literatura: c.328G>A, c.572insTATA, c.769\_776delACAAACTT, y

## RESULTADOS

c.2801insCGACCCCGTCGCGTA. Por su naturaleza, las mutaciones c.572insTATA, c.769 776delACAAACTT y c.2801insCGACCCCGTCGCGTA son patogénicas ya que producen un cambio de sentido en la secuencia y originan un codón de parada prematuro.

La mutación c.328G>A;p.G110R es una mutación missense o con cambio de sentido, que produce un cambio de glicina por arginina en la posición 110. Mediante los programas bioinformáticos PolyPhen-2, Pmut y Mutation taster estudiamos si el cambio de aminoácido pudiera modificar la estructura de la proteína y alterar su función. Estos programas predijeron que esta mutación es posiblemente patogénica (tabla 19).

*Tabla 19. Comportamiento teórico de la mutación p.G110R que muestra el análisis informático*

Programa	Predicción	Valor	Referencia
<b>PoliPhen-2</b>	Patogénica	HumDiv prediction score= 0,871	0 neutral, 1 patogénica
<b>Pmut</b>	Patogénica	Neural Network= 0,6318	0 neutral, 1 patogénica
<b>Mutation taster</b>	Patogénica	AA change core= 125	0-225 (no influye en predicción)

Para reforzar la hipótesis de que esta mutación es deletérea, observamos que el aminoácido glicina en la posición 328 se encuentra conservado a lo largo de la evolución (figura 26).

## RESULTADOS

```

QUERY                RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIQ3QYLO#1          RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIQ90693#1          RRAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIF1NYG9#1          -----VGGRVSRLELNYT
spIF7DIP4#1          RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIQ983W6#1          RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIF1QRE4#1          RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIUPI00022B018D#1  RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIUPI00016E939E#1  RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIUPI00016E939D#1  RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIF1QHX5#1          -----VGGRVSRLELNYT
spIF1R8E2#1          RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIQ9W6T6#1          RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIUPI00016E939F#1  -KAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIG1KNA3#1          -----VGGRVSRLELNYT
spIUPI00016E93A0#1  RKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
spIG3NVD8#1          -----VGGRVSRLELNYT
spIF1Q8S0#1          QKAPLWLRRAFFQRLLPKLGCIYQKNCCKFLVVGLLIFG AFVAVGLRAANLETNVEELWVE----VGGRVSRLELNYT
    
```

**Figura 26.** Demostración de que el residuo de glicina se encuentra conservado a lo largo de la evolución.

- Mutación missense neutral y mutaciones silenciosas

**Tabla 20.** Mutación missense neutral y mutaciones silenciosas en muestras tumorales ausentes en sangre periférica.

MUTACIÓN MISENSE NEUTRAL						
Número paciente	Exón	Mutación	Efecto en codificación	en	Bibliografía	Frecuencia y efecto
B9	22	c.3592C>T	p.P1198S		Von Hoff (2009) <sup>172</sup>	Frecuencia desconocida, efecto neutral
MUTACIONES SILENCIOSAS						
Número paciente	Exón	Mutación	Efecto en codificación	en	Bibliografía	Frecuencia y efecto
B2	16	c.2703G>A	p.Q901Q		Este trabajo	Desconocido
B4	20	c.3387C>G	p.G1129G		Este trabajo	Desconocido
B9	22	c.3591C>T	p.S1197S		Este trabajo	Desconocido



## RESULTADOS

La mutación missense c.3592C>T;p.P1198S ha sido descrita en la literatura médica en una muestra tumoral CBC, sin estar presente en tejido sano del mismo paciente.<sup>172</sup> Sin embargo, es considerada como una alteración con efecto neutral y no patogénica. Las tres mutaciones silenciosas no presentes en sangre periférica no han sido descritas previamente en la literatura médica.

### - Mutaciones intrónicas

**Tabla 21.** *Mutaciones intrónicas no presentes en sangre periférica*

MUTACIONES INTRÓNICAS					
Número paciente	Exón	Mutación	Efecto en codificación	Bibliografía	Frecuencia
B5	15	c.2251-16_2251-2delGCCTCTTCTGTTCCA	Probablemente patogénica	Este trabajo	
B14	15	c.2560+9G>C	Neutral.	Pastorino (2005) <sup>193</sup>	Polimorfismo, 21%
B2	16	c.2703+1G>A	Probablemente patogénica	Este trabajo	
B4, B9, B11, B12	21	c.3549+15G>A	Desconocido	Este trabajo	

La mutación intrónica c.2251-16\_2251-2delGCCTCTTCTGTTCCA es una gran deleción que afecta a la posición -2 del intrón. Es una variante no descrita previamente, pero por su localización es probablemente patogénica ya que al encontrarse cerca del exón y ser una alteración tan grande podría afectar al procesamiento del mismo.

La mutación intrónica c.2560+9G>C había sido identificada tanto en sangre periférica como en la muestra tumoral de los pacientes B6, B9, B10 y B13. Sin embargo, se encontró en la muestra tumoral del paciente B14 sin estar presente en sangre periférica. Es

## RESVLTADOS

una mutación es considerada un polimorfismo, ya que se estima que está presente en el 21% de la población.

La mutación intrónica c.2703+1G>A es, por su naturaleza, probablemente patogénica, ya que por al encontrarse próxima al exón puede afectar al splicing. Sin embargo, para comprobarlo harían falta estudios posteriores con RNA.

De manera opuesta, la mutación c.3549+15G>A, no descrita anteriormente, se encuentra alejada del exón, por lo que es bastante improbable que afecte al splicing del RNA. Para determinar la frecuencia poblacional de esta mutación y establecer si se trata o no de un polimorfismo serían necesarios estudios poblacionales. En nuestro estudio llama la atención que sólo hemos encontrado esta mutación en muestras tumorales y en ningún caso estaba presente en sangre periférica.

- Resumen de mutaciones encontradas en muestras tumorales. En la tabla 22 se resumen las mutaciones halladas en los CBC, diferenciándolas por número de tumor y segmentadas según la presencia o no de elastosis. Se indica el subtipo histológico, y se diferencian los tipos de mutaciones.

**Tabla 22.** Resumen de las mutaciones en muestras tumorales. Se diferencian las mutaciones patogénicas intrónicas y exónicas (rojo) de las mutaciones intrónicas no patogénicas, exónicas silenciosas y missense neutrales (verde) y de los polimorfismos ya conocidos tanto intrónicos como exónicos (azul). Así mismo, se señalan las mutaciones presentes en sangre periférica de los pacientes a los que pertenece cada tumor.

	ELASTOSIS	HISTOLOGÍA	MUTACIONES PATOGENICAS	EXONICAS	POLIMORFISMOS MISSENSE EXONICOS	Y MUTACIONES INTRONICAS	MUTACIONES EN SANGRE PERIFERICA
<b>B1</b>	NO	Macronodular	c.478insA;p.Q160TfsX4		c.1665T>C;p.N555N c.2787C>T;p.N929N c.3944C>T;p.P1315L		c.1665T>C;p.N555N c.2787C>T;p.N929N c.3944C>T;p.P1315L
<b>B2</b>	NO	Superficial			c.2703G>A;p.Q901Q	c.2703+1G>A	
<b>B3</b>	NO	Macronodular	c.403C>T;p.R135X		c.1686C>A;p.A562A		c.1686C>A;p.A562A
<b>B4</b>	NO	Micronodular	c.769_776delACAAACTT;p.T257Rfs25		c.1686C>T;p.A562A c.3387C>G;p.G1129G	c.3549+15G>A	c.1686C>A;p.A562A
<b>B5</b>	NO	Macronodular				c.2251-16_2251-2delGCCTCTCTGT CCA	
<b>B6</b>	NO	Macronodular	c.2801insCGACCCGTCGCGTA;p.Y934insRRV		c.1665T>C;p.N555N c.3944C>T;p.P1315L	c.2560+9G>C	c.1665T>C;p.N555N c.3944C>T;p.P1315L c.2560+9G>C
<b>B7</b>	SÍ	Superficial macronodular	y c.820C>T;p.Q274X		c.1641C>T;p.S547S c.3944C>T;p.P1315L		c.1641C>T;p.S547S c.3944C>T;p.P1315L
<b>B8</b>	SÍ	Macronodular	c.1161G>A;p.W387X		c.4128C>T;p.S1376S c.3944C>T;p.P1315L (una única banda en secuenciación)		c.4128C>T;p.S1376S c.3944C>T;p.P1315L (una única banda en secuenciación)
<b>B9</b>	SÍ	Macronodular	c.328G>A;p.G110R		c.1686C>T;p.A562A c.3592C>T;p.P1198S c.3591C>T;p.S1197S	c.2560+9G>C c.3549+15G>A	c.1686C>T;p.A562A c.2560+9G>C
<b>B10</b>	SÍ	Macronodular			c.1686C>T;p.A562A	c.2560+9G>C	c.1686C>T;p.A562A c.2560+9G>C
<b>B11</b>	SÍ	Infiltrativo				c.3549+15G>A	
<b>B12</b>	SÍ	Superficial				c.3549+15G>A	
<b>B13</b>	SÍ	Superficial macronodular	y		c.1686C>T;p.A562A c.3944C>T;p.P1315L	c.2560+9G>C	c.1686C>T;p.A562A c.3944C>T;p.P1315L c.2560+9G>C
<b>B14</b>	SÍ	Superficial macronodular	y		c.1686C>T;p.A562A	c.2560+9G>C	c.1686C>T;p.A562A
<b>B15</b>	SÍ	Macronodular	c.572insTATA/p.Y191YfsX				

### **3. RESULTADOS DEL ESTUDIO CON ARRAY-CGH**

Se completó el estudio genético mediante CGH en 3 de las muestras de CBC asociado a SG y en 13 de las muestras tumorales de CBC esporádico.

#### **3.A. ANÁLISIS DE LA REGIÓN 9q22.3**

##### **3.A.1. CARCINOMA BASOCELULAR ASOCIADO A SÍNDROME DE GORLIN**

Mediante CGH se analizaron las pérdidas o ganancias de segmentos cromosómicos en las muestras de CBC asociado a SG. El gen *PTCH1* se encuentra mapeado en la región cromosómica 9q22.3, y esa fue la primera zona que se analizó. En dos de los casos, G1 y G2, se encontraron deleciones de segmentos cromosómicos a este nivel, que no estaban presentes en el tercer caso.

En la secuenciación del tumor G2 se encontró una única banda con la mutación c.403C>T;p.R135X. Esto podría ser debido a que la mutación esté presente en los dos alelos del tumor, o bien a que se haya producido una deleción del alelo sano. En el estudio de CGH se apreció que existía pérdida de la región que abarca desde 9q21 a 9q33, donde se encuentra el gen *PTCH1*. Por tanto, en este caso la mutación c.403C>T;p.R135X no se encontraba en homocigosis en este tumor, sino que el alelo sano había sido delecionado y por ello en secuenciación sólo se objetivaba el alelo enfermo.

Cabe destacar que en la secuenciación directa de *PTCH1* en las tres muestras tumorales se habían encontrado mutaciones patogénicas (tabla 23), siendo la del tercer caso una deleción que da lugar a un cambio en la fase de lectura y un codón de parada. Este

## RESULTADOS

codón de parada se encontraba en la décima parte final del exón, por lo que pudo no haber sido detectada por el CGH.

*Tabla 23. Mutaciones patogénicas en PTCH1 en los tumores de pacientes con síndrome de Gorlin que han sido estudiados mediante CGH.*

PACIENTE	SANGRE PERIFÉRICA	TUMOR
<b>G1</b>	c.385T>C; p.W129R	c.385T>C; p.W129R
<b>G2</b>	c.403C>T; p.R135X	c.403C>T; p.R135X (banda única en secuenciación)
<b>G3</b>	c.2204_2205delTT; p.F735CfsX2	c.2204_2205delTT; p.F735CfsX2

### 3.A.2. CARCINOMA BASOCELULAR ESPORÁDICO

En el análisis por CGH de las 13 muestras tumorales de CBC esporádico también se buscaron alteraciones que afectaran a la región cromosómica 9q22.3. No se encontraron ganancias a ese nivel, pero sí deleciones en el 56% de los casos de CBC esporádico.

### 3.B. ALTERACIONES RECURRENTES CUANTITATIVAS AFECTANDO A UN CROMOSOMA ENTERO

#### 3.B.1. CARCINOMA BASOCELULAR ASOCIADO A SÍNDROME DE GORLIN

Se estudiaron las pérdidas o ganancias de todo un cromosoma en todas las muestras tumorales. En los 3 CBC asociados a SG, no se encontraron alteraciones genómicas que afectaran a todo el cromosoma, o lo que es lo mismo, no existían monosomías o trisomías.

## RESULTADOS

### 3.B.2. CARCINOMA BASOCELULAR ESPORÁDICO

De manera contraria a los tumores asociados a SG, en 10 de los 13 CBCs estudiados se han encontrado alteraciones genómicas afectando a todo un cromosoma, lo que se traduce en presencia de trisomías y monosomías en estos tumores (tabla 24).

**Tabla 24.** Trisomías y monosomías en carcinomas basocelulares esporádicos estudiados con CGH

TRISOMÍAS	MONOSOMÍAS
+22: 5 casos (38,5%)	-4: 4 casos (30,8%)
+15: 4 casos (30,8%)	-3: 2 casos (15,4%)
+17: 4 casos (30,8%)	-5: 2 casos (15,4%)
+20: 4 casos (30,8%)	-8: 2 casos (15,4%)
	-10: 2 casos (15,4%)
	-13: 2 casos (15,4%)
	-15: 2 casos (15,4%)

Como se puede apreciar en la tabla 25, de los 10 los tumores que presentaban alteraciones en todo un cromosoma, 9 (90%) tenían alteraciones en más de 2 cromosomas de manera simultánea.

## RESVLTADOS

**Tabla 25.** Detalle de las trisomías y deleciones en carcinomas basocelulares esporádicos estudiados con CGH

NUMERO TUMOR	TRISOMÍAS O DELECCIONES
<b>B1</b>	
<b>B2</b>	
<b>B3</b>	
<b>B4</b>	+5, +22
<b>B5</b>	-3, -4, +6, +10, +15, +16, +17, +20, +21, +22
<b>B6</b>	-4, +6, +12, +15, +17, +20, +21, +22
<b>B7</b>	+17
<b>B8</b>	+5, +14, -15
<b>B9</b>	+2, -8, -15, -18
<b>B10</b>	-4, +7, +12, +15, +17, +20, +21, +22
<b>B11</b>	+1, -4, -5, +7, -10, -13, +15, +20, -22
<b>B12</b>	-1, -2, -5, +7, -8, -10, -13, -16, -20
<b>B13</b>	-3, +22

### 3.C. ALTERACIONES RECURRENTES PUNTUALES

Se observaron alteraciones puntuales de más de 1 MB en determinadas regiones cromosómicas, que se repetían en varios tumores. En las tablas 26 y 27 se resumen las ganancias y pérdidas globales (incluyendo los casos de CBC en SG y CBC esporádico) y específicas para los CBC asociados a SG y los CBC esporádicos.

## RESULTADOS

**Tablas 26 y 27. Resumen de ganancias y pérdidas en regiones de tamaño superior a 1 MB. Se diferencian las ganancias globales (carcinomas basocelulares en síndrome de Gorlin + carcinomas basocelulares esporádicos) sobre los 16 pacientes, ganancias en los 3 carcinomas basocelulares en síndrome de Gorlin y en el grupo de los 13 carcinomas basocelulares esporádicos.**

**Tabla 26**

GANANCIAS			
Región	Global (n=16)	CBC en S. de Gorlin (n=3)	CBC esporádico (n=13)
7q11	10 casos (63%)	2 casos (67%)	8 casos (62%)
16p11	9 casos (56%)	1 caso (33%)	8 casos (62%)
19p13.2	8 casos (50%)	1 caso (33%)	7 casos (54%)
22q11	7 casos (44%)	1 caso (33%)	6 casos (46%)

**Tabla 27**

PÉRDIDAS			
Región	Global (n=16)	CBC en S. de Gorlin (n=3)	CBC esporádico (n=13)
9q22.33	10 casos (63%)	2 casos (67%)	8 casos (62%)
9q33	9 casos (56%)	2 casos (67%)	7 casos (54%)
8p23.2	6 casos (38%)	2 casos (67%)	4 casos (31%)



## RESVLTADOS

### 3.C.1. CARCINOMA BASOCELULAR ASOCIADO A SÍNDROME DE GORLIN

Los 3 casos estudiados eran genéticamente heterogéneos, pero presentaban en común la pérdida a nivel 8p23.1 y ganancia a nivel de 14q11.2. Debido al escaso número de CBC asociados a SG que han sido estudiados mediante esta técnica, no se ha podido determinar si esta pérdida y esta ganancia se encuentran presentes en los CBC de SG de manera estadísticamente significativa.

### 3.C.2. CARCINOMA BASOCELULAR ESPORÁDICO

Se estudió estadísticamente mediante t-test si existían regiones alteradas con mayor frecuencia en CBC esporádicos en relación con los CBC en SG. Las regiones afectadas con una frecuencia estadísticamente significativa se encuentran resumidas en la tabla 28.

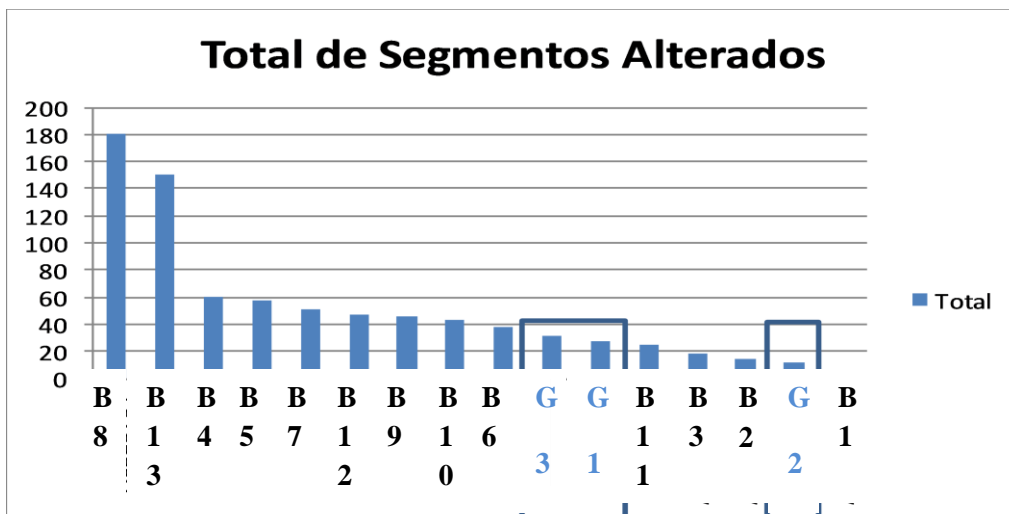
RESVLTADOS

**Tabla 28.** Regiones específicas alteradas en carcinomas basocelulares esporádicos estudiados con CGH

CROMOSOMA	REGIÓN ALTERADA
<b>Cromosoma 3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3p26.1-3p25</li> <li>• 3p24.3</li> <li>• 3p21</li> <li>• 3p14.3-3p11</li> <li>• 3p11.1-3q13.33</li> </ul>
<b>Cromosoma 4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4p15.1-4p11</li> <li>• 4q12-4q35.2</li> </ul>
<b>Cromosoma 7</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 7q11.21</li> <li>• 7q11.23</li> <li>• 7q21.3</li> <li>• 7q32.1-7q36.3</li> </ul>
<b>Cromosoma 8</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 8p23.1</li> </ul>
<b>Cromosoma 9</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 9p21.3-9p13.1</li> </ul>
<b>Cromosoma 11</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 11p15.1</li> </ul>
<b>Cromosoma 14</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 14q11.2</li> <li>• 14q23.2</li> <li>• 14q24.2</li> <li>• 14q31.3-14q32.11</li> <li>• 14q32.2-14q32.33</li> </ul>
<b>Cromosoma 19</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 19q13.43</li> </ul>
<b>Cromosoma 21</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 21q22.13-21q22.3</li> </ul>

**3.D. ANÁLISIS DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA**

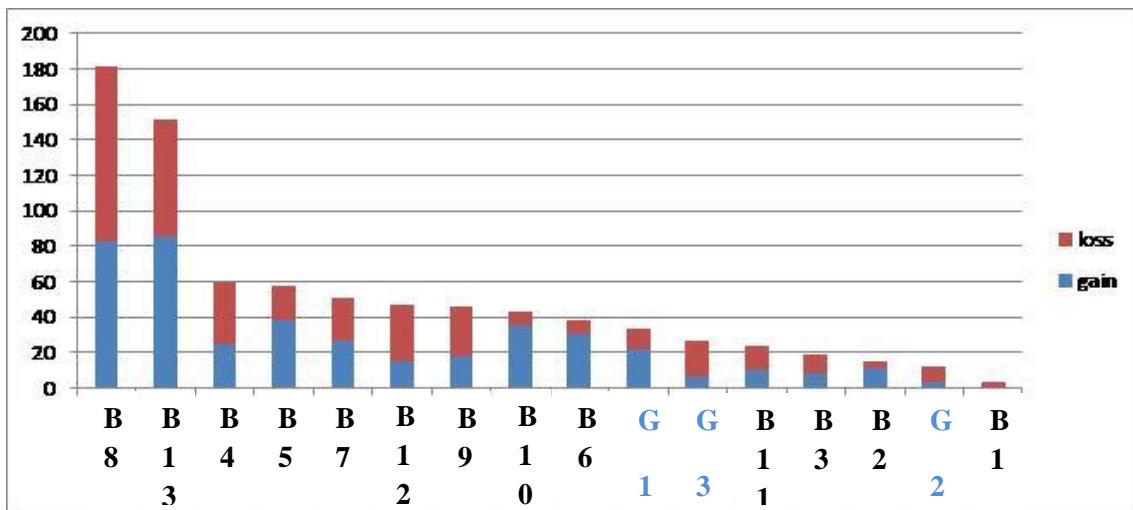
Se ha analizado la inestabilidad cromosómica contabilizando el número de segmentos alterados, ganados o perdidos en el análisis de segmentación. La mediana de cambios observados en el conjunto de CBC esporádicos y asociados a SG fue de 40 segmentos alterados por caso, con una mediana de 20 segmentos ganados y 17 delecionados por caso. Como se puede observar en la figura 27 la mayor parte de los CBC esporádicos tenían un mayor número de segmentos alterados mientras que los tres casos de SG tenían un menor número de segmentos alterados que la mediana de casos.



*Figura 27. Número de segmentos alterados en los carcinomas basocelulares esporádicos (rótulo negro) y en los carcinomas basocelulares en pacientes con síndrome de Gorlin (rótulo azul) que han sido estudiados con CGH.*

## RESVLTADOS

La frecuencia de ganancias y pérdidas de segmentos alterados era similar en los CBC esporádicos. En los CBC de SG numerados como G1 y G2 fue mayor el número de pérdidas de segmentos cromosómicos que de ganancias. Esta situación era inversa en el caso G3, que presentaba mayor número de ganancias de segmentos cromosómicos (Figura 28).



**Figura 28.** Número de segmentos ganados o perdidos en los carcinomas basocelulares esporádicos (rótulo negro) y en los carcinomas basocelulares en pacientes con síndrome de Gorlin (rótulo azul) que han sido estudiados con CGH.





## DISCVSIÓN





## DISCVSIÓN

El CBC es el tumor más frecuente en raza caucásica, representando aproximadamente al 80% de los tumores cutáneos no melanoma.<sup>4</sup> La forma de presentación más frecuente es la esporádica, pero existen también enfermedades hereditarias que cursan con CBC entre sus características clínicas, entre las que destaca el SG.<sup>3</sup> En este trabajo se analizan las características clínicas de una serie de pacientes con SG y CBC esporádico. Además, se realiza un estudio molecular tanto en muestras de sangre periférica de ambos grupos de enfermos como en los CBC que desarrollan.

### **1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

#### **1.A. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON SÍNDROME DE GORLIN**

El SG se transmite de manera autosómica dominante, con alta penetrancia y expresividad variable, sin haberse podido establecer hasta la fecha una correlación entre genotipo y fenotipo.<sup>104</sup> Con el fin de poder diagnosticar la enfermedad se han publicado diversas clasificaciones de criterios clínicos que han sido estratificados como mayores y menores según su relevancia. La última clasificación de estos criterios fue un documento de consenso publicado por Bree y cols en 2011, que incluía por primera vez el estudio molecular entre los criterios diagnósticos y consideraba el meduloblastoma como un criterio mayor de SG.<sup>130</sup> Sin embargo, ha existido controversia en relación con este documento de consenso. La inclusión del meduloblastoma entre los criterios mayores de enfermedad podría aumentar la sensibilidad del diagnóstico, pero según Evans y cols

## DISCVSIÓN

reduciría la especificidad, ya que los pacientes con meduloblastoma tratados con Rxt sin SG pueden también desarrollar CBC en el área radiada con mayor frecuencia que la población general. Estos autores propusieron acotar el criterio a meduloblastoma nodular o desmoplásico, para mejorar la sensibilidad sin perder especificidad.<sup>104</sup> A pesar de las diferencias entre las distintas propuestas de criterios diagnósticos, las características clínicas presentadas por los pacientes incluidos en nuestra serie permitían establecer su diagnóstico aplicando las diferentes clasificaciones. Este hecho indica que los pacientes presentan múltiples manifestaciones de la enfermedad y por tanto no parecen existir grandes diferencias en la sensibilidad y especificidad entre las listas de criterios diagnósticos.

Las características clínicas de los pacientes de nuestra serie son bastante congruentes con lo descrito en la literatura médica hasta la fecha, con algunas puntualizaciones que se detallan a continuación.

### - Desarrollo de carcinomas basocelulares.

Entre los criterios mayores del SG destaca por su frecuencia la aparición de CBC. Se ha estimado que los desarrollan el 80% de los pacientes caucásicos y alrededor del 40% de los afroamericanos.<sup>29</sup> En la serie publicada por Evans un 27% de adultos mayores de 20 años no presentaban CBC. Esta cifra se reducía con la edad, y encontraron que únicamente un 9,5% de mayores de 40 años estaban libres de estos tumores.<sup>128</sup>

Los 5 pacientes de nuestra serie presentaban CBC. Cuatro de los 5 pacientes eran mayores de 40 años, por lo que era esperable encontrar en ellos estas lesiones. Uno de los

## DISCUSIÓN

pacientes tenía 7 años al diagnóstico y desarrolló múltiples CBC tras ser tratado con Rxt por un meduloblastoma asociado a la enfermedad. Aunque la cirugía combinada con quimioterapia y Rxt son los tratamientos recomendados para el meduloblastoma, en los pacientes con SG se debería evitar el tratamiento con Rxt, ya que podría inducir a la aparición de CBC (además de meningioma, ependimoma y sabdomiosarcoma), con un aumento de la morbi-mortalidad. Sin embargo, el diagnóstico de SG a edades precoces puede ser complicado ya que pueden no haber desarrollado otros signos de la enfermedad.<sup>136</sup> No obstante, algunos autores recomiendan buscar alteraciones radiológicas de SG en los pacientes con sospecha, ya que están presentes hasta en un 90% de los niños menores de 5 años.<sup>138</sup>

### - Queratoquistes odontogénicos.

Los queratoquistes odontogénicos están presentes entre el 74 y el 90% de los pacientes con SG, dependiendo de las series.<sup>29,104</sup> Su aparición es más precoz que la de los CBC: pueden aparecer a los 4-5 años de edad y se estima que el 75% de los pacientes con SG los desarrollan antes de los 20 años.<sup>29</sup> Nuestros datos son congruentes con la literatura médica. Cuatro de los 5 pacientes tenían queratoquistes odontogénicos, y no se habían identificado únicamente en el paciente de 7 años de edad, probablemente porque aún no los hubiera desarrollado.

### - Pits palmoplantares.

Los pits palmoplantares también son frecuentes y aparecen entre el 70-87% de los enfermos con SG.<sup>29,128</sup> Los hemos encontrado en 4 de los 5 pacientes de nuestra serie, lo

## DISCUSIÓN

que representa una frecuencia similar a la publicada. El único paciente sin pits palmoplantares fue el niño de 7 años, lo que puede ser debido a que todavía no los hubiera desarrollado. En este sentido, la literatura médica señala que en menores de 10 años la frecuencia de pits es del 30-65% de los pacientes, cifra que aumenta con la edad.<sup>31</sup>

### - Calcificación de la hoz cerebral.

La calcificación de la hoz del cerebro es otro de los criterios mayores de SG por su frecuencia, ya que es un hallazgo presente en el 65-79% de los enfermos.<sup>26,29,31,128</sup> En nuestra serie se encontró solamente en 2 de los 5 pacientes (40%), con una frecuencia menor de la esperada. Ésto puede ser debido a que es un hallazgo infradiagnosticado, por lo que parece interesante buscar este criterio específicamente (sobre todo en casos dudosos) e indicarlo expresamente en la hoja de petición al radiólogo. Según los datos de Kimonis y cols, el cribado de esta manifestación parece más rentable a partir de los 20 años.<sup>26</sup> La calcificación de la hoz cerebral no se detecta en la infancia precoz<sup>79</sup> y puede ser el motivo por el que no se hubiera encontrado este hallazgo en el paciente de 7 años de nuestra serie.

### - Meduloblastoma.

El meduloblastoma aparece entre el 1 y 5% de los enfermos con SG.<sup>29</sup> Como se ha comentado anteriormente, uno de los cinco pacientes de este trabajo tuvo antecedente meduloblastoma. Al ser una serie corta el porcentaje parece mayor de lo publicado en la literatura médica, pero probablemente al introducir aleatoriamente más enfermos con SG la frecuencia de esta enfermedad disminuiría.

## DISCUSIÓN

### - Macrocefalia e hipertelorismo.

Cuatro de los 5 pacientes de nuestra serie presentaban macrocefalia, una frecuencia algo superior a la publicada en la literatura, que es del 50%.<sup>29</sup> Por el contrario, la frecuencia de hipertelorismo era similar a la descrita en otras series, que se sitúa entre 42 y 70%.<sup>29,31,133</sup>

### - Anomalías costales.

Se identificaron anomalías costales en uno de los cinco pacientes. Esto representa una frecuencia inferior de la esperada, que varía entre el 38-49%.<sup>26,29,134</sup> Probablemente este hecho sea debido también a que haya existido un infradiagnóstico, al no haberse reportado estas alteraciones en las radiografías de tórax que hayan sido solicitadas por otros motivos.

### - Otras anomalías esqueléticas.

Se han incluido dentro del mismo ítem “otras anomalías esqueléticas” a las anomalías vertebrales, cifoescoliosis, 4º metacarpiano corto y polidactilia postaxial, tal y como figura en los criterios de Bree.<sup>130</sup> No hay referencias que evalúen la frecuencia de estos hallazgos en conjunto, pero sí que parece que la frecuencia esperada debería de ser mayor, en vista de las frecuencias publicadas de cada característica por separado: se ha reportado cifoescoliosis hasta en el 43%,<sup>134</sup> hemivértebras en el 15%, fusión de cuerpos vertebrales en el 10%, cuerpos vertebrales elongados en el 13% de pacientes.<sup>26</sup> En nuestra serie sólo dos pacientes sufrían este tipo de alteraciones. Uno de los dos pacientes con anomalías esqueléticas presentaba varias alteraciones de manera simultánea, entre las que se encontraban deformidad de Sprengel, anomalías vertebrales y radiolucencias en

## DISCUSIÓN

radiografías de la mano. Es por tanto probable que nuestros datos puedan explicarse de dos formas: que haya existido un problema de infradiagnóstico en nuestra serie, o bien que cada paciente afectado en la literatura presentaba varias alteraciones radiológicas de manera simultánea y por tanto la cifra global de alteraciones radiológicas no costales sería más reducida de lo que cabría esperar.

### - Fibromas ováricos y cardíacos.

Una de los 5 pacientes presentaba fibromas ováricos, lo que es congruente con la literatura médica, que estima su frecuencia entre el 14-24% de la población.<sup>29,128</sup>

En conjunto, parece que la muestra representada en este trabajo reúne las características clínicas descritas en la literatura médica para esta enfermedad, y es representativa de la población caucásica con SG. Sin embargo, llama la atención que determinadas características radiológicas aparecían con menor frecuencia de la esperada, probablemente porque no se han buscado específicamente y con pruebas radiológicas específicas para ello. En los casos de nuestra serie no eran necesarios estudios radiológicos porque los pacientes ya cumplían otros criterios diagnósticos, pero sí pueden serlo en pacientes dudosos, con antecedentes familiares y sin otros signos de la enfermedad, o en edades precoces. Los hallazgos radiológicos se pueden identificar en la infancia y adolescencia y pueden ser claves para poder diagnosticar a los pacientes de manera temprana.<sup>29</sup> Las radiografías simples no emiten mucha radiación, por lo que recomendamos, al igual que Kimonis y cols, realizar radiografías simples de cráneo, parrilla costal, columna vertebral y radiografías de manos y pies para identificar algunos de los criterios diagnósticos de la enfermedad.<sup>26,29</sup>

## **1.B. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS CARCINOMAS BASOCELULARES ESPORÁDICOS**

Las características basales de la serie de pacientes con CBC esporádico son similares a las publicadas en la literatura médica para españoles menores de 65 años, por lo que se puede inferir que la muestra es representativa de la población de la que proviene. Sin embargo, existen unos sesgos que no invalidan el estudio y se comentan en las líneas sucesivas. El estudio puede incurrir en un sesgo de inclusión, ya que pretendíamos analizar las características clínicas y moleculares de CBC en pacientes más jóvenes de lo habitual, que previsiblemente tendrían unos mayores factores de riesgo intrínsecos excluyendo la edad (fototipo, presencia de alteraciones genéticas que confieran una mayor susceptibilidad) y extrínsecos.

### **- Fototipo.**

El fototipo de los enfermos de nuestra serie era similar al publicado en un estudio sobre los pacientes españoles y extranjeros con CCNM en la Costa del Sol, donde el fototipo II de Fitzpatrick era el predominante de los españoles (48%), seguido del III (42%) y del I (9%).<sup>195</sup> En otro estudio prospectivo en el que se incluyeron 1000 mujeres catalanas, se observó que tenían fototipos más oscuros: un 4% tenían fototipo I, un 21% fototipo II, un 53% fototipo III y un 18% fototipo IV. Al analizar las pacientes que presentaban CBC en esa cohorte, llamaba la atención que los fototipos de estas enfermas eran aún más oscuros: 22% fototipo II, 56% fototipo III, y 22% fototipo IV.<sup>196</sup> En nuestra serie, siete pacientes (47%) tenían un fototipo II, seis (40%) un fototipo III, y dos pacientes (13%)

## DISCVSIÓN

comparten características de los fototipos II y III de Fitzpatrick sin poder etiquetarse como uno u otro, lo que se asemeja a lo publicado en el estudio de la Costa del Sol.

### - Antecedentes familiares.

No hemos encontrado datos publicados sobre la frecuencia de antecedentes familiares de CBC en pacientes con CCNM en España, pero llama la atención que en nuestra serie únicamente 2 pacientes referían antecedentes familiares de CBC. Probablemente esto refleje el aumento ya demostrado de la incidencia de CBC en los últimos años en la población caucásica de Europa, Estados Unidos y Australia.<sup>13</sup> Como Lomas y cols apuntaban,<sup>5</sup> en nuestro caso parece debido a la existencia de mejores programas de vigilancia y mayor conciencia de la población sobre los tumores cutáneos, así como a un aumento de la exposición solar intermitente.

### - Edad media de aparición del primer carcinoma basocelular y del tumor estudiado.

#### Antecedente personal de carcinoma basocelular.

Nuestros pacientes tenían una media de edad de aparición del primer CBC de 50,21 años y una media de edad de aparición del tumor estudiado de 52,37 años. La distribución por sexos de nuestra muestra era similar a la esperada, que se sitúa en 1,4 hombres por cada mujer en los menores de 60 años.<sup>15</sup>

Nueve de los 15 (60%) pacientes de nuestro trabajo ya habían sido tratados de un CBC con anterioridad. Se ha descrito que el riesgo acumulado a los 3 años de desarrollar un nuevo CBC varía entre un 33-70% según los distintos estudios, estimando un meta-análisis el riesgo global en un 44%.<sup>197</sup> Otro trabajo en población inglesa estimó este riesgo en



## DISCUSIÓN

31%,<sup>34</sup> pero no hay estudios en población española. Consideramos que nuestros pacientes, al haber desarrollado un CBC a edad más joven que los enfermos del resto de estudios, probablemente tenían más factores de riesgo tanto intrínsecos como extrínsecos, y en consecuencia una mayor susceptibilidad para desarrollar un nuevo CBC. Esta hipótesis puede verse fundamentada en que se identificaron signos de daño actínico o dermatitis actínica crónica en 11 de los 15 (73%) enfermos.

Se ha demostrado que los pacientes con CBC superficiales y en tronco tienen mayor riesgo de desarrollar otro CBC en el futuro.<sup>34</sup> Además, los pacientes con CBC en tronco tienen mayor riesgo de tener múltiples CBC debido a posibles alteraciones de la inmunidad, y mutaciones en el gen glutatión S-transferasa que se asocian a la aparición posterior de múltiples CBC en tronco.<sup>38</sup> De los 9 pacientes de nuestra serie con CBC previos, el primer CBC se localizó en tronco sólo en 4 casos (44,4%), con la misma frecuencia que en cara y cuello.

### - Hábitos de exposición solar.

Los hábitos de exposición solar se asemejaban a los publicados, con una ligera mayor tendencia a la exposición crónica, debido fundamentalmente a la importancia de los empleos relacionados con la agricultura en la provincia de Salamanca y a la diferente metodología de la recogida de datos. Se ha publicado que el 48,4% de la población española recibe exposición solar recreacional, un 36,4% exposición profesional y un 15,2% ambos tipos.<sup>195</sup> Nosotros hemos evaluado los hábitos de exposición solar según los patrones “agudo”, “crónico”, y “ambos”. La exposición profesional quedaría englobada dentro del patrón crónico, y la recreacional fundamentalmente en el patrón agudo, aunque en algunos

## DISCUSIÓN

casos podría incluirse como exposición crónica. Puede ser por este motivo que en nuestra serie la exposición crónica sea algo mayor que lo publicado, obteniéndose en un 47% de los pacientes.

### - Tiempo de evolución y diámetro tumoral.

Llama la atención que hasta en un 40% de pacientes el tiempo de evolución es mayor de 24 meses y esto está en relación con el diámetro tumoral. En nuestra muestra 8 tumores (53%) medían entre 1,1 y 2 cm, 4 (27%) entre 0,51 y 1 cm, y únicamente 2 (13%) eran menores o iguales a 0,5 cm de diámetro. El mayor diámetro tumoral y en consecuencia un mayor tiempo de evolución en nuestro trabajo es debido a un sesgo de inclusión, ya que era más fácil y menos arriesgado obtener una muestra tumoral óptima para el estudio genético en tumores grandes. De esta manera conseguíamos maximizar el número de células tumorales que serían estudiadas genéticamente y minimizar el riesgo de comprometer el análisis histopatológico de los bordes profundos y laterales.

### - Localización del tumor estudiado.

La localización preferente en nuestra serie, al igual que en la literatura médica, fue la cara y el cuello, aunque con una proporción menor, debido a que quisimos recoger tumores de áreas no fotoexpuestas para poder comparar las características clínicas, histológicas y genéticas con los tumores de áreas fotoexpuestas. Se estima que en la población general el CBC esporádico aparece en cara y cuello en el 80% de los casos, seguido del tronco en el 15% de pacientes.<sup>2,4</sup> En nuestra serie 9 pacientes (60%) tenían afectación de cara y cuello y 6 (40%) en el tronco. Para confirmar que los tumores de áreas no fotoexpuestas realmente no estuvieran influenciados por el daño actínico comprobamos

## DISCUSIÓN

la ausencia de elastosis solar. Nueve tumores (60%) mostraban elastosis solar, que en la mayoría de los casos llegaba hasta dermis reticular.

### - Subtipo histológico.

Existe una ligera variabilidad en la literatura médica en relación a la frecuencia de los subtipos histológicos más frecuentes, según se considere o no el patrón mixto. En algunas series este subtipo no es tenido en cuenta y los tumores se clasifican en base al patrón predominante.<sup>78,122,198</sup> Nuestra serie muestra proporciones similares a las descritas en la literatura, con patrón macronodular como predominante en 8 casos (53%), seguido del patrón mixto en 3 casos (20%), superficial en 2 tumores (13%) y micronodular e infiltrativo en 1 caso cada uno (7%). En la literatura se postula que los CBC nodulares y superficiales pudieran tener distinta etiología,<sup>199,200</sup> y que tienden a aparecer en distintas zonas corporales: los CBC nodulares tienen predilección por cabeza y cuello y los superficiales por el tronco.<sup>201</sup> Ésto se ve reflejado en nuestra serie. Los dos CBC superficiales y 2 de los 3 CBC con patrón mixto se localizaban en el tronco. Además, de los 9 CBC localizados en cabeza y cuello 7 (77,8%) tenían patrón macro o micronodular, 1 (14,3%) patrón mixto y 1 (14,3%) patrón infiltrativo.

### - Elastosis solar.

Pelucchi y cols publicaron en 2007 un trabajo en el que encuentran un aumento del riesgo de aparición de CBC nodular en individuos con antecedente de exposición solar ocupacional frente a los que no la habían tenido (odds ratio=1,53, IC 95% 1,08-2,18). En ese mismo trabajo también se halla un aumento de la odds ratio para CBC nodular en sujetos con exposición solar recreacional de 1,75 (OC 95% 1,27-2,42). El riesgo aumentado

## DISCVSIÓN

de CBC superficial no lo consiguen demostrar ni en la exposición solar ocupacional ni en la recreativa.<sup>202</sup> Nosotros consideramos que este trabajo no es del todo preciso, ya que no todas las áreas corporales reciben la misma exposición solar: algunas zonas como las manos y la cara lo hacen de manera continua, y por el contrario hay otras como los glúteos, axilas y genitales que nunca están fotoexpuestas. Todos nuestros pacientes tenían antecedente de exposición solar crónica o aguda, pero no en todos los tumores encontramos elastosis actínica. Para ejemplificar que medir el daño solar mediante la historia clínica e incluso mediante la localización puede ser inexacto, tomaremos el ejemplo de los tres pacientes de nuestra serie con CBC en región retroauricular. Encontramos ausencia de elastosis actínica en dos de los tumores (B1 y B3), uno presente en una mujer y otro en un hombre. El tumor B9, procedente de un paciente varón con alopecia androgénica, presentaba elastosis solar. La localización retroauricular se incluye en la mayoría de los estudios dentro de la localización “cabeza y cuello”; pero en este área, al igual que en la zona frontoparietal, la exposición solar recibida puede verse influenciada por la ausencia o disminución de densidad capilar y la largura del cabello. Por ello consideramos que la determinación de elastosis actínica es un método más preciso y fiable para medir el daño actínico secundario a la exposición solar que ha recibido el área sobre la que asienta cada tumor. Además, así podríamos evitar incurrir en un sesgo de recuerdo, que ocurriría si preguntamos a un paciente con CBC u otro CCNM sobre su antecedente de exposición solar. Midiendo el daño actínico de esta manera nos llama la atención que 5 de los 6 (83%) tumores sin elastosis solar tenían subtipo histológico nodular. No existen trabajos en la literatura médica que hayan usado este procedimiento y con los que podamos comparar nuestros resultados. A pesar de que nuestra muestra es pequeña y no se puede establecer

## DISCVSIÓN

causalidad, parece que el patrón nodular, tanto macronodular como micronodular pudiera ser más frecuente en tumores sin influencia de la exposición solar, al contrario de lo descrito por Pelucchi. Sin embargo, harían falta estudios posteriores con mayor número de tumores para confirmarlo. Otro motivo para poner en duda los resultados de Pelucchi y cols, a pesar de tener una muestra mucho más grande que la nuestra, es que los intervalos de confianza de sus odds ratio son bastante amplios, incluso cercano a 1 en el caso del límite inferior de intervalo de confianza de la odds ratio de CBC nodular si hay exposición solar ocupacional. Por todo ello, consideramos que puede ser interesante comenzar a evaluar la elastosis actínica como marcador de daño actínico en cada tumor, para así evitar incurrir en un sesgo de medición así como en un sesgo de recuerdo.

## **2. ESTUDIO MOLECULAR**

### **2.A. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES PACIENTES CON SÍNDROME DE GORLIN**

Las mutaciones en el gen *PTCH1* se relacionan directamente con el desarrollo del SG,<sup>71</sup> habiéndose descrito alteraciones en este gen hasta en un 50-58% de los enfermos.<sup>23,99</sup> Como las mutaciones en *PTCH1* son específicas del SG, se incluyó en el documento de consenso de 2011 dentro de los criterios diagnósticos de la enfermedad.<sup>130</sup>

Nosotros hemos estudiado las regiones codificantes y las regiones intrónicas flanqueantes del gen *PTCH1* en 5 pacientes con SG mediante PCR y secuenciación directa, tanto en muestras de sangre periférica como en muestras tumorales. En tres de los tumores, además, se ha completado el estudio con CGH.

#### **2.A.1. ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES EN SANGRE PERIFÉRICA**

El estudio de las regiones codificantes en sangre periférica ha puesto de manifiesto 6 mutaciones: cuatro mutaciones patogénicas y dos polimorfismos (una mutación missense y otra mutación silenciosa).

##### **- Mutaciones patogénicas.**

La frecuencia de mutaciones patogénicas en sangre periférica fue mayor que la esperada, ya que se encontraron en 4 de los 5 enfermos (80%). Según la literatura médica, el 65% de las mutaciones en *PTCH1* en pacientes con SG producen un codón de parada prematuro,<sup>104</sup> aunque en nuestro trabajo esta frecuencia ha sido algo mayor (3 de las 4

## DISCUSIÓN

mutaciones). Dos de las mutaciones patogénicas ya habían sido descritas previamente: la mutación c.386G>A; p.W129X fue descrita por Soufir y cols<sup>190</sup> en 2006, y la mutación c.403C>T; p.R135X fue reportada por Wicking y cols<sup>191</sup> en 1997.

Las dos mutaciones no descritas hasta la fecha eran de dos tipos diferentes: una era una mutación missense y la segunda producía un cambio de fase de lectura. La mutación missense c.385T>C; p.W129R ha sido considerada como posiblemente patogénica por los tres programas bioinformáticos empleados. Soufir y cols describieron en la misma posición la mutación nonsense c.385G>A; p.W129X, en la que un residuo de triptófano es cambiado por un codón de parada.<sup>190</sup> No obstante, cabe recalcar que en su trabajo Soufir y cols cometieron una errata: ellos publicaron la mutación c.385G>A; p.W129X, cuando era realmente c.386G>A; p.W129X y así la hemos considerado. Como se puede observar en la figura 29, el residuo de guanina (coloreado en amarillo) se encuentra en la posición 386 de la secuencia de DNA codificante y el cambio de esa guanina por adenina de la mutación descrita por Soufir y cols originaría un codón de STOP (por la secuencia de nucleótidos TAG) en la posición 129 de la proteína. Por el contrario, en nuestra mutación se cambiaba la timina (coloreado en verde) de la posición 385 de la secuencia codificante por citosina, dando lugar al aminoácido arginina (debido a la secuencia de nucleótidos CGG) en la posición 129 de la proteína. En resumen, la mutación encontrada en nuestro paciente, c.385T>C; p.W129R, ha sido considerada como posiblemente patogénica por los programas bioinformáticos, se localizaba en una región altamente conservada en la evolución y además estaba próxima a la mutación patogénica descrita por Soufir,<sup>190</sup> lo que reforzaba su patogenicidad.

## DISCUSIÓN

```
361 CTCGAGACCAACGTGGAGGAGCTGTGGGTGGAAGTTGGAGGACGAGTAAGTCGTGAATTA  
361 CTCGAGACCAACGTGGAGGAGCTGGGGTGGAGTTGGAGGACGAGTAAGTCGTGAATTA  
121 -L--E--T--N--V--E--E--L--W--V--E--V--G--G--R--V--S--R--E--L-
```

*Figura 29. Secuencia de DNA codificante de PTCH1*

La segunda mutación no descrita, c.2204\_2205delTT; p.F735CfsX2, producía un cambio de fase de lectura que originaba un codón de STOP, por lo que debido a su naturaleza sería patogénica.

### - Polimorfismos.

Hemos encontrado dos polimorfismos en las regiones codificantes. El primero, c.1686C>A; p.A562A era una mutación silenciosa, ya descrita en la literatura por Fujii y cols, con efecto desconocido pero presente en un 4,7% de la población japonesa.<sup>105</sup> El segundo era la mutación missense c.3944C>T;p.P1315L. Se trataba de una mutación ya descrita, que produce un cambio de prolina por leucina en la posición 1315 de la secuencia de la proteína. Se ha propuesto que la pérdida del aminoácido prolina pudiera ser la causante de un cambio conformacional en la proteína que alteraría la capacidad de señalización de la misma, con lo que contribuiría a un mayor riesgo de desarrollo de CBC. El alelo con prolina es el alelo ancestral y está presente en el chimpancé, pero parece que su cambio por Leu pueda resultar una ventaja evolutiva en algunas poblaciones. La frecuencia del genotipo Pro/Pro varía según regiones, y es menos frecuente en individuos con fototipos claros. Se ha sugerido que los individuos con piel, cabello y ojos claros, que por tanto expresan más feomelanina, presentarían con menor frecuencia el alelo Pro ya que su presencia podría tener efecto deletéreo, con mayor riesgo de presentar CCNM. De hecho,



## DISCUSIÓN

en Irlanda, a pesar de que la mayor parte de su población tienen fototipos bajos, expresan con alta frecuencia los alelos Pro/Pro, y presentan un riesgo más elevado de CCNM que otras regiones. Se ha propuesto por un lado que el codón 1315 de *PTCH1* esté en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo importante, y que pudiera funcionar como un marcador. Por otro lado, pudiera ser que la presencia de prolina en ese codón constituyera por sí mismo un factor de riesgo en poblaciones con fototipos claros y expresión de feomelanina, aumentando el riesgo poblacional e individual de CBC. En la patogenia tumoral en estas poblaciones el efecto deletéreo de la presencia del alelo Pro estaría agravado por la pérdida del alelo Leu.<sup>192</sup> Sin embargo, no hay estudios sobre el efecto del alelo Pro o Leu en población mediterránea. En nuestro caso, el polimorfismo p.P1315L se ha detectado en tres de los cinco pacientes con SG. En la secuenciación del DNA de la muestra tumoral de la paciente G4 se apreciaba una única banda representando al alelo Leu, lo que indica que o bien se había producido una pérdida del alelo Pro o bien había ocurrido una nueva mutación en ese punto y por tanto el polimorfismo p.P1315L se encontraba en homocigosis. Esto podría sugerir que al contrario que en poblaciones con fototipos claros, en la población mediterránea el alelo prolina podría tener una función protectora, pero al no haber estudios más grandes al respecto no podemos confirmarlo.

### - Mutaciones intrónicas.

El estudio de las regiones intrónicas flanqueantes nos ha permitido detectar la mutación c.2560+9G>C en 2 de los 5 pacientes con SG. Esta mutación ha sido descrita con anterioridad por varios autores y se considera un polimorfismo<sup>193,203</sup> que se encuentra presente hasta en el 21% de la población.<sup>193</sup>

## DISCUSIÓN

### 2.A.2. ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES EN MUESTRAS TUMORALES

En las muestras tumorales de CBC asociados a SG se encontraron las mismas mutaciones que en sangre periférica más alguna adicional que se comenta a continuación.

#### - Mutaciones patogénicas.

En la secuenciación del ADN tumoral del paciente G2 se encontró una única banda con la mutación patogénica (c.403C>T;p.R135X). En el estudio por CGH se observó una pérdida en la región 9q21-9q23, lo que se traduce en que en esta muestra tumoral un alelo se encontraba mutado y el otro delecionado, lo que explica la aparición del CBC en ese paciente.

En el tumor G5 se encontró una mutación missense en el exón 23 no presente en sangre periférica, c.4282G>A;p.E1428K. Esta mutación se describe por primera vez en este trabajo. Dos de los 3 programas bioinformáticos de predicción estimaron que era probablemente patogénica. Por otro lado, el ácido glutámico en esa posición se encuentra muy conservado a lo largo de la evolución, lo que refuerza la patogenicidad de esta mutación. En este tumor, la presencia de la mutación en el exón 2 c.386G>A; p.W129X, ya presente en sangre periférica, y la nueva mutación en el exón 23 justificarían el desarrollo de la neoplasia.

Los pacientes G1 y G3 sólo mostraban como mutaciones patogénicas en *PTCH1* las alteraciones ya presentes en sangre periférica, que no serían suficientes para el desarrollo tumoral. Es probable que existan alteraciones en el gen *PTCH1* que no hemos podido

## DISCUSIÓN

encontrar mediante la técnica de PCR y secuenciación. Con este método únicamente se detectan mutaciones puntuales y no se pueden determinar deleciones o duplicaciones de un exón o del gen completo. Para ello se debe recurrir a otros procedimientos como la PCR cuantitativa, MLPA o los microarrays.<sup>104</sup> Es posible que existan deleciones o duplicaciones de fragmentos exónicos o genómicos que no hayamos podido detectar mediante la PCR y secuenciación directa, que unidos a la mutación en *PTCH1* presente en sangre periférica ocasionen el tumor. En los pacientes G1 y G3 no hemos realizado MLPA o PCR cuantitativa, pero sí CGH para intentar detectar ganancias o pérdidas afectando a todo un cromosoma o a otros genes.

En el estudio por CGH del paciente G1 se encontró una deleción en un segmento cromosómico que incluía la región 9q22.3, donde se localiza *PTCH1*. Esta alteración, unida a la mutación missense patogénica encontrada en sangre periférica sería suficiente para el desarrollo tumoral.

En el caso del paciente G3 no se encontraron ausencias o duplicaciones de material genético en la región 9q22.3. Llama la atención que en sangre periférica existía una deleción que producía un cambio de fase de lectura y un codón de parada prematuro. Este codón de parada se encontraba en la décima parte final del exón y puede que debido a su pequeño tamaño no haya sido detectado por CGH. No obstante, para detectar esta deleción y ausencias o duplicaciones de material genético más pequeñas serían más sensibles otras técnicas.

En el caso del paciente G4 no hemos encontrado mutaciones puntuales en sangre periférica ni en las muestras tumorales. La ausencia de mutaciones en *PTCH1* podría ser

## DISCVSIÓN

debido a que la paciente presentara otro gen de la vía Hh alterado, tal como *SUFU*, *SMO*, o la familia *Gli*. Por otro lado, puede que en ese tumor no existieran mutaciones puntuales en *PTCH1*, pero sí podría haber ganancias o pérdidas de material genético afectando a este gen que no fueran detectables por PCR y secuenciación. En este tumor no pudimos realizar MLPA ni CGH debido a que el DNA extraído de la muestra tumoral se degradó parcialmente después del estudio de PCR, por lo que se decidió no emplearlo con CGH ante la previsión de posibles resultados erróneos.

### **2.B. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LOS PACIENTES CON CARCINOMAS BASOCELULARES ESPORÁDICOS**

Hemos seguido la misma metodología para el estudio de los pacientes con CBC esporádicos. En primer lugar, hemos estudiado mediante PCR y secuenciación las regiones codificantes y las intrónicas flanqueantes del gen *PTCH1* en muestras de sangre periférica y de tumor. Posteriormente se completó el estudio mediante CGH en 13 de las 15 muestras tumorales.

#### **2.B.1. ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES EN SANGRE PERIFÉRICA**

##### **- Mutaciones silenciosas.**

En el estudio genético en sangre periférica no se encontraron mutaciones patogénicas en *PTCH1*, tal y como se esperaba. Sí se encontraron 3 mutaciones silenciosas no descritas previamente en la literatura: c.1641C>T;p.S547S, c.2787C>T;p.N929N y c.4128C>T;p.S1376S. Estas tres mutaciones podrían ser polimorfismos, aunque cada una

## DISCUSIÓN

de ellas sólo la encontramos en un paciente. No obstante, harían falta futuros estudios poblacionales para confirmar o descartar esta hipótesis.

### - Polimorfismos.

Se encontraron 4 polimorfismos ya descritos en la literatura, con frecuencias variables en la población: c.1686C>T;p.A562A, c.1686C>A;p.A562A, c.1665T>C;p.N555N y c.3944C>T;p.P1315L.<sup>193,105,192</sup> Tanto las mutaciones c.1686C>A;p.A562A como c.3944C>T;p.P1315L las hemos encontrado en el estudio en sangre periférica de 2 y 3 de los pacientes con SG respectivamente. La primera de ellas se encuentra en un 4,7% de la población,<sup>105</sup> pero su presencia en 2 de los 5 pacientes con SG pudiera ser debido a que confiriera un mayor riesgo de CBC esporádico y/o múltiple, algo que debería ser estudiado en un futuro sobre un mayor número de pacientes con SG. Como se ha comentado anteriormente, el polimorfismo c.3944C>T;p.P1315L se encuentra con mayor frecuencia en poblaciones con fototipos claros, y puede ser debido a que el alelo Pro tenga efecto deletéreo en estos pacientes.<sup>192</sup> En nuestra serie 5 de los 15 pacientes con CBC esporádico (33,3%) presentaban este polimorfismo. Tres de estos 5 pacientes tenían fototipo II y 2 pacientes fototipo III. El paciente B8, con fototipo II, es el único que presentaba este polimorfismo en homocigosis en sangre periférica. Al igual que en la población sueca, la frecuencia de los alelos Pro/Pro era predominante en pacientes con CBC esporádico (66,7% en nuestra serie frente al 44,3% en el estudio en población sueca). La frecuencia de Pro/Leu en nuestros pacientes ha sido menor que en los suecos (26,7% frente a 40,9%), al igual que de la variante Leu/Leu (6,7% frente a 14,8% en pacientes suecos). Como apuntan Asplund y cols., parece que en población con fototipos más oscuros

## DISCVSIÓN

la presencia de prolina podría no inducir necesariamente un mayor riesgo de CBC,<sup>192</sup> pero al no haber estudios sobre la verdadera frecuencia de esta mutación en población sana mediterránea (con la que comparar nuestros resultados sobre población enferma) no podemos establecer conclusiones definitivas para nuestros pacientes.

### - Mutaciones intrónicas.

El estudio de las regiones intrónicas flanqueantes reveló la mutación c.2560+9G>C en 4 de los 15 pacientes. Esta mutación ya ha sido descrita y se considera un polimorfismo, ya que en estudios poblacionales está presente en un 21% de la población,<sup>193</sup> una frecuencia similar a la que encontramos en este estudio sobre pacientes con CBC.

## 2.B.2. ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES EN MUESTRAS TUMORALES.

### - Mutaciones patogénicas exónicas.

En el estudio mediante PCR y secuenciación de las muestras de DNA tumoral, además de las mutaciones presentes en sangre periférica, hemos encontrado 8 mutaciones exónicas patogénicas. Siete de las 8 mutaciones patogénicas exónicas afectaban al primer dominio extracelular de la proteína PTCH1, que es una de las regiones que interactúa con el ligando HH. Esta frecuencia es mayor de la esperada, ya que a pesar de que este dominio es grande y alberga un gran número de mutaciones, otros estudios no observan tanta predilección por esta región de la proteína.<sup>102,103</sup>

## DISCVSIÓN

Cuatro de estas mutaciones patogénicas identificadas ya han sido descritas previamente: c.403C>T;p.R135X, c.478insA;p.Q160TfsX4, c.820C>T;p.Q274X, y c.1161G>A;p.W387X.<sup>71,99,191,194</sup>

Dos de las 4 mutaciones no descritas, c.572insTATA;p.Y191YfsX y c.2801insCGACCCCGTCGCGTA;p.Y934fsX, eran inserciones que provocaban un cambio de fase de lectura y un codón de parada prematuro, por lo que por su naturaleza eran patogénicas. La mutación c.769\_776delACAAACTT;p.T257RfsX25 era una delección que también produce un codón de parada prematuro y por tanto es patogénica.

Por último, hemos identificado en uno de los tumores la mutación missense c.328G>A;p.G110R, que no ha sido descrita previamente. Los tres programas bioinformáticos empleados predijeron que esta mutación era probablemente patogénica, lo que viene apoyado por la alta conservación del aminoácido glicina en la posición 110 de la proteína a lo largo de la evolución. En 2005 Tanioka y cols describieron una mutación similar que consideraron patogénica, y afecta también a la guanina en la posición 328 del DNA. Sin embargo, la mutación descrita en ese trabajo es c.328G>T, que según los autores produciría el cambio p.G110R.<sup>204</sup> No obstante y como se puede apreciar en la figura 30, c.328G>T se traduciría en p.G110W y no en p.G110R. Por tanto, se podría considerar que la mutación que nosotros hemos identificado no ha sido descrita con anterioridad, ya que el grupo de Tanioka habría reportado la mutación c.328G>T; p.G110W. Además, el hecho de que se haya considerado patogénica otra mutación diferente afectando la misma posición indica que cambios en ese residuo de glicina pueden resultar deletéreos.

## DISCVSIÓN

```
301 TTCTTGGTTGTGGGCCTCCTCATATTTGGGGCCTTCGCGGTGGGATTAAAAGCAGCGAAC  
301 TTCTTGGTTGTGGGCCTCCTCATATTTGGGGCCTTCGCGGTGGGATTAAAAGCAGCGAAC  
101 -F--L--V--V--G--L--L--I--F--G--A--F--A--V--G--L--K--A--A--N-
```

*Figura 30. DNA transcrito de PTCH1. El cambio de guanina en la posición 328 del transcrito por alanina se traduce en arginina, pero si el cambio de guanina es por timina daría lugar al aminoácido triptófano en la posición 110 de la proteína.*

### - Mutación missense no patogénica.

Se ha identificado la mutación missense c.3592C>T;p.P1198S en uno de los tumores, pero no en la sangre periférica de ese paciente. Esta mutación ha sido descrita por Von Hoff y cols, y aunque su frecuencia en la población general es desconocida, parece que se trata de una variante neutral.<sup>172</sup>

### - Mutaciones silenciosas.

Las mutaciones silenciosas halladas en muestras de sangre periférica de los pacientes también estaban presentes en sus respectivas muestras tumorales. Se han detectado además tres mutaciones silenciosas en tres tumores, que no se encontraban en las muestras de sangre periférica de los pacientes correspondientes: c.2703G>A;p.Q901Q, c.3387C>G;p.G1129G y c.3591C>T;p.S1197S. Estas mutaciones no han sido descritas con anterioridad. Podrían ser polimorfismos, pero para determinarlo deberían realizarse estudios poblacionales en un futuro.



## DISCUSIÓN

### - Mutaciones intrónicas.

En el análisis mediante PCR y secuenciación directa también se comprobaron las regiones intrónicas flanqueantes a los exones. Se encontraron 4 mutaciones intrónicas. Una de ellas, c.2560+9G>C, ha sido descrita previamente y se considera un polimorfismo.<sup>193</sup> Además, esa misma mutación estaba presente en sangre periférica y por tanto tumor de 2 pacientes con SG y en 4 pacientes con CBC esporádico de nuestras series.

Dos de las 3 mutaciones intrónicas no publicadas podrían ser patogénicas. La mutación c.2251-16\_2251-2delGCCTCTTCTGTTCCA producía una delección de 15 nucleótidos desde la posición -16 a la -2 del intrón, por lo que es probable que afectara al procesamiento del mRNA. La mutación c.2703+1G>A también se encontraba cercana al exón y por ello también era probable que afectara al splicing. Para confirmarlo habrían hecho falta estudios adicionales sobre RNA que no pudieron ser realizados en este caso.

La última mutación no descrita, c.3549+15G>A, estaba posicionada lejos del exón, por lo que probablemente no afectara al procesamiento del RNA y su efecto fuera neutro. Podría tratarse de un polimorfismo, pero harían falta futuros estudios poblacionales para confirmarlo.

### - Resumen de las mutaciones patogénicas.

Diez de los 15 (66,7%) tumores analizados presentaban mutaciones patogénicas en el gen *PTCH1*, considerando como tales las 2 mutaciones intrónicas comentadas anteriormente junto con las 8 mutaciones patogénicas exónicas mencionadas. La frecuencia de mutaciones puntuales en *PTCH1* encontradas por PCR y secuenciación era similar a la

## DISCUSIÓN

publicada por Reifenberger y cols en un estudio sobre 42 CBC en población alemana, donde encuentran un 67% de mutaciones en este gen,<sup>100</sup> y también similar al 69% reportado por Jayaraman en 13 CBC de pacientes estadounidenses.<sup>77</sup> Otros estudios describen un menor porcentaje de mutaciones: 48% en otro estudio en población alemana<sup>101</sup> y 54,8% en población asiática.<sup>102</sup>

Solamente dos (20%) de las mutaciones puntuales patogénicas presentaban cambios C>T o CC>TT, atribuibles a la luz UV, lo que representa un porcentaje menor del 40% descrito por Reifenberger<sup>100</sup> y el 68% por Heitzer y cols.<sup>101</sup> Esto puede ser debido en parte a la inclusión en nuestra serie de tumores en áreas no fotoexpuestas.

## 2.C. ESTUDIO MEDIANTE CGH

El estudio de *PTCH1* mediante secuenciación de PCR permite únicamente analizar mutaciones puntuales de tipo missense, nonsense, inserciones y deleciones de pequeño tamaño, y mutaciones en que afecten a los sitios de splicing. Sin embargo, mediante esta técnica no se pueden detectar deleciones o duplicaciones de fragmentos más grandes como un exón, un gen, un brazo cromosómico o un cromosoma completo.<sup>104</sup> Con este objetivo decidimos emplear CGH para completar el estudio en 13 de los CBC esporádicos y en 3 de los CBC asociados a SG. Debido a la insuficiente calidad o cantidad de la muestra de DNA tumoral en 2 CBC esporádicos y en 2 CBC asociados a SG, se decidió no emplear esta técnica para así evitar un posible falseamiento de los resultados.

El CBC se considera un tumor relativamente estable genéticamente, aunque puede expresar cierto grado de inestabilidad cromosómica.<sup>72</sup> Existen hasta la fecha pocos estudios que analicen la presencia de aneuploidías en estos tumores, todos ellos realizados sobre CBC esporádicos y ninguno sobre CBC asociados a SG. Fortier-Beaulieu investigaron la presencia de aneuploidías en 65 CBC esporádicos empleando citometría de flujo, y demostraron que la presencia de aneuploidías era mayor en CBC queratinizantes y metatípicos.<sup>205</sup> Posteriormente, Casalone y cols estudiaron mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH) muestras directas de CBC esporádicos (con mayor contenido en células epiteliales) y de CBC cultivados (con mayor contenido en fibroblastos), con resultados inconsistentes entre los dos tipos de preparaciones, debido probablemente a que las muestras cultivadas tenían mayor contaminación por fibroblastos no tumorales. Sólo encontraron cambios cromosómicos clonales en el 38% de los CBC esporádicos.

## DISCUSIÓN

Demostraron que en algunos CBC existe trisomía del cromosoma 6, así como una mayor incidencia de inversión y duplicación de la región 9q11q21.<sup>206</sup>

La técnica CGH permite estudiar alteraciones en el número de copias en cromosomas en metafase.<sup>207</sup> Hasta la fecha sólo se han publicado dos estudios sobre CBC esporádicos con CGH,<sup>208,209</sup> con lo que este trabajo sería el tercero y el primero que emplea esta técnica en CBC asociados a SG.

### - Estudio de la región 9q22.3.

En nuestro trabajo se han encontrado deleciones abarcando la región 9q22.3, donde se encuentra mapeado *PTCHI*, en un 56% de los CBC esporádicos y en 2 de los 3 CBC asociados a SG. Este resultado es mayor del publicado en la literatura para CBC esporádicos, que es de 33% de deleciones en el estudio de Ashton y cols.<sup>208</sup> La mayor incidencia de alteraciones en nuestro estudio puede deberse a la metodología: en el trabajo de Ashton emplearon muestras de CBC sobre parafina, sin microdisecionar el tejido tumoral. Por ello es posible que el número de células tumorales fuera menor y por tanto pudiera existir mayor contaminación de la muestra tumoral, con la consecuente infraestimación del número de alteraciones. Por el contrario, en nuestro trabajo hemos sido muy exhaustivos con la calidad de la muestra tumoral, extraída en fresco del centro del tumor extirpado, con posterior control de la concentración de DNA tumoral extraído.

Al igual que en el estudio de Ashton, la tasa de pérdida de heterocigosidad en *PTCHI*, estudiada por PCR y secuenciación directa, es mayor que las alteraciones de esa región detectadas por CGH. En nuestro estudio encontramos un 66,7% de mutaciones puntuales en *PTCHI*, frente al 57% del trabajo de Ashton.<sup>208</sup>

## DISCUSIÓN

### - Alteraciones recurrentes cuantitativas afectando a un cromosoma.

En nuestro estudio hemos encontrado aneuploidías en 10 de los 13 CBC (76,9%) y en ninguno de los 3 CBC asociados a SG. Esta frecuencia también es intermedia a la publicada en la literatura, que oscila entre un 62,1% del trabajo de Pesz<sup>209</sup> y el 80% de Ashton.<sup>208</sup> El hecho de que tanto en nuestro trabajo como en el de Ashton la incidencia de aneuploidías sea mayor que en el estudio de Pesz puede deberse a que nuestros estudios analicen un número menor de muestras y en consecuencia no incluyan tantas variantes histológicas como el trabajo de Pesz.

### - Alteraciones recurrentes puntuales.

Los 3 CBC asociados a SG tenían en común la pérdida en la región 8p23.1 y ganancia en 14q11.2, sin que hayamos encontrado genes en esas regiones que puedan justificar la carcinogénesis. No obstante, la muestra era pequeña y no se ha podido determinar si esta pérdida y esta ganancia se encontraban presentes en los CBC de SG de manera estadísticamente significativa.

El análisis de pérdidas y ganancias de regiones cromosómicas difiere del publicado en la literatura para los CBC esporádicos. Observamos ganancias en 7q11 en 8 (62%) CBC esporádicos y en 2 (67%) CBC asociados a SG. En otros estudios se identifican ganancias en regiones del cromosoma 7 en el 13% de los CBC esporádicos,<sup>208</sup> con menor frecuencia que en el nuestro. Dentro de esta región se encuentra mapeado el gen del receptor *Wnt Drosophila frizzled homolog FZD3*,<sup>210</sup> implicado en la carcinogénesis en otros tumores y que interactúa con la vía Hh.<sup>82</sup>

## DISCUSIÓN

Se han identificado ganancias en 9p21.3-9p13.1 en el 50% de los CBC esporádicos y en ninguno de los asociados a SG. Este resultado contrasta con la literatura, donde se describen ganancias en 9p en un 20% de los CBC esporádicos.<sup>208</sup>

Un 37,5% de los CBC esporádicos presentaron ganancias en la región 7q32.1, donde se encuentra mapeado *SMO*. Así mismo, un 37,5% de los CBC esporádicos tenían ganancia en 7q36.3, región en la que se encuentra en gen *SHH*. Por el contrario, ninguno de los 3 CBC asociados a SG tenía alteraciones en las regiones 7q32.1 ni en 7q36.3.

Otras regiones con ganancias para los CBC esporádicos han sido 16p11 en un 62%, 19p13.2 en el 54% de los casos y 22q11 en el 44%. Estas regiones no han sido descritas como las más frecuentemente alteradas en otras publicaciones.

En otros estudios se detectan también ganancias en los cromosomas 18 y X,<sup>207,208,211</sup> que no están presentes en el trabajo de Pesz<sup>209</sup> ni tampoco hemos observado en nuestros tumores.

Entre las pérdidas destacaron las regiones 9q33 en 7 (54%) CBC esporádicos y en 2 de los 3 CBC asociados a SG, y de 8p23.2 en 4 (31%) de los CBC esporádicos y 2 de los 3 CBC asociados a SG. En los trabajos de Ashton y Pesz se describen pérdidas en 9q en el estudio por CGH hasta el 33% de las muestras, pero no especifican las regiones concretas, si son 9q22.3 o 9q33.<sup>208,209</sup> Además, en este último trabajo encuentran deleciones totales de cromosoma 9 en el 47,5% de los casos, algo que no observamos en nuestra serie.<sup>209</sup>

En contraste con lo publicado llama la atención la ausencia de ganancias en 6p y 6q. La parte central del brazo corto de cromosoma 6 alberga oncogenes implicados en la

## DISCUSIÓN

progresión tumoral. Las ganancias en 6p se han asociado con enfermedad avanzada, metastásica o peor pronóstico en diferentes tumores sólidos (entre ellos melanoma) y hematológicos.<sup>212</sup> El primer estudio sobre ganancias en el cromosoma 6 en CBC lo realizaron Nangia y cols en 2001. Mediante FISH encontraron ganancias en el cromosoma 6 en los 4 CBC metastásicos analizados y en 2 de los 4 CBC localmente agresivos. Por el contrario, ninguno de los CBC no agresivos tenía ganancias en el cromosoma 6, por lo que concluyeron que este tipo de alteraciones podrían estar ligadas a la adquisición de capacidad metastásica por el tumor.<sup>213</sup> Por el contrario, en la cohorte de Pesz encontraron ganancias del cromosoma 6 en 19 de los 101 (19%) casos, con ganancias en 6p en 5 casos y de 6q en 2 tumores. Al clasificar los tumores por su histología, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ganancias en el cromosoma 6 en los tumores localmente agresivos y los indolentes, aunque sí que encontraron ganancias totales o parciales del cromosoma 6 en 5 de 6 CBC basoescamosos. Concluyeron que las ganancias totales o parciales en el cromosoma 6 son un fenómeno más frecuente que las metástasis por CBC, y no guardan relación entre sí.<sup>209</sup> En el estudio de Ashton también se identificaron ganancias de 6p en el 47% y de 6q en el 20% de los casos,<sup>208</sup> y en el estudio mediante FISH de Casalone se demostraron ganancias en el cromosoma 6 en los CBC.<sup>206</sup> Por el contrario, el estudio del cariotipo tumoral realizado por Jin y cols no mostró ganancias parciales o totales del cromosoma 6,<sup>211</sup> pero probablemente es debido a la técnica, ya que la sensibilidad es mayor mediante FISH o CGH.<sup>207</sup> En nuestro trabajo hemos encontrado únicamente ganancias en todo el cromosoma 6 en 2 de los 13 (15,4%) tumores, con ganancias en 6p21.1 en 43,75% de los CBC esporádicos y en ninguno de los CBC asociados a SG. La frecuencia de ganancias en el cromosoma 6 que hemos hallado fue

## DISCUSIÓN

similar a la publicada, pero puede ser que a pesar de que sean hallazgos frecuentes, éstos no sean significativos y como apunta Pesz tampoco estén relacionados con la capacidad del tumor de metastatizar.<sup>209</sup>

### - Análisis de inestabilidad cromosómica.

Hemos realizado un análisis de la inestabilidad cromosómica en cada tumor empleando análisis de segmentación. Tanto en los CBC esporádicos como en los asociados a SG la mediana de cambios observados ha sido de 40 por caso, con una mediana de 20 segmentos ganados y 17 perdidos por tumor. Llama la atención que los CBC asociados a SG presentaron un menor número de segmentos alterados, posiblemente debido a que al tener de manera constitutiva un alelo de *PTCH1* u otro gen de la vía Hh mutado, necesiten menos cambios para el desarrollo tumoral. En nuestra serie el número de fragmentos alterados fue mayor que el publicado en los otros dos estudios que han empleado CGH. Ashton y cols encontraron una media de  $1,9 \pm 1,5$  DE alteraciones por tumor.<sup>208</sup> En el trabajo de Pesz no se cuantificaron las alteraciones, pero sí describieron un mayor número de éstas en CBC basoescamoso y un menor número de copias en las variantes histológicas micronodular, esclerosante e infiltrativo, que atribuyeron a la contaminación por el estroma, ya que los márgenes quirúrgicos en estos tumores son difíciles de delimitar.<sup>209</sup>

En nuestra series hemos realizado CGH únicamente en un tumor infiltrativo (B11), que ha sido el cuarto con menor número de segmento alterados. El resto de los CBC eran de histología macronodular, micronodular y superficial y aparentemente no se ha registrado mayor o menor número de copias en ninguno de estos grupos, aunque haría falta una cohorte mayor para poder afirmarlo con rotundidad. En nuestra serie el mayor número de



## DISCVSIÓN

segmentos alterados podría ser debido a la metodología de extracción de muestra tumoral, ya que al emplear para ello un punch del centro del tumor, dejando margen lateral y profundo suficiente para el estudio histológico y el control de bordes, nos aseguramos una mayor cantidad de tejido tumoral y una menor contaminación por fibroblastos. Por otro lado, el hecho de que no haya CBCs de subtipo histológico morfeiforme y sólo se haya incluido un CBC infiltrativo en nuestra serie puede haber contribuído al resultado.

## DISCUSIÓN

En resumen, en este estudio hemos pretendido caracterizar tanto clínica como molecularmente una serie de pacientes con CBC esporádico y CBC asociado a SG. Las características clínicas principales y la tasa de mutaciones patogénicas en *PTCHI* eran similares a las descritas en la literatura médica para ambas poblaciones. Este estudio confirma el papel fundamental de *PTCHI* y la vía Hh en el desarrollo de CBC esporádicos y en el SG. Sin embargo, hemos encontrado alteraciones que afectan a otros genes no implicados en la vía Hh, sobre todo en CBC esporádicos, que hemos intentado caracterizar mediante CGH.

Somos conscientes de las limitaciones del trabajo. En primer lugar hay que destacar el escaso número de pacientes, sobre todo aquellos con SG. Nos ha resultado complicado encontrar pacientes con tumores lo suficientemente grandes como para extraer de ellos una muestra dejando material suficiente para el estudio anatomopatológico, y más aún en el caso en los enfermos con SG, una enfermedad con una baja prevalencia. Debido a que la muestra tumoral extraída para el diagnóstico molecular era pequeña no se pudo extraer RNA para los estudios que confirmaran la patogenicidad de las dos mutaciones intrónicas cercanas al exón. Otra de las limitaciones ha sido la ausencia de estudio por MLPA en aquellos casos en que no se encontraron mutaciones en *PTCHI*. En estos casos puede ser que exista una inserción o deleción no identificada mediante PCR y secuenciación, que sí que habría sido identificada por MLPA. Con ese fin, en vez de MLPA en este estudio se ha empleado CGH.

En un futuro sería interesante, para complementar la técnica CGH, realizar el estudio por MLPA en aquellos tumores y pacientes con SG sin mutación patogénica en

## DISCVSIÓN

*PTCH1*. Así mismo, sería necesario confirmar si las mutaciones silenciosas no descritas son polimorfismos mediante estudios poblacionales. Por otro lado, serían interesantes dos nuevos proyectos. El primero estaría encaminado a estudiar tanto la frecuencia del polimorfismo c.3944C>T;p.P1315L en población mediterránea en general y según los fototipos de Fitzpatrick, como a determinar el posible papel de las diferentes variantes alélicas en la patogénesis tumoral en estos pacientes. El segundo proyecto se dirigiría a caracterizar el papel de la elastosis actínica como marcador de daño actínico y su relación con los diferentes subtipos histológicos, así como con la carga genética de los tumores.



## CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. No se ha encontrado correlación entre las características clínicas y anatomopatológicas de los CBC esporádicos ni de los CBC asociados a SG con las alteraciones moleculares.

2. Nuestros resultados muestran que la mayoría de los pacientes con SG reúnen criterios clínicos suficientes para establecer el diagnóstico y en consecuencia, el estudio genético no sería imprescindible para realizar dicho diagnóstico.

3. Nuestro trabajo confirma la importancia de *PTCH1* y la vía Sonic Hedgehog en la patogenia del CBC asociado a SG y de CBC esporádico.

4. Se presenta el primer estudio con CGH de una serie de CBC asociados a SG, señalando como posible papel patogénico la pérdida de la región 8p23.1 y ganancia de 14q11.2 en estos tumores.

5. En esta investigación se pone de manifiesto que en la patogenia del CBC asociado a SG y del CBC esporádico existen numerosas alteraciones genéticas además de las mutaciones en *PTCH1*. En el estudio con CGH se han evidenciado un gran número de segmentos cromosómicos alterados en CBC esporádicos y en menor medida en CBC asociados a SG, lo que podría cambiar el concepto de estabilidad genética que se tenía hasta la fecha sobre este tumor.

6. Este trabajo confirma los hallazgos descritos en los dos estudios previos con CGH en CBC esporádicos, a excepción de las alteraciones cromosómicas en los

## CONCLUSIONES

cromosomas 18 y X. Además, se describen en algunos de los tumores ganancias en las regiones 7q32.1 y 7q36.3 donde están mapeados SMO y SHH respectivamente. Se postulan como posibles nuevas regiones afectadas las ganancias de 16p.11, 19p13.2 y 22q11; y 8p23.2 destaca como una región de pérdida.







## BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

1. Dreier J, Cheng PF, Bogdan Alleman I, Gugger A, Hafner J, Tschopp A, et al. Basal cell carcinomas in a tertiary referral centre- a systematic analysis. *Br J Dermatol*. 2014;171:1066-72.
2. Miller SJ. Biology of basal cell carcinoma ( Part I ). *J Am Acad dermatol*. 1991;24:1-13.
3. Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2007;157 Suppl :47-51.
4. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005;353:2262-9.
5. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012;166:1069-80.
6. Jacob A. Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face. *Dublin Hosp Rep*. 1824;4:232-9.
7. Krompecher E. *Der Basalzellkrebs*. Jena: Gustav Fischer; 1903.
8. Satinoff M, Wells C. Multiple basal cell naevus syndrome in Ancient Egypt. *Med Hist* 1969;13:294-7.
9. Jarisch W. Zur lehre von den hautgeschwulsten. *Arch Dermatol Syph*. 1894;28:163-5.
10. White JC. Multiple benign cystic ephiteliomata. *J Cutan Genitourin Dis*. 1894;12:477-84.
11. Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple Nevoid Basal-Cell Epithelioma, Jaw Cysts and Bifid Rib — A Syndrome. *N Engl J Med*. 1960;262:908-12.
12. Wu S, Han J, Li WQ, Li T, Qureshi AA. Basal-cell carcinoma incidence and associated risk factors in U.S. women and men. *Am J Epidemiol*. 2013;178:890-7.
13. Sella T, Goren I, Shalev V, Shapira H, Zandbank J, Rosenblum J, et al. Incidence Trends of Keratinocytic Skin Cancers and Melanoma in Israel 2006-2011. *Br J Dermatol*. 2015;172:202-7.
14. Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014;810:120-40.

## BIBLIOGRAFÍA

15. Xiang F, Lucas R, Hales S, Neale R. Incidence of Nonmelanoma Skin Cancer in Relation to Ambient UV Radiation in White Populations, 1978-2012: Empirical Relationships. *JAMA Dermatol.* 2014;150:1063-71.
16. Pilgrim W, Hayes R, Hanson D, Zhang B, Boudreau B, Leonfellner S. Skin cancer (Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant melanoma): new cases, treatment practice, and health care costs in new brunswick, Canada, 2002-2010. *J Cutan Med Surg.* 2014;18:320-31.
17. Efron PA, Chen MK, Glavin FL, Kays DW, Beierle EA. Pediatric basal cell carcinoma: case reports and literature review. *J Pediatr Surg.* 2008;43:2277-80.
18. Vilar-Coromina N, Miró-Queralt J, Cano-Bautista A, Vilardell-Gil L, Torres Babié P, Marcos-Gragera R. Non-melanoma skin cancer: incidence time trends analysis in Girona, Spain, 1994-2007. *Med Clin (Barc).* 2011;137:145-51.
19. Doherty V. Basal cell carcinoma incidence in the U.K. *Br J Dermatol.* 2013;169:964.
20. Harris RB, Griffith K, Moon TE. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancers in southeastern Arizona, 1985-1996. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 45:528-36.
21. Revenga Arranz F, Paricio Rubio JF, Mar Vázquez Salvado M, del Villar Sordo V. Descriptive epidemiology of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma in Soria ( north-eastern Spain ) 1998 - 2000 : a hospital-based survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2004;18:137-41.
22. Bielsa I, Soria X, Esteve M, Ferrándiz C, Skin Cancer Study Group of Barcelonès Nord. Population-based incidence of basal cell carcinoma in a Spanish Mediterranean area. *Br J Dermatol.* 2009;161:1341-6.
23. Evans DG, Howard E, Giblin C, Clancy T, Spencer H, Huson SM, et al. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:327-32.
24. Farndon PA, Del Mastro RG, Evans DG, Kilpatrick MW. Location of gene for Gorlin syndrome. *Lancet.* 1992;339(8793):581-2.
25. Lo Muzio L, Pastorino L, Levanat S, Musani V, Situm M, Ponti G, et al. Clinical utility gene card for: Gorlin syndrome--update 2013. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:1-3.
26. Kimonis VE, Mehta SG, Digiovanna JJ, Bale SJ, Pastakia B. Radiological features in 82 patients with nevoid basal cell carcinoma (NBCC or Gorlin) syndrome. *Genet Med.* 2004;6:495-502.

## BIBLIOGRAFÍA

27. Lam C, Ou JC, Billingsley EM. “PTCH”-ing It Together: A Basal Cell Nevus Syndrome Review. *Dermatol Surg*. 2013;39:1557–72.
28. Tom WL, Hurley MY, Oliver DS, Shah MR, Bree AF. Features of basal cell carcinomas in basal cell nevus syndrome. *Am J Med Genet A*. 2011;155A:2098–104.
29. Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, Yang ML, Kase R, DiGiovanna JJ, et al. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet*. 1997;69:299–308.
30. Jones EA, Sajid MI, Shenton A, Evans DG. Basal cell carcinomas in gorlin syndrome: a review of 202 patients. *J Skin Cancer*. 2011;2011:217378.
31. Lo Muzio L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:32. doi:10.1186/1750-1172-3-32.
32. Wilding A, Ingham SL, Lalloo F, Clancy T, Huson SM, Moran A, et al. Life expectancy in hereditary cancer predisposing diseases: an observational study. *J Med Genet*. 2012;49:264–9.
33. Ramachandran S, Fryer AA, Smith AG, Lear JT, Bowers B, Griffiths CE, et al. Basal Cell Carcinoma. *Cancer*. 2000;89:1012–8.
34. Lovatt TJ, Lear JT, Bastrilles J, Wong C, Griffiths CE, Samarasinghe V, et al. Associations between ultraviolet radiation, basal cell carcinoma site and histology, host characteristics, and rate of development of further tumors. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52:468–73.
35. Thirumaran RK, Bermejo JL, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Goessler W, et al. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and basal cell carcinoma of skin. *Carcinogenesis*. 2006;27:1676–81.
36. Pesz KA, Bieniek A, Gil J, Laczmanska I, Karpinski P, Makowska I, et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and basal cell carcinoma of the skin. *Int J Dermatol*. 2014;53:1474–7.
37. Lear JT, Smith AG, Bowers B, Heagearty AH, Jones PW, Gilford J, et al. Truncal tumor site is associated with high risk of multiple basal cell carcinoma and is influenced by glutathione S-transferase, GSTT1, and cytochrome P450, CYP1A1 genotypes, and their interaction. *J Invest Dermatol*. 1997;108:519–22.
38. Ramachandran S, Fryer AA, Smith A, Lear J, Bowers B, Jones PW, et al. Cutaneous basal cell carcinomas: distinct host factors are associated with the development of tumors on the trunk and on the head and neck. *Cancer*. 2001;92:354–8.

## BIBLIOGRAFÍA

39. Welsh MM, Applebaum KM, Spencer SK, Perry AE, Karagas MR, Nelson HH. CTLA4 variants, UV-induced tolerance, and risk of non-melanoma skin cancer. *Cancer Res.* 2009;69:6158–63.
40. Ramachandran S, Hoban PR, Ichii-jones F, Pleasants L, Ali-Osman F, Lear JT, et al. Glutathione S -transferase GSTP1 and cyclin D1 genotypes : association with numbers of basal cell carcinomas in a patient subgroup at high-risk of multiple tumours. *Pharmacogenetics.* 2000;10:545-56.
41. Rosen H, Schmidt B, Lam HP, Meara JG, Labow BI. Management of nevus sebaceous and the risk of Basal cell carcinoma: an 18-year review. *Pediatr Dermatol.* 2009;26:676–81.
42. Idriss MH, Elston DM. Secondary neoplasms associated with nevus sebaceus of Jadassohn: a study of 707 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70:332–7.
43. Silverberg MJ, Leyden W, Warton EM, Quesenberry CP Jr, Engels EA, Asgari MM. HIV infection status, immunodeficiency, and the incidence of non-melanoma skin cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105:350–60.
44. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med.* 2003;348:1681–91.
45. Ducroux E, Boillot O, Ocampo MA, Decullier E, Roux A, Dumortier J, et al. Skin cancers after liver transplantation: retrospective single-center study on 371 recipients. *Transplantation.* 2014;98:335–40.
46. Otley CC, Coldiron BM, Stasko T, Goldman GD. Decreased Skin Cancer After Cessation of Therapy With Transplant-Associated Immunosuppressants. *Arch Dermatol.* 2001;137:459–63.
47. Baibergenova AT, Weinstock MA, VATTC Trial Group. Oral prednisone use and risk of keratinocyte carcinoma in non-transplant population. The VATTC trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26:1109–15.
48. Cavalier M, Shmalo JA, Yu M, Billings SD, Abonour R, Nelson RP Jr. Skin cancer after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:1103–8.
49. Hasegawa W, Pond GR, Rifkind JT, Messner HA, Lau A, Daly AS, et al. Long-term follow-up of secondary malignancies in adults after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35:51–5.
50. Omland SH, Gniadecki R, Hædersdal M, Helweg-Larsen J, Omland LH. Skin Cancer Risk in Hematopoietic Stem-Cell Transplant Recipients Compared With



## BIBLIOGRAFÍA

- Background Population and Renal Transplant Recipients. *JAMA Dermatol.* 2015 Oct 10:1-7
51. Ferrucci LM, Vogel RI, Cartmel B, Lazovich D, Mayne ST. Indoor tanning in businesses and homes and risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer in 2 US case-control studies. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71:882-7.
  52. Archier E, Devaux S, Castela E, Gallini A, Aubin F, Le Maître M, et al. Carcinogenic risks of psoralen UV-A therapy and narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26 Suppl 3:22–31.
  53. Brellier F, Valin A, Chevallier-Lagente O, Gorry P, Avril MF, Magnaldo T. Ultraviolet responses of Gorlin syndrome primary skin cells. *Br J Dermatol.* 2008;159:445–52.
  54. Seidl H, Kreimer-Erlacher H, Bäck B, Soyer HP, Höfler G, Kerl H, et al. Ultraviolet Exposure as the Main Initiator of p53 Mutations in Basal Cell Carcinomas from Psoralen and Ultraviolet A- Treated Patients with Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2001;117:365–70.
  55. Heitzer E, Wolf P. Nonmonoclonal PTCH gene mutations in psoralen plus UVA-associated basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol.* 2008;128:746–9.
  56. Stern RS, PUVA Follow-Up Study. The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: a 30-year prospective study. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66:553–62.
  57. Karagas MR, Zens MS, Li Z, Stukel TA, Perry AE, Gilbert-Diamond D, et al. Early-onset basal cell carcinoma and indoor tanning: a population-based study. *Pediatrics.* 2014;134:e4–12.
  58. Karagas MR, Tosteson TD, Blum J, Morris JS, Baron JA, Klaue B. Design of an Epidemiologic Study of Drinking Water Arsenic Exposure and Skin and Bladder. *Environ Health Perspect.* 1998;106 Suppl 4:1047-50.
  59. Boonchai W, Green A, Ng J, Dicker A, Chenevix-Trench G. Basal cell carcinoma in chronic arsenicism occurring in Queensland, Australia, after ingestion of an asthma medication. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43:664–9.
  60. Surdu S, Fitzgerald EF, Bloom MS, Boscoe FP, Carpenter DO, Haase RF, et al. Occupational exposure to arsenic and risk of nonmelanoma skin cancer in a multinational European study. *Int J Cancer.* 2013;133:2182–91.
  61. Applebaum KM, Karagas MR, Hunter DJ, Catalano PJ, Byler SH, Morris S, et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, arsenic exposure, and non-

## BIBLIOGRAFÍA

- melanoma skin cancer in New Hampshire. *Environ Health Perspect.* 2007;115:1231–6.
62. Kim J, Aftab BT, Tang JY, Kim D, Lee AH, Rezaee M, et al. Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothened antagonists. *Cancer Cell.* 2013;23:23–34.
  63. Karagas MR, McDonald JA, Greenberg ER, Stukel TA, Weiss JE, Baron JA, et al. Risk of basal cell and squamous cell skin cancers after ionizing radiation therapy. For The Skin Cancer Prevention Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88:1848-53.
  64. Lichter MD1, Karagas MR, Mott LA, Spencer SK, Stukel TA, Greenberg ER. Therapeutic ionizing radiation and the incidence of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. The New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Arch Dermatol.* 2000;136:1007-11.
  65. Zhang Y, Ferrucci LM, Cartmel B, Molinaro AM, Leffell DJ, Bale AE, et al. Alcohol intake and early-onset basal cell carcinoma in a case-control study. *Br J Dermatol.* 2014;171:1451–7.
  66. Husein-Elahmed H, Aneiros-Fernandez J, Gutierrez-Salmerón M, Botella-Lopez M, Aneiros-Cachaza J, Naranjo-Sintes R. Alcohol intake and risk of aggressive histological basal cell carcinoma: a case-control study. *Eur J Dermatol.* 2012;22(4):525–30.
  67. Xiong MY, Korgavkar K, DiGiovanna JJ, Weinstock MA, Veterans Affairs Topical Tretinoin Chemoprevention Trial Group. Fluorouracil and Other Predictors of Morpheiform Basal Cell Carcinoma Among High-Risk Patients: The Veterans Affairs Topical Tretinoin Chemoprevention Trial. *JAMA Dermatol.* 2014;150:332-4.
  68. McDonald E, Freedman DM, Alexander BH, Doody MM, Tucker MA, Linet MS, et al. Prescription diuretic use and risk of basal cell carcinoma in the nationwide U.S. radiologic technologists cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23:1539–45.
  69. Gailani MR, Bale SJ, Leffell DJ, DiGiovanna JJ, Peck GL, Poliak S, et al. Developmental defects in gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. *Cell.* 1992;69:111–7.
  70. Reis A, Küster W, Linss G, Gebel E, Hamm H, Fuhrmann W, et al. Localisation of gene for the naevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Lancet.* 1992;339:617.
  71. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell.* 1996;85:841–51.

## BIBLIOGRAFÍA

72. Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:743–54.
73. Nüsslein-Volhard, C Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287:795:801.
74. Xie J, Bartels CM, Barton SW, Gu D. Targeting hedgehog signaling in cancer : research and clinical developments. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1425–35.
75. Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog Signal Transduction Network. *Sci Signal*. 2012;5:re6.
76. Athar M, Li C, Kim AL, Spiegelman VS, Bickers DR. Sonic Hedgehog Signaling in Basal Cell Nevus Syndrome. *Cancer Res*. 2014;74:4967–75.
77. Jayaraman SS, Rayhan DJ, Hazany S, Kolodney MS. Mutational Landscape of Basal Cell Carcinomas by Whole-Exome Sequencing. *J Invest Dermatol*. 2014;134:213-20.
78. Miller SJ, Moresi JM. Queratosis actínica, carcinoma basocelular y carcinoma epidermoide. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, eds. *Dermatología*. Madrid: Elsevier; 2004:1677–96.
79. Fujii K, Miyashita T. Gorlin syndrome (nevroid basal cell carcinoma syndrome) - an update and literature review. *Pediatr Int*. 2014;56:667-74.
80. Wang GY, Wang J, Mancianti ML, Epstein EH Jr. Basal cell carcinomas arise from hair follicle stem cells in *Ptch1(+/-)* mice. *Cancer Cell*. 2011;19:114-24
81. Ruiz-Salas V, Alegre M, López-Ferrer J, Garcés J. Vismodegib : revisión. *Actas Dermosifiliogr*. 2014;105:744–51.
82. Cohen MM. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A*. 2003;123A:5–28.
83. Allen BL, Tenzen T, McMahon AP. The Hedgehog-binding proteins *Gas1* and *Cdo* cooperate to positively regulate *Shh* signaling during mouse development. *Genes Dev*. 2007;21:1244–57.
84. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*. 1996;383:407–13.
85. Botchkarev VA, Fessing MY. Edar signaling in the control of hair follicle development. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2005;10:247–51.

## BIBLIOGRAFÍA

86. Lindström E, Shimokawa T, Toftgard R, Zaphiropoulos PG. PTCH Mutations : Distribution and Analyses. *Hum Mutat.* 2006;27:215–9.
87. Kogerman P, Krause D, Rahnema F, Kogerman L, Undén AB, Zaphiropoulos PG, et al. Alternative first exons of PTCH1 are differentially regulated in vivo and may confer different functions to the PTCH1 protein. *Oncogene.* 2002;21:6007–16.
88. Nagao K, Togawa N, Fujii K, Uchikawa H, Kohno Y, Yamada M, et al. Detecting tissue-specific alternative splicing and disease-associated aberrant splicing of the PTCH gene with exon junction microarrays. *Hum Mol Genet.* 2005;14:3379–88.
89. Nagao K, Toyoda M, Takeuchi-Inoue K, Fujii K, Yamada M, Miyashita T. Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, patched, having distinct first exons. *Genomics.* 2005;85:462–71.
90. Shimokawa T, Svärd J, Heby-Henricson K, Teglund S, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of first exon variants of the tumor-suppressor Patched1 in Hedgehog signaling. *Oncogene.* 2007;26:4889–96.
91. Shimokawa T, Rahnema F, Zaphiropoulos PG. A novel first exon of the Patched1 gene is upregulated by Hedgehog signaling resulting in a protein with pathway inhibitory functions. *FEBS Lett.* 2004;578:157–62.
92. Uchikawa H, Toyoda M, Nagao K, Miyauchi H, Nishikawa R, Fujii K, et al. Brain- and heart-specific Patched-1 containing exon 12b is a dominant negative isoform and is expressed in medulloblastomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349:277–83.
93. Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature.* 1996;384:176–9.
94. Kuwabara PE, Labouesse M. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet.* 2002;18:193–201.
95. Ohgami N, Ko DC, Thomas M, Scott MP, Chang CC, Chang TY. Binding between the Niemann-Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:12473–8.
96. Ming JE, Kaupas ME, Roessler E, Brunner HG, Golabi M, Tekin M, et al. Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. *Hum Genet.* 2002;110:297–301.
97. Barnes EA, Kong M, Ollendorff V, Donoghue DJ. Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J.* 2001;20: 2214-23 .

## BIBLIOGRAFÍA

98. Jin P, Hardy S, Morgan DO. Nuclear Localization of Cyclin B1 Controls Mitotic Entry After DNA Damage. *J Cell Biol.* 1998;141:875-85.
99. Klein RD, Dykas DJ, Bale AE. Clinical testing for the nevoid basal cell carcinoma syndrome in a DNA diagnostic laboratory. *Genet Med.* 2005;7:611-9.
100. Reifemberger J, Wolter M, Knobbe CB, Koehler B, Schoenicke A, Scharwaechter C, et al. Somatic mutations in the PTCH , SMOH , SUFUH and TP 53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 2005;152:43-51.
101. Heitzer E, Lassacher A, Quehenberger F, Kerl H, Wolf P. UV fingerprints predominate in the PTCH mutation spectra of basal cell carcinomas independent of clinical phenotype. *J Invest Dermatol.* 2007;127:2872-81.
102. Huang YS, Bu DF, Li XY, Ma ZH, Yang Y, Lin ZM, et al. Unique features of PTCH1 mutation spectrum in Chinese sporadic basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27:235-41.
103. Kim MY, Park HJ, Baek SC, Byun DG, Houh D. Mutations of the p 53 and PTCH gene in basal cell carcinomas : UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci.* 2002;29:1-9.
104. Evans D, Farndon P. Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. 2002 Jun 20 [updated 2015 Oct 1].
105. Fujii K, Kohno Y, Sugita K, Nakamura M, Moroi Y, Urabe K, et al. Mutations in the human homologue of Drosophila patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum Mutat.* 2003;21:451-2.
106. Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, et al. Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature.* 1998;391:90-2.
107. Chen Y, Struhl G. In vivo evidence that Patched and Smoothened constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex. *Development.* 1998;125:4943-8.
108. Alcedo J, Zou Y, Noll M. Posttranscriptional Regulation of Smoothened Is Part of a Self-Correcting Mechanism in the Hedgehog Signaling System. *Mol Cell.* 2000;6:457-65.
109. Kinzler KW, Ruppert JM, Bigner SH, Vogelstein B. The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature.* 1988;332:371-4.

## BIBLIOGRAFÍA

110. Kinzler KW, Vogelstein B. The GLI Gene Encodes a Nuclear Protein Which Binds Specific Sequences in the Human Genome. *Mol Cell Biol.* 1990;10:634-42.
111. Ruiz i Altaba A, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:361-72.
112. Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, et al. Characterization of the human Suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci.* 1999;112:4437-48.
113. Dunaeva M, Michelson P, Kogerman P, Toftgard R. Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins. *J Biol Chem.* 2003;278:5116-22.
114. Merchant M, Vajdos FF, Ultsch M, Maun HR, Wendt U, Cannon J, et al. Suppressor of Fused Regulates Gli Activity through a Dual Binding Mechanism. *Mol Cell Biol.* 2004;24:8627-41.
115. Li ZJ, Nieuwenhuis E, Nien W, Zhang X, Zhang J, Puviindran V, et al. Kif7 regulates Gli2 through Sufu-dependent and -independent functions during skin development and tumorigenesis. *Development.* 2012;139:4152-61.
116. Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Undén AB, Sandstedt B, et al. Mammalian Suppressor-of-Fused modulates nuclear – cytoplasmic shuttling of GLI-1. *Nat Cell Biol.* 1999;1:312-9.
117. Wang Y, Ding Q, Yen CJ, Xia W, Izzo JG, Lang JY, et al. The Crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways. *Cancer Cell.* 2012;21:374-87.
118. Gorlin R. Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Medicine (Baltimore).* 1987;66:98-113.
119. Kasper M, Jaks V, Hohl D, Toftgård R. Basal cell carcinoma — molecular biology and potential new therapies. *J Clin Invest.* 2012;122:455-63.
120. Johnston RB. Tumours of the epidermis. In: Johnston RB, ed. *Weedon's skin pathology essentials.* 1<sup>a</sup> ed. Elsevier Churchill Livingstone; 2012:507-27.
121. LeBoit P, Burg G, Weedon D, Sarasin A, editores. Pathology and Genetics of Tumours of the Skin. World Health Organization Classification of Tumours. 1<sup>a</sup> ed. Lyon: IARC Press; 2005.
122. Sexton M, Jones DB, Maloney ME. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. Study of a series of 1039 consecutive neoplasms. *J Am Acad Dermatol.* 1990;23:1118-26.
123. Goldberg LH. Basal cell carcinoma. *Lancet.* 1996;347:663-7.

## BIBLIOGRAFÍA

124. López-Villaescusa MT, de Manueles Marcos F, Pérez García LJ. Lesión pediculada de crecimiento lento. *Actas Dermosifiliogr*. 2014;105:789–90.
125. Maloney ME, Jones DB, Sexton FM. Pigmented basal cell carcinoma: Investigation of 70 cases. *J Am Acad Dermatol*. 1992;27:74–8.
126. Malvehy J, Puig S, Braun RP, Marghoob AA, Kopf AW. Carcinoma basocelular. In: Malvehy J, ed. *Manual de Dermatoscopia*. Barcelona: BCN Art Directe S.L.; 2006:19–20.
127. Lallas A, Apalla Z, Argenziano G, Longo C, Moscarella E, Specchio F, et al. The dermatoscopic universe of basal cell carcinoma. *Dermatol Pract Concept*. 2014;4:11–24.
128. Evans DG, Ladusans EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA. Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet*. 1993;30:460–4.
129. Shanley S, Ratcliffe J, Hockey A, Haan E, Oley C, Ravine D, et al. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: review of 118 affected individuals. *Am J Med Genet*. 1994;50:282-90.
130. Bree AF, Shah MR, BCNS Colloquium Group. Consensus statement from the first international colloquium on basal cell nevus syndrome (BCNS). *Am J Med Genet A*. 2011;155A:2091–7.
131. North JP, Mccalmont TH, Leboit P. Palmar pits associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Cutan Pathol*. 2012;39:736–8.
132. De Craene S, Batteauw A, Van Lint M, Claerhout I, Decock C. Subconjunctival epidermoid cysts in Gorlin-Goltz syndrome. *Orbit*. 2014;33:280–2.
133. Kiwilsza M, Sporniak-Tutak K. Gorlin-Goltz syndrome – a medical condition requiring a multidisciplinary approach. *Med Sci Monit*. 2012;18:RA145–53.
134. Ratcliffe JF, Shanley S, Chenevix-Trench G. The prevalence of cervical and thoracic congenital skeletal abnormalities in basal cell naevus syndrome; a review of cervical and chest radiographs in 80 patients with BCNS. *Br J Radiol*. 1995;68:596–9.
135. Hooper JE, Schofield J, Soran H, Whitehouse RW. Gorlin syndrome. *BMJ Case Rep*. 2013;2013:1–2..
136. Amlashi SF, Riffaud L, Brassier G, Morandi X. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: relation with desmoplastic medulloblastoma in infancy. A population-based study and review of the literature. *Cancer*. 2003;98:618–24.

## BIBLIOGRAFÍA

137. Northcott PA, Jones DT, Kool M, Robinson GW, Gilbertson RJ, Cho YJ, et al. Medulloblastomics : The End of the Beginning. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:818–34.
138. Evans DG, Farndon PA, Burnell LD, Gattamaneni HR, Birch JM. The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma. *Br J Cancer*. 1991;64:959–61.
139. Yang S, Zhao C, Zhang Y, Liao S. Mediastinal fetal rhabdomyoma in nevoid basal cell carcinoma syndrome: a case report and review of the literature. *Virchows Arch*. 2011;459:235–8.
140. Diociaiuti A, Inserra A, De Vega IF, Rota C, Surrenti T, Giraldi L, et al. Naevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome in a 22-month-old Child Presenting with Multiple Basal Cell Carcinomas and a Fetal Rhabdomyoma. *Acta Derm Venereol*. 2015;95:243-4.
141. Tang JY, Chiou AS, Mackay-Wiggan JM, Aszterbaum M, Chanana AM, Lee W, et al. Tazarotene: Randomized, double-blind, vehicle-controlled, and open-label concurrent trials for basal cell carcinoma prevention and therapy in patients with basal cell nevus syndrome. *Cancer Prev Res*. 2014;7:292–9.
142. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guideline for Treatment of Basal Cell Skin Cancer. Disponible de: URL: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/nmsc/pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nmsc/pdf) . Acceso el 15 de enero de 2015.
143. Telfer NR, Colver GB, Morton CA; British Association of Dermatologists. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2008;159:35–48.
144. Puig S, Berrocal A. Management of high-risk and advanced basal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2015;17:497-503.
145. Sterry W; European Dermatology Forum Guideline Committee. Guidelines : The management of basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol*. 2006;16:467-75.
146. Wolf DJ, Zitelli JA. Surgical Margins for Basal Cell Carcinoma. *Arch Dermatol*. 1987;123:340–4.
147. Ad Hoc Task Force, Connolly SM, Baker DR, Coldiron BM, Fazio MJ, Storrs PA, et al. AAD/ACMS/ASDSA/ASMS 2012 appropriate use criteria for Mohs micrographic surgery: a report of the American Academy of Dermatology, American College of Mohs Surgery, American Society for Dermatologic Surgery Association, and the American Society for Mohs Surgery. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67:531–50.



## BIBLIOGRAFÍA

148. Smeets NW, Krekels GA, Ostertag JU, Essers BA, Dirksen CD, Nieman FH, et al. Surgical excision vs Mohs' micrographic surgery for basal-cell carcinoma of the face: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004; 364:1766-72.
149. Otley CC. Mohs' micrographic surgery for basal-cell carcinoma of the face. *Lancet* 2005;365:1226-7.
150. Narayanan K, Hadid OH, Barnes EA. Mohs micrographic surgery versus surgical excision for periocular basal cell carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;12:CD007041.
151. Spiller WF, Spiller RF. Treatment of basal cell carcinomas by a combination of curettage and cryosurgery. *J Dermatol Surg Oncol*. 1997; 3: 443-7.
152. Micali G, Lacarrubba F, Nasca MR, Schwartz RA. Topical pharmacotherapy for skin cancer: part I. Pharmacology. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70:965.e1-12.
153. Goette DK. Topical chemotherapy with 5-fluorouracil. A review. *J Am Acad Dermatol*. 1981; 4: 633-49.
154. Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50:722-33.
155. Gollnick H, Barona CG, Frank RG, Ruzicka T, Megahed M, Tebbs V, et al. Recurrence rate of superficial basal cell carcinoma following successful treatment with imiquimod 5% cream: interim 2-year results from an ongoing 5-year follow-up study in Europe. *Eur J Dermatol*. 2005; 15:374-81.
156. Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer*. 1997;79:2282-308.
157. Rhodes LE, de Rie M, Enström Y, Groves R, Morken T, Goulden V, et al. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol*. 2004;140:17-23.
158. Varma S, Wilson H, Kurwa HA, Gambles B, Charman C, Pearse AD, et al. Bowen's disease, solar keratoses and superficial basal cell carcinomas treated by photodynamic therapy using a large-field incoherent light source. *Br J Dermatol*. 2001;144:567-74.
159. Clark C, Bryden A, Dawe R, Moseley H, Ferguson J, Ibbotson SH. Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and

## BIBLIOGRAFÍA

- comparison of light sources. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003;19:134–41.
160. Wang I, Bendsoe N, Klinteberg CA, Enejder AM, Andersson-Engels S, Svanberg S, et al. Photodynamic therapy vs . cryosurgery of basal cell carcinomas : results of a phase III clinical trial. *Br J Dermatol*. 2001;144:832–40.
161. Basset-Seguín N, Ibbotson SH, Emtestam L, Tarstedt M, Morton C, Maroti M, et al. Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy versus cryotherapy for superficial basal cell carcinoma: a 5 year randomized trial. *Eur J Dermatol*. 2008; 18: 547–53.
162. Szeimies RM, Ibbotson S, Murrell DF, Rubel D, Frambach Y, de Berker D, et al. A clinical study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8–20mm), with a 12-month follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22:1302-11
163. Morton CA, McKenna KE, Rhodes LE, British Association of Dermatologists Therapy Guidelines and Audit Subcommittee and the British Photodermatology Group. Guidelines for topical photodynamic therapy: Update. *Br J Dermatol*. 2008;159:1245–66.
164. Morton CA, Szeimies RM, Sidoroff A, Braathen LR. European guidelines for topical photodynamic therapy part 1: Treatment delivery and current indications - Actinic keratoses, Bowen’s disease, basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2013;27:536–44.
165. Basset-Seguín N, Bissonnette R, Girard C, Haedersdal M, Lear JT, Paul C, et al. Consensus recommendations for the treatment of basal cell carcinomas in Gorlin syndrome with topical methylaminolaevulinate-photodynamic therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28:626–32.
166. Dubin N, Kopf AW. Multivariate Risk Score for Recurrence of Cutaneous Basal Cell Carcinomas. *Arch Dermatol*. 1983;119:373-7.
167. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL Jr. Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol*. 1989;15:315–28.
168. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL Jr. Mohs surgery is the treatment of choice for recurrent (previously treated) basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol*. 1989;15:424–31.
169. Avril MF, Auperin A, Margulis A, Gerbaulet A, Duvillard P, Benhamou E, et al. Basal cell carcinoma of the face: surgery or radiotherapy? Results of a randomized study. *Br J Cancer*. 1997;76:100–6.

## BIBLIOGRAFÍA

170. Clark CM, Furniss M, Mackay-Wiggan JM. Basal cell carcinoma: an evidence-based treatment update. *Am J Clin Dermatol*. 2014;15:197–216.
171. Wong SY, Dlugosz AA. Basal cell carcinoma, Hedgehog signaling, and targeted therapeutics: the long and winding road. *J Invest Dermatol*. 2014;134:E18–22.
172. Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, et al. Inhibition of the Hedgehog Pathway in Advanced Basal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361:1164–72.
173. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2012;366:2171–9.
174. Tang JY, Mackay-Wiggan JM, Aszterbaum M, Yauch RL, Lindgren J, Chang K, et al. Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome. *N Engl J Med*. 2012;366:2180–8.
175. Cancer Therapy Evaluation Program [sede Web]. Bethesda: US National Institutes of Health; 2003 [acceso el 20 de marzo de 2015]. De DCTD, NCI, NIH D. Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.0. Disponible en: <http://ctep.cancer.gov>.
176. Ally MS, Tang JY, Joseph T, Thompson B, Lindgren J, Raphael MA, et al. The use of vismodegib to shrink keratocystic odontogenic tumors in patients with basal cell nevus syndrome. *JAMA Dermatol*. 2014;150:542–5.
177. Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alicke B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, et al. Smoothened mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science*. 2009;326:572–4.
178. Dijkgraaf GJ, Alicke B, Weinmann L, Januario T, West K, Modrusan Z, et al. Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothened mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer Res*. 2011;71:435–44.
179. Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, et al. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell*. 2010;17:388–99.
180. Kim J, Lee JJ, Kim J, Gardner D, Beachy PA. Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13432–7.
181. Kim DJ, Kim J, Spaunhurst K, Montoya J, Khodosh R, Chandra K, et al. Open-label, exploratory phase II trial of oral itraconazole for the treatment of basal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32:745–51.

## BIBLIOGRAFÍA

182. Tang T, Tang JY, Li D, Reich M, Callahan CA, Fu L, et al. Targeting superficial or nodular basal cell carcinoma with topically formulated small molecule inhibitor of smoothened. *Clin Cancer Res.* 2011;17:3378–87.
183. Skvara H, Kalthoff F, Meingassner JG, Wolff-Winiski B, Aschauer H, Kelleher JF, et al. Topical treatment of Basal cell carcinomas in nevoid Basal cell carcinoma syndrome with a smoothened inhibitor. *J Invest Dermatol.* 2011;131:1735–44.
184. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>a</sup>ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
185. Stitzel NO, Tseng YY, Pervouchine D, Goddeau D, Kasif S, Liang J. Structural location of disease-associated single-nucleotide polymorphisms. *J Mol Biol.* 2003;327:1021-30.
186. Stitzel NO, Binkowski TA, Tseng YY, Kasif S, Liang J. TopoSNP: a topographic database of non-synonymous single nucleotide polymorphisms with and without known disease association. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: D520-2.
187. Ferrer-Costa C, Orozco M, de la Cruz X. Characterization of disease-associated single amino acid polymorphisms in terms of sequence and structure properties. *J Mol Biol.* 2002;315:771–86.
188. Ferrer-Costa C, Orozco M, De La Cruz X. Sequence-based prediction of pathological mutations. *Proteins.* 2004;57:811–9.
189. Ferrer-Costa C, Gelpí JL, Zamakola L, Parraga I, de la Cruz X, Orozco M. PMUT: A web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinformatics.* 2005;21:3176–8.
190. Soufir N, Gerard B, Portela M, Brice A, Liboutet M, Saiag P, et al. PTCH mutations and deletions in patients with typical nevoid basal cell carcinoma syndrome and in patients with a suspected genetic predisposition to basal cell carcinoma: a French study. *Br J Cancer.* 2006;95:548–53.
191. Wicking C, Shanley S, Smyth I, Gillies S, Negus K, Graham S, et al. Most Germ-Line Mutations in the Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome Lead to a Premature Termination of the PATCHED Protein , and No Genotype-Phenotype Correlations Are Evident. *Am J Med Genet.* 1997;60:21–6.
192. Asplund A, Gustafsson AC, Wikonkal NM, Sela A, Leffell DJ, Kidd K, et al. PTCH codon 1315 polymorphism and risk for nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2005;152:868–73.

## BIBLIOGRAFÍA

193. Pastorino L, Cusano R, Nasti S, Faravelli F, Forzano F, Baldo C, et al. Molecular Characterization of Italian Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome Patients. *Hum Mutat.* 2005;25:322-3.
194. Marsh A, Wicking C, Wainwright B, Chenevix-Trench G. DHPLC analysis of patients with Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome reveals novel PTCH missense mutations in the sterol-sensing domain. *Hum Mutat.* 2005;26:283.
195. Aguilar Bernier M, Rivas Ruiz F, De Troya Martín M, Blázquez Sánchez N. Comparative epidemiological study of non-melanoma skin cancer between Spanish and north and central European residents on the Costa del Sol. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26:41-7.
196. Estrada JG. Non-melanoma skin cancer in Catalonia . A community-based prevalence study. *Int J Dermatol.* 2005;44:922-4.
197. Marcil I, Stern RS. Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. *Arch Dermatol.* 2000;136:1524-30.
198. Bernard P, Dupuy A, Sasco A, Brun P, Duru G, Nicoloyannis N, et al. Basal Cell Carcinomas and Actinic Keratoses Seen in Dermatological Practice in France: A Cross-Sectional Survey. *Dermatology.* 2008;216:194-9.
199. Bastiaens MT, Hoefnagel JJ, Bruijn JA, Westendorp RG, Vermeer BJ, Bouwes Bavinck JN. Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinoma indicate different types of tumors. *J Invest Dermatol.* 1998;110:880-4.
200. McCormack CJ, Kelly JW, Dorevitch AP. Differences in age and body site distribution of the histological subtypes of basal cell carcinoma. A possible indicator of differing causes. *Arch Dermatol.* 1997;133:593-6.
201. Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol.* 2002;147:41-7.
202. Pelucchi C, Di Landro A, Naldi L, La Vecchia C. Risk factors for histological types and anatomic sites of cutaneous basal-cell carcinoma: an italian case-control study. *J Invest Dermatol.* 2007;127:935-44.
203. Li TJ, Yuan JW, Gu XM, Sun LS, Zhao HS. PTCH germline mutations in Chinese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Oral Dis.* 2008;14:174-9.

## BIBLIOGRAFÍA

204. Tanioka M, Takahashi K, Kawabata T, Kosugi S, Murakami K, Miyachi Y, et al. Germline mutations of the PTCH gene in Japanese patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Arch Dermatol Res*. 2005;296:303–8.
205. Fortier-Beaulieu M, Laquerrière A, Thomine E, Lauret P, Hémet J. DNA flow-cytometric analysis of basal cell carcinomas and its relevance to their morphological differentiation: a retrospective study. *Dermatology*. 1994;188:94–9.
206. Casalone R, Mazzola D, Righi R, Granata P, Minelli E, Salvatore M, et al. Cytogenetic and interphase FISH analyses of 73 basal cell and three squamous cell carcinomas: different findings in ect preparations and short-term cell cultures. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;118:136–43.
207. Ashton KJ, Carless MA, Griffiths LR. Cytogenetic alterations in nonmelanoma skin cancer: a review. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;43:239–248.
208. Ashton KJ, Weinstein SR, Maguire DJ, Griffiths LR. Molecular cytogenetic analysis of basal cell carcinoma DNA using comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol*. 2001;117:683–6.
209. Pesz KA, Bieniek A, Makowska I, Szaśniadek MM. Basal cell carcinoma of the skin: whole genome screening by comparative genome hybridization revisited. *J Cutan Pathol*. 2013;40:25–9.
210. Pérez Jurado LA, Wang YK, Peoples R, Coloma A, Cruces J, Francke U. A duplicated gene in the breakpoint regions of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-135, a phosphorylation target of BTK. *Hum Mol Genet*. 1998;7:325–34.
211. Jin Y, Martins C, Salemark L, Persson B, Jin C, Miranda J, et al. Nonrandom karyotypic features in basal cell carcinomas of the skin. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;131:109–19.
212. Santos GC, Zielenska M, Prasad M, Squire JA. Chromosome 6p amplification and cancer progression. *J Clin Pathol*. 2007;60:1–7.
213. Nangia R, Sait SN, Block AW, Zhang PJ. Trisomy 6 in basal cell carcinomas correlates with metastatic potential: a dual color fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections. *Cancer*. 2001;91:1927–32.