

# ***EVALUACIÓN DE LAS ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS EN EL SÍNDROME DE LYNCH***



**Universidad  
de La Laguna**

***AUTOR: RAÚL JOSÉ DÍAZ MOLINA***

***DIRECTORES: MARTA CARRILLO PALAU &  
ENRIQUE QUINTERO CARRIÓN***

***DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD -  
SECCIÓN MEDICINA - ULL***

***SERVICIO DEL APARATO DIGESTIVO - CHUC***

## CONTENIDO

RESUMEN.....	3
ABSTRACT .....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN .....	19
CONCLUSIONES .....	23
¿QUÉ HE APRENDIDO? .....	23
BIBLIOGRAFÍA .....	24

## RESUMEN

Contexto.- El Síndrome de Lynch (SdL) es la forma más frecuente de cáncer colorrectal (CCR) hereditario. Las mutaciones de la línea germinal de los genes reparadores de ADN son responsables de su etiología. Existen diferentes estrategias para la detección de portadores, basadas en criterios clínicos o en criterios de inmunohistoquímica (IHQ).

Objetivo.- Evaluar las diferentes estrategias para el diagnóstico de SdL (Criterios de Amsterdam, Criterios de Bethesda, IHQ Universal) en nuestro medio y analizar si la IHQ universal permite una mejor aproximación diagnóstica a esta enfermedad.

Métodos.- Estudio retrospectivo, en el que se incluyen todos los pacientes intervenidos por CCR entre Septiembre 2016- Septiembre 2018, en los que se realizó, por protocolo universal, la IHQ de la pieza tumoral para analizar si hay pérdida de expresión de alguno de los complejos MMR.

Resultados.- 337 pacientes intervenidos de CCR. La edad media de diagnóstico del CCR fue de 68,12 años. Los criterios de Amsterdam II fueron negativos en 335 casos (99,4%) y positivos en 2 (0,6%). Los criterios de Bethesda Revisados se cumplieron en 91 pacientes (27%) y en 246 (73%) no. En 286 pacientes (96%) la IHQ no mostró inestabilidad de microsatélites y en 12 (4%) sí. De estos últimos, 7 cumplían criterios de Bethesda (58,3%) y 4 no (41,7%). Se realizaron el Estudio Genético 4 pacientes, ninguno de ellos (100%) cumplió criterios de Amsterdam II.

Conclusiones.- Los criterios clínicos de Amsterdam II son insuficientes para seleccionar a los pacientes de alto riesgo de CCR hereditario. Los criterios de Bethesda Revisados lograron un mayor rendimiento pero también presentaron pérdidas de pacientes. El Protocolo de IHQ Universal de genes MMR fue la técnica de mayor rentabilidad diagnóstica.

**Palabras clave:** Cáncer Colorrectal Hereditario, Síndrome de Lynch, Genes Reparadores de ADN, Cribado Universal.

## ABSTRACT

**Introduction.-** Lynch Syndrome (LS) is the most common form of hereditary colorectal cancer (CRC). Germline mutations in DNA mismatch repair genes are responsible of their etiology. There are different strategies for the detection of carriers, based on clinical criteria or on immunohistochemistry criteria (IHC).

**Objective.-** To evaluate the different strategies for the diagnosis of LS (Amsterdam Criteria, Bethesda Criteria, Universal Immunohistochemistry) in our setting and to analyze if Universal IHC allows a better diagnostic approach to this disease.

**Methods.-** Retrospective study, which includes all patients with diagnosed of CRC between September 2016 - 2018, in which initial evaluation of tumor tissue to test for deficient mismatch-repair proteins by means of IHC analysis was done, by universal protocol approach, in order to descart LS.

**Results.-** 337 patients with surgical treatment of CRC. The average of diagnosis age of CRC was 68.12 years. The Amsterdam II criteria were negative in 335 cases (99.4%) and positive in 2 (0.6%). The revised Bethesda criteria were positive in 91 patients (27%) and negative in 246 (73%). In 286 patients (96%) the IHC didn't show instability of microsatellites and in 12 (4%) yes. In this last group of patients, 7 have the Bethesda criteria (58.3%) and 4 didn't (41.7%). The Genetic Study was performed on 4 patients, all of them (100%) have the Amsterdam II criteria negative.

**Conclusions.-** The clinical criteria of Amsterdam II are insufficient to select patients with high risk of hereditary CRC. The revised Bethesda criteria shows higher performance but also presented patient losses. The Universal IHC Protocol of MMR genes was the technique with the better diagnostic capacity.

**Key words:** Hereditary Colorectal Cancer, Lynch Syndrome, Mismatch Repair Genes, Universal Screening.

## Introducción

El Cáncer Colorrectal (CCR) continúa siendo hoy en día una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad por cáncer en los países desarrollados. Cuenta con 1,36 millones de personas afectadas en todo el mundo, lo que representa un 10% del total de neoplasias<sup>9</sup>.

En la población española, en el año 2017, se detectaron 34.331 casos nuevos (15% del total) lo que la situó como la enfermedad neoplásica maligna más frecuentemente diagnosticada, seguida del cáncer de próstata (13%), pulmón (12%) y mama (11%). De esta forma, en términos absolutos, el CCR representa en España la segunda causa de cáncer en hombres (por detrás del cáncer de próstata) y en mujeres (por detrás del cáncer de mama)<sup>1</sup>.

El principal factor de riesgo para el desarrollo del CCR es la edad. Se trata de un factor de riesgo no modificable que muestra cómo el 90% de los casos aparecen en personas mayores de 50 años, habitualmente sin antecedentes de riesgo. Otros factores sí modificables que han demostrado asociación con el CCR son la obesidad, el tabaquismo, el consumo de alcohol, el sedentarismo y factores dietéticos<sup>9</sup>.

La mayoría de los CCR aparecen de forma esporádica, sin embargo, la historia familiar va a estar presente hasta en un 30% de los casos<sup>9</sup>. En este contexto, se diferencian dos etiologías principales del CCR: Esporádico o Germinal. El CCR esporádico representa aproximadamente el 85% de casos y puede tener lugar por una mutación aislada de genes supresores tumorales o bien por una sobreexpresión de oncogenes, siendo el factor más importante implicado la edad. Por otro lado, el germinal abarca aproximadamente el 15% restante que, en contraposición, suele manifestarse en grupos de edad más jóvenes. Dentro de este, a su vez, se diferencian dos subgrupos: en los que no se detectan mutaciones en los genes reparadores de ADN o Mismatch Repair (MMR), es decir, tumores con Estabilidad de Microsatélites (MSS), lo cual representa aproximadamente un 12% de este grupo; y en los que sí se detectan mutaciones, es decir, tumores con Inestabilidad de Microsatélites (IMS), en torno al 5%, siendo este subgrupo especialmente relevante por su patrón de herencia familiar<sup>10</sup>.

La función del sistema de genes reparadores (MMR) consiste en corregir los errores que se producen durante la replicación del ADN. De esta forma, el sistema MMR está compuesto por 4 genes: MLH1 (MutL homolog 1) localizado en cromosoma 3p22.2; MSH2 (mutS homolog 2) localizado en 2p21-16; MSH6 (MutS homolog 6) localizado en el cromosoma 2p 16.3 y PMS2 localizado en 7 p22.1. A partir de cada uno de estos genes se codifica una proteína, así cuando alguno de estos presenta una mutación, dicha proteína no funciona correctamente y puede dejar algunos errores replicativos sin corregir. De esta forma, la acumulación de errores, que se irán incrementando tras sucesivas divisiones celulares, pueden dar lugar a un cáncer<sup>2</sup>. Tal y como se ha demostrado, algunos de los MMR comparten promotor y por tanto, esto da lugar a dos complejos proteicos: MLH-1/PMS-2 y, por otro lado, MSH-2/MSH-6<sup>10</sup>, de forma que si se produce la mutación de un gen se afectará todo el complejo. Además, todas las proteínas codificadas por estos genes son detectables en la práctica clínica y se emplean como marcadores en la investigación etiológica de diversas neoplasias.

Por este motivo, el subgrupo de tumores con IMS (5% del total de CCR) justifica su importancia a la vez que se define el Síndrome de Lynch (SdL). También denominado como Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP), el SdL es el CCR hereditario más frecuente, abarca un 3-4%<sup>11</sup> de todos los CCR representando por tanto un porcentaje significativo dentro de esta neoplasia maligna tan prevalente. Su mecanismo de aparición se basa en una mutación de la línea germinal de los MMR que más frecuentemente afecta a MLH-1 o, en menor medida, de MSH-2, siendo infrecuentes PMS-2 y MSH-6. Además, esta mutación presenta un patrón de herencia familiar autosómico dominante con lo cual esto hace que la mutación se pueda transmitir a la descendencia con una probabilidad del 50%. Así los pacientes afectados pueden desarrollar a una edad más temprana diferentes neoplasias entre las que no solo se encuentra el CCR (el más frecuente), sino también hay riesgo elevado de padecer, sobre todo, carcinoma endometrial (39% a los 70 años)<sup>15</sup>. También existe riesgo, de entre 3-25 veces sobre la población general, de padecer cáncer de estómago, ovárico, tracto urinario, intestino delgado, hepatobiliar y cerebral, así como otras manifestaciones cutáneas como las manchas café con leche y queratoacantomas. Por otro lado, del fenotipo del síndrome de Lynch es característico también que el CCR aparezca en el colon derecho, así como la escasa diferenciación tumoral del mismo con características histológicas menos frecuentes como la de células en anillo de sello o un

patrón de crecimiento medular o mucinoso, abundantes linfocitos infiltrantes en el tumor y la presencia de CCR sincrónicos y metacrónicos (esto último con una probabilidad del 16% a los 10 años y 41% a los 20 años)<sup>12</sup>.

Clásicamente, el diagnóstico de este síndrome estaba basado en la identificación clínica de una serie de criterios<sup>3,4</sup>. Estos son:

- **Amsterdam I**, desarrollados en 1990 por *The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)*: (1) Tres o más familiares con CCR diagnosticado, uno de los cuales es un pariente de primer grado de los otros dos (se debe excluir la PAF); (2) CCR en al menos 2 generaciones; 3) Uno o más casos de CCR diagnosticados antes de los 50 años.
- Tras 9 años, en 1999, con las nuevas asociaciones en el campo de las neoplasias asociadas al CCHNP y con el objetivo de aumentar la sensibilidad de los criterios anteriores, se establecieron los **Amsterdam II**, siendo solo modificado el primer criterio: (1) Tres o más familiares con cánceres confirmados asociados a HNPCC (CCR, endometrio, intestino delgado, uréter, o pelvis renal), uno de los cuales debe ser familiar en primer grado de los otros dos; debe excluirse FAP. (2) CCR en al menos 2 generaciones; 3) Uno o más casos de CCR diagnosticados antes de los 50 años. El problema de esta estrategia es que seguía siendo poco sensible aunque sí muy específica (Sensibilidad: 22%, Especificidad 98%)<sup>3</sup>.
- En 1996 aparecieron también los criterios de Bethesda que más adelante, en 2004 fueron revisados con el objetivo de aumentar el rendimiento diagnóstico apoyándose también en los criterios de Amsterdam II. Así los criterios **Bethesda Revisados** son: (1) Cáncer colorectal diagnosticado antes de los 50 años de edad; (2) Tumores colorectales sincrónicos o metacrónicos u otros relacionados a HNPCC (estómago, vejiga, uréter, pelvis renal, tracto biliar, cerebro (glioblastoma), adenomas de glándulas sebáceas, queratoacantomas y carcinoma de

intestino delgado), sin considerar la edad; (3) CCR con células en anillo de sello, diferenciación mucinosa, patrón de crecimiento medular o infiltración linfocitaria en paciente < 60 años; (4) CCR con uno o más familiares de primera generación con cáncer colorectal u otros tumores relacionados con HNPCC. Uno de los cánceres puede ser diagnosticado antes de los 50 años; (5) CCR en dos o más familiares con cáncer colorectal u otros tumores relacionados con HNPCC, sin considerar la edad. Así, esta estrategia tiene una sensibilidad y especificidad del 82 y 77% respectivamente<sup>3</sup>.

Sin embargo, ante la constante revisión y modificación de los criterios clínicos, estudios actuales apuntan a que ninguno de ellos presenta, ni por sí solos ni en su conjunto, la sensibilidad y especificidad suficientes como para llegar a un diagnóstico certero de Síndrome de Lynch sin requerir más investigaciones<sup>12</sup>.

Actualmente, el mayor conocimiento sobre la etiología molecular del síndrome y las nuevas técnicas de diagnóstico actuales ha hecho posible grandes avances en la identificación del mismo<sup>5,6</sup>. De esta forma se han desarrollado estrategias de detección de deficiencias en el sistema reparador de ADN basadas en el estudio de la pieza tumoral mediante dos técnicas:

- La **Inmunohistoquímica (IHQ)** consiste en el análisis de la expresión de la proteína MMR mediante una reacción enzimática que se activa cuando unos anticuerpos específicos se unen a un antígeno en una muestra de tejido orgánico concreta, de esa manera, el antígeno, que generalmente es una proteína, se puede observar al microscopio. La prueba cuenta con una buena sensibilidad (> 90%) y una excelente especificidad (100%)<sup>10</sup>. Esto, en la pieza tumoral del CCR permite identificar la expresión o no de los complejos proteicos de los MMR por lo que permite sospechar el gen implicado y dirigir el estudio genético, actuando así como primer escalón en la identificación de un posible caso de CCR hereditario.
- La **Inestabilidad de microsatélites (IMS)**. Durante el ciclo de replicación normal del ADN de una célula se acumulan una serie de



errores replicativos: los microsatélites. Se trata secuencias cortas de nucleótidos repetidas en tándem en todo el genoma<sup>10</sup>. En condiciones normales, el adecuado funcionamiento del sistema MMR permite que el número de estas repeticiones sea similar tras cada replicación. Sin embargo, en el SdL, dada la mutación de la línea germinal de los MMR hace que tras cada ciclo replicativo se acumulen más repeticiones, dando lugar así a diferencias en el número de estas entre las células tumorales. Esto último es lo que se denomina IMS y, en la práctica clínica, esta situación puede ser detectada gracias al desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que utiliza los microsatélites como marcadores de inestabilidad tumoral. Así, tras la realización de la PCR en la pieza tumoral, puede ocurrir que<sup>10</sup>:

- No se detecte IMS y por tanto que haya un número estable de microsatélites. Será entonces un tumor estable (**MSS**).
- Se detecte aumento del número de repeticiones entre las células tumorales, siendo por tanto un tumor inestable (**IMS**). Dentro de este grupo, a su vez puede ser:
  - IMS de alta frecuencia (**MSI-H**): si dos o más de los cinco marcadores de microsatélites muestran inestabilidad.
  - IMS de baja frecuencia (**MSI-L**): si solo uno de los cinco marcadores muestra inestabilidad.

El estudio genético para diagnóstico de síndrome de Lynch resulta caro. Por este motivo, las guías actuales<sup>4</sup> recomiendan una evaluación escalonada, comenzando con estudio de inmunohistoquímica o inestabilidad de microsatélites en la pieza tumoral<sup>5,6</sup> de todos los pacientes con diagnóstico de CCR, y si alguna de estas técnicas resulta patológica, se debe realizar un estudio genético dirigido.

## Hipótesis y objetivos

Detectar la afectación de la línea germinal es fundamental, si bien de ello depende, entre otras cosas, el pronóstico familiar. Actualmente existen diversos protocolos que integran distintas maneras de proceder ante la sospecha de CCR germinal.

Hasta 2016, en nuestro centro se realizaba estudio de la pieza tumoral o genético basado en la historia familiar (criterios de Amsterdam o criterios de Bethesda). Desde 2016, y de acuerdo con las últimas recomendaciones de las Sociedades Científicas<sup>4,5,6,10</sup>, se empieza a realizar la técnica Inmunohistoquímica (IHQ) de MMR en todos los CCR que recibe el Servicio de Anatomía Patológica.

Este estudio se propone realizar una evaluación de la rentabilidad diagnóstica del Cribado Universal de los genes MMR mediante IHQ, en el Hospital Universitario de Canarias. Asimismo, se determinará si la implantación de esta técnica ha permitido la detección de nuevas familias con SdL y si esto aumenta la sensibilidad con respecto a otras estrategias basadas en criterios clínicos tradicionales expuestos anteriormente: Amsterdam y Bethesda. También se analizarán factores demográficos y descriptivos (edad al diagnóstico, localización, estadio tumoral...) de los CCR diagnosticados en este período.

Así, centrándonos en el abordaje del CCR que (*Figura 1*), en el Cribado Universal con IHQ, muestra déficit de expresión de alguno de los genes MMR, teniendo en cuenta que MLH-1 es el más frecuente. En este sentido, en la mayoría de casos lo que se encuentra es una “hipermetilación” de MLH-1, formando parte entonces del 85% de casos de CCR esporádico. En esta última situación, lo que sucede es que se genera una disfunción de este gen y de su proteína resultante dando lugar a la aparición de CCR pero que no asocia herencia familiar. Otro aspecto relevante en estos casos es detectar si asocia o no una mutación somática del oncogén BRAF (V600E) lo cual acontece en un 50% de casos<sup>10</sup>. Tanto la mutación de BRAF como la hipermetilación de MLH-1 confirma que estamos ante un caso de CCR esporádico y evita la necesidad de realizar más estudios. En contraposición con todo esto, se encuentra lo que sucede en el subgrupo de tumores en los que se detecta déficit de expresión de alguna proteína MMR

mediante IHQ, lo cual puede ocurrir por una mutación en la línea germinal de estos genes. Esto supone un déficit total de la expresión proteica y, por tanto, de la función de todo el complejo afecto, siendo en esta situación en la que sí son necesarios más estudios por lo que se remite al paciente a Consejo Genético. Lo siguiente es la realización de una amplificación de su genoma utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la cual permite identificar si el déficit de expresión del complejo MMR se debe a la presencia de una mutación en la línea germinal o no. En el primer caso estaremos hablando entonces del SdL; y en el segundo de una situación particular de origen no claro conocida como “Lynch Like”.

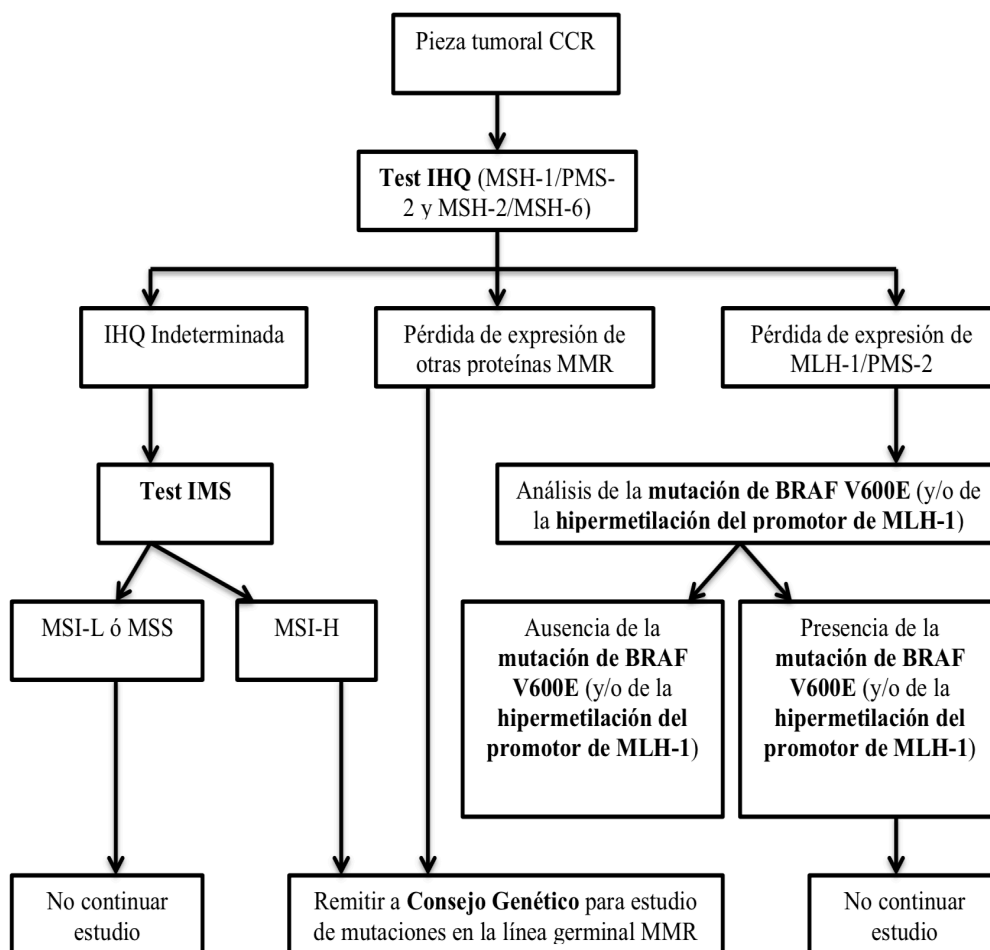


Figura 1: Algoritmo para la evaluación sistemática del síndrome de Lynch en pacientes con cáncer colorrectal.

CCR, cáncer colorrectal; IHQ, inmunohistoquímica. Adaptado de: <sup>(10)</sup> Kawakami H, Zaanani A, Sinicrope FA. Pruebas de inestabilidad de microsatélite y su papel en el tratamiento del cáncer colorrectal. *Opciones de tratamiento de Curr Oncol*. 2015; 16 (7): 30. doi: 10.1007 / s11864-015-0348-2.

## Material y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se incluyen un total de 337 pacientes diagnosticados en el Hospital Universitario de Canarias de CCR entre Septiembre 2016 - septiembre 2018. El criterio principal de inclusión fue que en todos ellos se realizara el Protocolo de Inmunohistoquímica (IHQ) Universal de la pieza tumoral de CCR para analizar si hay pérdida de expresión de alguno de los complejos MMR. Por tanto, se excluyeron aquellos casos con sospecha diagnóstica e IHQ realizada (con pérdida de expresión o no) que se dieran en ese mismo periodo de tiempo pero en otras piezas tumorales relacionadas con CCHNP (Endometrio, Estómago y Metástasis hepáticas de CCR) o que fueran solicitados directamente por otros servicios (Ginecología, Digestivo y Oncología,) y no por Protocolo Universal.

Se clasificó además a los sujetos atendiendo a variables demográficas, referentes a los antecedentes personales del diagnóstico del CCR del paciente, a los antecedentes familiares, a los criterios clínicos, al diagnóstico molecular y al desenlace del paciente, dando lugar a un total de 22 variables (*Tabla 1*):

Características	Variables
<b>Demográficas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sexo.</li> <li>• Año de nacimiento.</li> </ul>
<b>Antecedentes personales en el paciente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad al diagnóstico del CCR.</li> <li>• Tipo diagnóstico del CCR (síntomas/cribado).</li> <li>• Fecha diagnóstico CCR.</li> <li>• Localización CCR (colon derecho, izquierdo o recto).</li> <li>• Estadio tumoral CCR según TNM.</li> <li>• Otras neoplasias: asociadas al CCHNP y/o no asociadas.</li> </ul>
<b>Antecedentes familiares</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• N° familiares afectados de 1er y/o 2º grado</li> <li>• Edad del caso índice más joven de</li> </ul>

	1er y 2º grado. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cáncer extradigestivo asociado a CCHNP.</li> </ul>
<b>Criterios Clínicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amsterdam II</li> <li>• Bethesda revisados.</li> </ul>
<b>Diagnóstico Molecular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmunohistoquímica</li> <li>• Estudio genético (si/no)</li> <li>• Resultado estudio genético</li> </ul>
<b>Desenlace paciente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exitus (si/no).</li> <li>• Supervivencia en meses.</li> </ul>

Tabla 1: variables del estudio.

Los resultados de las variables cualitativas se expresan con frecuencias y porcentajes. Las variables cuantitativas con medias y desviaciones estándar. Las comparaciones de proporciones se llevaron a cabo con la prueba de Chi Cuadrado o Exacta de Fisher, según procediera. Se consideraron significativos los valores de probabilidad menores a 0,05. Se usó el paquete estadístico SPSS para los análisis (Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp).

## Resultados

La muestra del estudio (N) se compone de 337 pacientes diagnosticados y tratados quirúrgicamente de CCR entre Septiembre de 2016 y Septiembre de 2018 en el Complejo Hospitalario Universitario de Canarias (CHUC). La pieza tumoral de todos ellos, tras ser debidamente conservada y procesada en el Servicio de Anatomía Patológica, había sido analizada mediante Inmunohistoquímica (IHQ) Universal para los genes MisMatch-Repair (MMR) de acuerdo al protocolo que recomiendan las guías clínicas actuales.

En la descripción de la muestra, tal y como se resume en la *Tabla 2*, se observaron los siguientes datos:

- La edad media de diagnóstico del CCR fue de 68,12 años, siendo la mediana de 70,00 años, con una desviación típica de 11,805. La edad mínima fueron 30 años y la máxima 93 años. La distribución por género resultó tal que de los 337 pacientes, eran hombres 218 (64,7%) y mujeres 119 (35,3%).
- El diagnóstico en 283 de los casos (84%) tuvo lugar tras una serie de manifestaciones sintomatológicas, y en 54 casos (16%) se llegó al mismo mediante las recomendaciones de cribado actuales para el CCR. Así mismo, la frecuencia del lugar de aparición del CCR resultó que en el colon derecho aparecieron 114 casos (33,8%), en el colon izquierdo-sigma 141 casos (41,8%) y en el recto 82 casos (24,3%). A su vez, el estadio tumoral al diagnóstico, de acuerdo a la clasificación TNM, se distribuyó de la siguiente forma: 91 casos en el estadio I (27%), 81 casos en IIa (24%), 11 casos en IIb (3,3%), 3 casos en IIc (0,9%), 12 casos en IIIa (3,6%), 82 casos en IIIb (24,3%), 13 casos en IIIc (3,9%), 31 casos en IVa (9,2%) y 13 casos en IVb (3,9%).
- Se estudió si se desarrollaron otras neoplasias extradigestivas de la esfera del CCHNP en el propio paciente con CCR, apareciendo alguna de estas en 14 casos (4,2%), los restantes 323 (95,8%) no presentaron ninguna. Así como otras neoplasias extradigestivas no pertenecientes a la esfera del CCHNP se observaron en 36 casos (10,7%), no apareciendo en los 301 casos restantes (89,3%).
- En cuanto a los antecedentes familiares, se analizó si cada paciente a estudio tenía familiares de primer y segundo grado afectados con CCR. De los 337 pacientes recogidos, 295 (87,5%) no tenían ningún familiar de primer grado afecto, pero 42 (12,5%) sí los tenían; a su vez, de este último grupo 35 (10,4%) sólo tenían 1 familiar de primer grado afectado y 7 (2,1%) tenían dos. Por otro lado, 321 (95,3%) pacientes no tenían familiares de segundo grado afectados, siendo 16 (4,7%) los que sí los tenían, de los cuales 14 (4,2%) tenían 1 único familiar de segundo grado afecto y 2 (0,6%) tenían dos. Por otro lado, en lo que respecta a la edad de los familiares de primer y segundo grado del caso índice, se obtuvo que la media de edad fue de 61,16 años con una desviación típica de 10,451 y de 66,33 con una desviación típica de 13,11, respectivamente. Se

analizó también si alguno de los familiares habían tenido alguna neoplasia asociada a la esfera CCHNP y se encontraron 46 (13,6%) casos que sí habían tenido, por los 291 (83,4%) que no.

- De los pacientes incluidos en el estudio, habían fallecido 40 (11,9%) y sobrevivido 297 (88,1%).
- Se estudió también en cada uno de los pacientes que conforman la muestra del estudio si cumplían o no los criterios clínicos clásicos empleados en el abordaje de los casos en los que se sospeche CCHNP. Así pues, en cuanto a los criterios de Amsterdam fueron 335 (99,4%) los pacientes que no cumplían dichos criterios siendo únicamente 2 (0,6%) los que sí los cumplieron. Los criterios de Bethesda los cumplían 91 pacientes (27%) al contrario que los 246 (73%) restantes que no los cumplieron.

Variables	Resultado
<b>Demográficas:</b>	
• <b>Sexo: n(%)</b>	
○ Varón:	218 (64,7%)
○ Mujer:	119 (35,3%)
<b>Antecedentes personales en el paciente:</b>	
• <b>Edad al diagnóstico del CCR: (media ± DE).</b>	68,12 años ± 11,805
• <b>Tipo diagnóstico del CCR: n(%)</b>	
○ Síntomas	283 (84%)
○ Cribado	54 (16%)
• <b>Localización CCR: n(%)</b>	
○ Colon derecho	114 (33,8%)
○ Colon Izquierdo	141 (41,8%)
○ Recto	82 (24,3%)
• <b>Estadio tumoral CCR (TNM): n(%)</b>	
○ I	91 (27%)
○ IIa	81 (24%)

○ IIb	11 (3,3%)
○ IIc	3 (0,9%)
○ IIIa	12 (3,6%)
○ IIIb	82 (24,3%)
○ IIIc	13 (3,9%)
○ IVa	31 (9,2%)
○ IVb	13 (3,9%)
• <b>Neoplasias asociadas al CCHNP:</b>	
<b>n(%)</b>	
○ Si	14 (4,2%)
○ No	323 (95,8%)
• <b>Neoplasias no asociadas al CCHNP:</b>	
<b>n(%)</b>	
○ Si	36 (10,7%)
○ No	301 (89,3%)
<b>Antecedentes familiares:</b>	
• <b>Familiares afectos de 1º grado: n(%)</b>	
○ 0 familiares	295 (87,5%)
○ 1 familiar	35 (10,4%)
○ 2 familiares	7 (2,1 %)
• <b>Familiares afectos de 2º grado: n(%)</b>	
○ 0 familiares	321 (95,3%)
○ 1 familiar	14 (4,2%)
○ 2 familiares	2 (0,6%)
• <b>Edad del caso índice más joven de 1º grado: (media ± DE).</b>	61,16±10,451
• <b>Edad del caso índice más joven de 2º grado: (media ± DE).</b>	66,33±13,11
• <b>Cáncer extradigestivo asociado a CCHNP: n(%).</b>	
○ Si	46 (13,6%)
○ No	291 (83,4%)



<b>Desenlace paciente:</b>	
• <b>Exitus: n(%).</b>	
○ Si	40 (11,9%)
○ No	297 (88,1)
<b>Criterios clínicos:</b>	
• <b>Amsterdam II: n(%).</b>	
○ Si	2 (0,6%)
○ No	335 (99,4%)
• <b>Bethesda revisados: n(%).</b>	
○ Si	91 (27%)
○ No	246 (73%)

Tabla 2: Descripción de la muestra.

Evaluar el resultado de la inmunohistoquímica (IHQ) de la pieza tumoral y del posterior Estudio Genético fue también objeto del análisis, tal y como se resume en la *Figura 2*. Se obtuvo que de los 337 pacientes intervenidos de CCR incluidos en la muestra, 298 tenían el resultado de la IHQ en el momento del análisis, siendo este grupo los incluidos en el mismo (100%) y, por tanto, siendo 39 pacientes las pérdidas del estudio. De los 298 pacientes con IHQ realizada, en 281 (94,3%) resultó ser normal, es decir, no se encontró déficit de expresión de ninguno de los complejos MMR; no obstante, en 17 de ellos (5,7%) sí se obtuvo déficit de expresión. Desglosando este último subgrupo en función del complejo deficitario, se obtuvo que: en 3 pacientes (1%) se encontró déficit del complejo MSH-2/MSH-6, y en 14 pacientes (4,7%) déficit del complejo MLH-1/PMS-2. Tal y como aconsejan las guías actuales, en las situaciones en las que la IHQ detecte déficit de expresión de MLH-1 hay que hacer una determinación de la mutación más frecuente del gen BRAF (V600E) de manera que, si este aparece mutado, no es necesario enviar al paciente a la Unidad de Consejo Genético si bien no se considera esta situación una inestabilidad de microsatélites. En este sentido, en el estudio se obtuvo que, de los 14 pacientes con déficit de expresión del complejo MLH-1/PMS-2, en 5 de ellos (1,7%) se encontró la mutación V600E del gen BRAF, quedando estos, por tanto, excluidos de la realización del estudio genético; y en los 9 restantes (3%) no se encontró dicha mutación.

Por tanto, de la muestra inicial de 298 pacientes, en 286 (96%) no hubo inestabilidad de microsatélites en la IHQ (incluidos en este grupo los que presentaron la mutación en BRAF) y fueron 12 pacientes (4%) los que sí tuvieron déficit de expresión de algún complejo MMR. Este último grupo de pacientes es el que, en consonancia con el protocolo de manejo actual, se derivó a la Unidad de Consejo Genético para determinar si existía mutación de la línea germinal de algún gen reparador de ADN o no. Se obtuvo que, de los 12 pacientes, 7 (3,9%) se habían realizado el estudio genético en el momento del análisis y, por tanto, 5 de ellos, aún sin el resultado, fueron excluidos del mismo (1,5%). Considerando a los 7 pacientes que tenían el resultado del estudio como el 100% se encontró que este fue positivo, es decir, se encontró alguna mutación en 4 de ellos (57,1%) y, por tanto, se confirmó el diagnóstico de Síndrome de Lynch; y negativo en 3 (42,9%), siendo este subgrupo enmarcado dentro del Síndrome Lynch Like. Las mutaciones identificadas en los 4 pacientes fueron en el gen MSH-2 en 3 de ellos (42,9%) y en MLH-1 en 1 de ellos (14,3%).

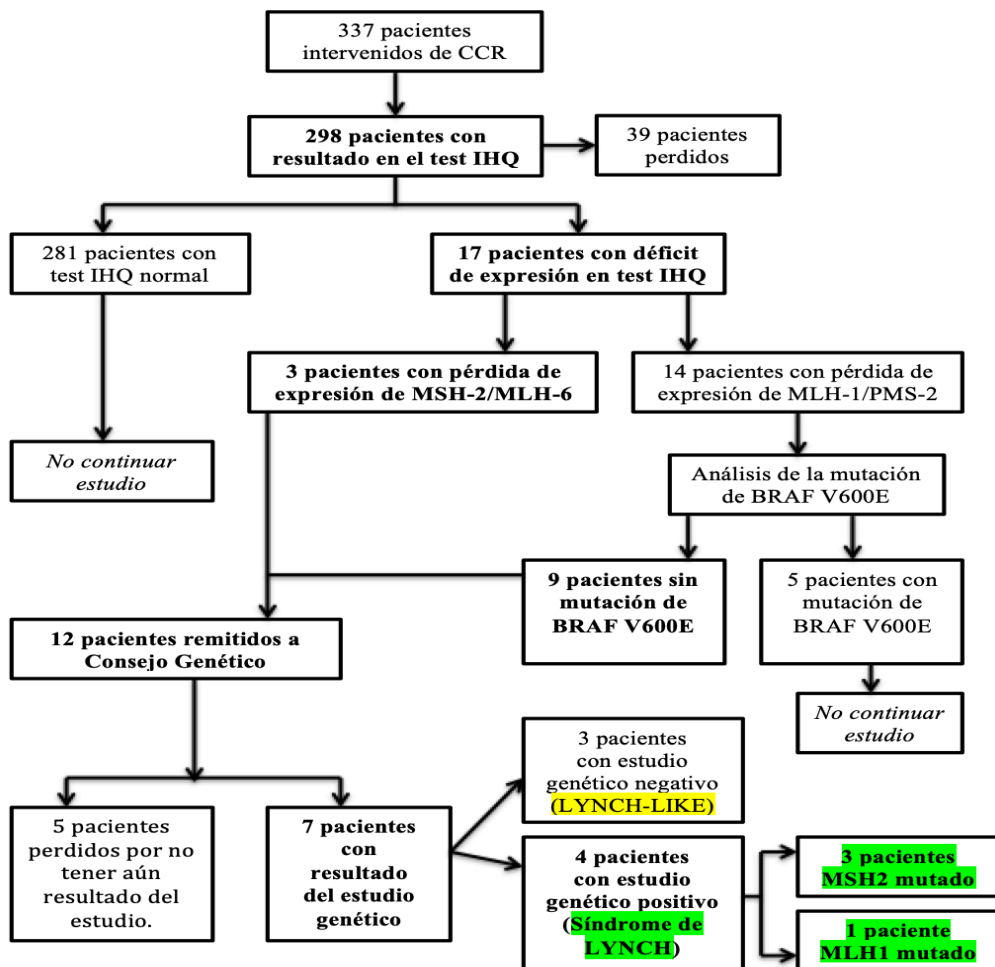


Figura 2: Resumen del procedimiento de evaluación de los resultados de la muestra. CCR, cáncer colorrectal; IHQ, inmunohistoquímica.

Finalmente, el análisis concluyó comparando los resultados obtenidos en la Inmunohistoquímica y en el Estudio genético con los pacientes que cumplían criterios clínicos de Bethesda Revisados y de Amsterdam II, respectivamente. De tal forma que se encontró que de los 12 pacientes que tenían déficit de expresión de alguno de los complejos MMR en la IHQ, 7 de ellos cumplían criterios de Bethesda (58,3%) y 4 no los cumplían (41,7%). Por otro lado, de los pacientes que tuvieron un resultado positivo en el Estudio Genético, es decir, 4 casos, ninguno de ellos (100%) cumplían criterios de Amsterdam II.

## Discusión

Este estudio presenta los resultados de una muestra de 337 pacientes diagnosticados y tratados quirúrgicamente de CCR entre Septiembre de 2016 y Septiembre de 2018 en el Complejo Hospitalario Universitario de Canarias (CHUC). La pieza quirúrgica de todos ellos fue analizada siguiendo el Protocolo de Inmunohistoquímica (IHQ) Universal de los genes MMR de acuerdo a las recomendaciones actuales de las Sociedades Científicas<sup>4,5,6,10</sup>.

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestra muestra, se observa cómo el CCR se muestra mayoritariamente en un rango de edad superior a los 50 años, concretamente, la mediana de edad al diagnóstico fueron los 70 años, de tal forma que se sostiene que la edad avanzada es el factor de riesgo más importante implicado<sup>9</sup>. Además, de acuerdo con datos publicados en la literatura (ref: Cubiella et al, Gastroenterol Hepatol 2018; 41(9):585-596), se observó mayor prevalencia en hombres (64,7%) que en mujeres (35,3%).

Es importante destacar que, a pesar de los avances en la detección precoz de esta neoplasia, sólo un 16% de los CCR en ese periodo fueron diagnosticados por indicación de cribado, mientras que la gran mayoría (84%) tuvo su diagnóstico debido a las manifestaciones clínicas del CCR. A pesar de este hecho, se observó que en más de la mitad de los casos de la muestra al diagnóstico presentaron un estadio precoz (I: 27%, IIa: 24%), lo cual hace pensar en la pronta manifestación sintomatológica del CCR, hecho que beneficia en gran medida al pronóstico individual. Además, resultó que la localización más frecuente del tumor fue el colon izquierdo-sigma, representado un

41,8% de los casos del total de casos pero, si atendemos a la proporción de pacientes con diagnóstico confirmado de Síndrome de Lynch (SdL) de la muestra se obtuvo que el 50% (2 pacientes) el CCR se localizó en el recto y que, en las mutaciones detectadas, fue más frecuente la mutación en el gen MSH2 (3 pacientes) que en MLH1 (1 paciente). Estos últimos resultados, no coinciden con los datos actuales que sugieren que en el SdL el CCR se ubica con mayor frecuencia en el colon derecho y que la mutación en el gen MLH1 es más prevalente que en el gen MSH2<sup>11</sup>. Sin embargo, dada la pequeña proporción de pacientes con tal diagnóstico en la muestra no es posible extraer conclusiones.

En el estudio de Moreira L et al (ref: JAMA 2012;308(15):1555-65)<sup>3</sup>, exponen los criterios clínicos (Amsterdam II y Bethesda Revisados) por los que tradicionalmente se establecía una sospecha de CCR hereditario y a partir de la cual se decidía si se estudiaba la pieza tumoral o no. En dicho estudio, a partir de una amplia muestra poblacional, se afirma que dichos criterios carecen de la sensibilidad y especificidad necesarios para garantizar que, de todos los casos que abarca esta neoplasia tan prevalente, se seleccionen con seguridad los pacientes calificados de alto riesgo de CCR hereditario. En este sentido, al comparar esto con los resultados del Protocolo de IHQ Universal de los genes MMR encontraron diferencias significativas en cuanto al rendimiento diagnóstico del SdL claramente a favor de dicho protocolo<sup>3</sup>. Nuestro estudio se propuso analizar si las conclusiones obtenidas en los estudios precedentes<sup>3,8,10,11</sup>, como el de Moreira L et al, eran aplicables a una muestra de pacientes intervenidos de CCR en el CHUC durante el periodo de tiempo coincidente con la implantación del Protocolo de IHQ Universal de los genes MMR en dicho complejo hospitalario (Septiembre de 2016-Septiembre de 2018). El objetivo fue evaluar la rentabilidad diagnóstica de dicho protocolo frente a los criterios clínicos tradicionales y analizar los datos de los CCR diagnosticados e intervenidos en área de referencia del CHUC.

En relación a lo anterior, nuestro estudio obtuvo que, de los 298 pacientes de los que se tenía el resultado del test de IHQ Universal en el momento del análisis, eran 286 (96%) en los que no se detectó inestabilidad de microsatélites (IMS) en la IHQ pero hubo 12 pacientes (4%) en los que sí se detectó, lo cual permitió derivarlos a la realización del Estudio Genético. Destacó que, de estos 12 pacientes fueron 7 de ellos

los que sí cumplían criterios de Bethesda (58,3%), pero sin embargo, 4 pacientes no los cumplían (41,7%). De esto se puede deducir que, si no se hubiera implantado el Protocolo Universal y la selección de pacientes de alto riesgo de CCR hereditario (que debieran someterse al test de IHQ como paso previo al Estudio Genético) hubiese estado determinada por los criterios clínicos de Bethesda Revisados, un porcentaje de pacientes se hubieran perdido, no habiendo podido conocerse si padecían o no SdL. Esto supone una situación de riesgo pues tiene importantes implicaciones en el seguimiento del paciente y en el cribado de sus familiares. Algo similar pero de forma más llamativa se obtuvo al comparar los criterios de Amsterdam II con el resultado del Estudio Genético, si bien de los 4 casos que resultaron positivos en dicho estudio, es decir, en los que se encontró una mutación en la línea germinal de los genes MMR y por tanto se diagnosticaron de SdL, ninguno de ellos, o lo que es lo mismo, el 100% no cumplían criterios de Amsterdam II. Por tanto, puede afirmarse que en nuestra muestra estos últimos criterios no hubieran sido útiles para seleccionar con la adecuada sensibilidad y especificidad a los pacientes que debieran realizarse el Estudio Genético. Por otro lado, incidiendo en los pacientes con Estudio Genético realizado, se detectase mutación o no, es decir, 7 pacientes, es de destacar que, si se hubiesen aplicado los criterios de Bethesda para seleccionarlos, también hubieran habido pérdidas, y es que, a pesar de que de estos 7 casos 5 de ellos sí los cumplían (los 4 pacientes con diagnóstico de SdL y 1 paciente con Síndrome de Lynch-Like), hubo 2 pacientes que no. Estos últimos resultaron no tener mutación en la línea germinal y por tanto, se diagnosticaron de Síndrome de Lynch-Like en los que, de no haberse realizado el Protocolo Universal, no se hubiesen podido diagnosticar con la implicación que ello supone, si bien aunque aún no se ha podido clarificar el origen de este síndrome, sí se conoce que estos pacientes tienen un riesgo elevado de padecer CCR y, por tanto, requieren un seguimiento específico<sup>3</sup>.

Las principales limitaciones del estudio están en relación al tamaño muestral, esto es, la pequeña proporción de pacientes con diagnóstico de SdL. Sin embargo, cabe destacar que, hasta nuestro conocimiento, es el primer estudio realizado en nuestra Comunidad Autónoma dirigido a evaluar la utilidad de la estrategia universal de IHQ para el diagnóstico de identificación de pacientes con alto riesgo de CCR: Síndrome de Lynch y Síndrome de Lynch-Like. Además, los resultados obtenidos van en la línea de lo propuesto por los estudios precedentes<sup>3,8,10,11</sup>.

Por todo esto, y de acuerdo con la evidencia actual, estos resultados apoyan la utilidad y la realización de la IHQ en todos los CCR diagnosticados en nuestro medio. De tal forma que podemos concluir afirmando que los criterios clínicos de Amsterdam II no son útiles para la selección de pacientes de alto riesgo de presentar CCR hereditario, así como los criterios de Bethesda Revisados que, a pesar de que sí logran seleccionar a un mayor número de pacientes de riesgo (de hecho los 4 pacientes de nuestro estudio diagnosticados de SdL cumplían dichos criterios) lo cierto es que no consiguen la sensibilidad y especificidad necesarias como para ser la técnica de elección en el abordaje diagnóstico inicial de pacientes con sospecha alteración en la línea germinal de los MMR (2 pacientes con Síndrome Lynch-Like no los cumplían). Por otro lado, hemos podido corroborar que el Protocolo de IHQ Universal de los genes MMR sí logró seleccionar tanto a los 4 pacientes que finalmente se diagnosticaron de SdL como a los 3 pacientes con diagnóstico final de Síndrome Lynch-Like, mostrando en definitiva su superior rentabilidad diagnóstica frente a los criterios clínicos y justificando, por tanto, su acertada incorporación al protocolo diagnóstico habitual empleado en este tipo de pacientes en el CHUC.

No obstante, dado el carácter novedoso a nivel regional de nuestro estudio y las limitaciones antes mencionadas, es fundamental continuar con la investigación evaluando dicho protocolo de cara a poder reafirmar las conclusiones obtenidas hasta ahora y/o determinar otras nuevas mediante su evaluación continua en los centros hospitalarios en los que esté presente. Para aumentar el tamaño muestral, sería muy interesante el incorporar los CCR diagnosticados en el resto de grandes hospitales de la Comunidad Canaria que disponen de esta técnica para conocer la influencia de la incorporación de la estrategia de IHQ universal en nuestro medio. Además, y aunque no ha sido el objetivo de este trabajo, en los últimos años se ha demostrado la utilidad de esta técnica para tomar decisiones terapéuticas en cuanto a la quimioterapia a plantear en los pacientes con tumores con pérdida de expresión de los genes reparadores de ADN y las implicaciones pronósticas<sup>10,12</sup>, lo cual apoya aún más la implantación de la estrategia.

## Conclusiones

- Se encontraron características epidemiológicas y clínicas referidas al CCR de los pacientes del estudio en relación con las expuestas en los estudios actuales.
- Los criterios clínicos de Amsterdam II se muestran insuficientes para seleccionar a los pacientes de alto riesgo de CCR hereditario.
- Los criterios clínicos de Bethesda Revisados lograron un mayor rendimiento a la hora de seleccionar pacientes de riesgo de CCR hereditario, en concreto al seleccionar pacientes en los que posteriormente se estableció el diagnóstico de SdL; pero no mostraron igual fiabilidad en la aproximación al Síndrome de Lynch-Like, una condición con gran implicación en el pronóstico del paciente.
- El Protocolo de Inmunohistoquímica Universal se mostró como la técnica de mayor rentabilidad diagnóstica para seleccionar a los pacientes de riesgo de CCR hereditario. Permitió detectar el 100% de los casos con CCR cuyo déficit de expresión de algún complejo MisMatch Repair (MMR) en la IHQ resultó ser por una alteración en la línea germinal, tanto los casos de Síndrome de Lynch como los de Síndrome de Lynch-Like.

## ¿Qué he aprendido?

No se concibe la ciencia sin investigación, de igual manera que no se entiende la medicina sin la figura del médico. Entonces, la medicina como ciencia, ¿va unida con la investigación?, la respuesta es un rotundo sí, aunque la unión médico-investigación es más laxa. Pero lo cierto es que si no se investiga, no se descubre, y si no se descubre no se avanza. En los últimos siglos hemos pasado de conocimientos y técnicas que hoy vemos como rudimentarias, a nuevas formas de proceder antes inimaginables. Hay un factor común en toda esta evolución y no es otra que la propia investigación. Por tanto, el objetivo debe ser reforzar esa unión entre el médico y la investigación, para ello, el Trabajo de Fin de Grado, en el ámbito del Grado en Medicina, supone una toma de contacto importante de cara a tal fin. No es una labor sencilla, de hecho requiere mucha

dedicación medida en horas de trabajo, pero sin embargo, sí ofrece mucha satisfacción personal cuando al terminar se obtienen unos resultados y unas conclusiones que logran enriquecer los conocimientos, sobre todo, de uno mismo y, además, los de toda la comunidad científica.

## Bibliografía

1. Win AK, Jenkins MA, Dowty JG, et al. Prevalence and penetrance of major genes and polygenes for colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26: 404-12
2. Koessler T, Oestergaard MZ, Song H, et al. Common variants in mismatch repair genes and risk of colorectal cancer. *Gut* 2008; 57:1097
3. Moreira L, Balaguer F, Lindor N et al; EPICOLON Consortium. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA*. 2012 Oct 17;308(15):1555-65
4. NCCN clinical practice guidelines in oncology: genetic/familial high-risk assesment: colorectal versión I.2015. Fort Washington, PA.: National Comprehensive Cancer Network, 2016.
5. Chen E, Xu X, Liu T. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and Cancer Syndromes: Recent Basic and Clinical Discoveries. *J Oncol*. 2018 Apr 23;2018
6. Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Mascort-Roca JJ, et al. Clinical practice guideline. Diagnosis and prevention of colorectal cancer. 2018 Update. *Gastroenterol Hepatol*. 2018 Nov;41(9):585-59
7. Lindor NM, Greene MH. The concide handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1039.



8. Rubenstein HL, Enns R, Heidelbaugh J et al. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Gastroenterology* 2015;149:777–78.
9. Issa IA, Noureddine M. Examen de detección de cáncer colorrectal: una revisión actualizada de las opciones disponibles. *Mundo J Gastroenterol* .2017; 23 (28): 5086–5096. doi: 10.3748 / wjg.v23.i28.5086.
10. Kawakami H, Zaanani A, Sinicrope FA. Pruebas de inestabilidad de microsatélite y su papel en el tratamiento del cáncer colorrectal. *Opciones de tratamiento de Curr Oncol* . 2015; 16 (7): 30. doi: 10.1007 / s11864-015-0348-2.
11. Balaguer F. Et al. Cáncer colorrectal familiar y hereditario. *Gastroenterol Hepatol*. 2014;37(Supl 3):77-84.
12. Caren G. Solomon, M.D., Frank A. Sinicrope, M.D. Lynch Syndrome–Associated Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2018;379:764-73. DOI: 10.1056/NEJMcp1714533.
13. Lodewijk A.A. Brosens, MD, PhD<sup>1,2</sup>, G. Johan A. Offerhaus, MD, PhD, MPH<sup>3</sup>, and Francis M Giardiello, MD<sup>4</sup>. Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. *Surg Clin North Am*. 2015 October; 95(5): 1067–1080. doi:10.1016/j.suc.2015.05.004.
14. Pedro Pérez Segura<sup>1</sup>, Carlos Fernández-Martos, Consulta Consejo Genético. S<sup>o</sup> Oncología Médica. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. S<sup>o</sup> Oncología Médica Valencia. Guía de manejo de Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico (CCHNP). Adaptado de *Gastroenterology* 2001; 121: 195-97.
15. Ruby Gupta<sup>a</sup>, Surajit Sinhab, Rabindra N. Paul<sup>c</sup>. The Impact of Microsatellite Stability Status in Colorectal Cancer. *Curr Probl Cancer* 000 (2018) 1–12.