

Curso 2006/07
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/16
I.S.B.N.: 978-84-7756-762-2

NIEVES DORIA LORENZO ROCHA

**Síndrome de Lynch en Tenerife.
Implicaciones clínicas, genéticas,
diagnósticas, profilácticas y terapéuticas**

Directores

**JULIÁN PÉREZ PALMA
VICENTE MEDINA ARANA**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	7
A.- CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO Y GENÉTICA	8
I.- CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO	9
a) Patrones de presentación	10
b) Aproximación clínica	11
c) Aspectos diagnósticos	12
II.- ASPECTOS GENÉTICOS DEL CÁNCER COLORRECTAL	13
a) Replicación del ADN	14
b) Bases genéticas	17
c) Mutaciones específicas	19
1.- Oncogenes	19
2.- Genes supresores	20
3.- Genes de reparación de los errores postreplicativos	22
4.- Genes modificadores	22
d) Genética molecular	22
B.- POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR	26
I. ASPECTOS CLÍNICOS	27
II. ASPECTOS GENÉTICOS	29
a) El gen APC	29
b) Mutaciones germinales en APC	30
c) Correlaciones genotipo-fenotipo	31
d) Mutaciones somáticas	32

C.- CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO	34
I.- Antecedentes históricos	35
II.- Evolución de la nomenclatura	36
III.- La genética del síndrome de Lynch	37
a) Genes MutS	39
b) Genes Mult.	40
IV.- Inestabilidad de los microsátélites y el cáncer de colon hereditario	42
a) MSI y CCR esporádico	49
b) MSI e IHC en lesiones precancerosas	50
V.- Descripción clínica	
a) Herencia dominante	51
b) Variedad de tumores	51
c) Edad del diagnóstico	53
d) Tumores sincrónicos y metacrónicos	54
e) Características del adenoma/carcinoma	54
f) Criterios clínicos:	55
• Criterios de Ámsterdam	56
• Criterios de Bethesda	57
g) Importancia de los criterios clínicos	59
VI.- La incidencia del síndrome de Lynch	60
a) Prevalencia por Criterios de Ámsterdam	60
b) Redefinición del Síndrome de Lynch	61
c) Incidencia según estudios poblacionales	62
d) Incidencia global del Síndrome de Lynch	65
VII.- El espectro tumoral	66

VIII.- El diagnóstico de laboratorio	70
a) El test de MSI	71
b) La inmunohistoquímica	72
c) La secuenciación del DNA	74
d) Estrategia de diagnóstico	74
IX.- El seguimiento en el síndrome de Lynch	76
a) Información a las familias	77
b) Guías clínicas para el seguimiento	
i. Para los tumores de colon	78
ii. Para los tumores ginecológicos	79
iii. Para otros tumores	80
c) Otras medidas preventivas	80
d) Guía clínica	81
e) Indicaciones para el seguimiento	82
f) Coste-efectividad	82
g) Resultados del seguimiento	82
h) Indicaciones de la cirugía	83
X.- Supervivencia del cáncer colorrectal en el Síndrome de Lynch.	88
X.- El consejo genético	88
a) Valoración del riesgo	89
b) Interpretación de los tests	90
• Interpretación de test positivo	91
• Interpretación de test negativo	91

OBJETIVOS **92**

MATERIAL Y MÉTODO **94**

<u>RESULTADOS</u>	114
<u>DISCUSIÓN</u>	121
1.- Sobre la técnica empleada	122
2.- Sobre los resultados obtenidos	130
<u>CONCLUSIONES</u>	158
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	161

INTRODUCCIÓN

A.- CCR HEREDITARIO Y GENÉTICA

La etiopatogenia del cáncer colorrectal ha suscitado siempre gran interés, primero por el papel atribuido a la dieta en su desarrollo buscando factores externos que predispusieran, como la grasa, o protegieran, como la fibra dietética, a la aparición de los tumores. Factores sobre los que se pudiera actuar, y que han arrojado datos contradictorios tanto en estudios epidemiológicos como experimentales y, en los últimos tiempos, factores genéticos, debido al desarrollo de nuevas técnicas como la epidemiología genética, con el fin de identificar individuos de alto riesgo para la aparición de los tumores que requieran estrecha vigilancia epidemiológica.

I.- CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO

La incidencia anual del cáncer colorrectal en Estados Unidos es aproximadamente unos 148.300 individuos, 72.600 hombres y 75.700 mujeres, ocasionando 56.600 muertes⁸⁰. El riesgo medio de la población general de desarrollar a lo largo de su vida un CCR es de un 5-6%, mientras que individuos con historia familiar, es decir, personas que tienen dos o más parientes de primer o segundo grado con CCR, tienen un riesgo de hasta un 20% de presentar la enfermedad, lo que supone entre el 5 y el 10% del cómputo global de todos los pacientes diagnosticados^{80,109}.

El conocimiento sobre el cáncer hereditario aumentó a partir de la década de los 80 debido, fundamentalmente, a los avances en la genética molecular y al descubrimiento de una variedad importante de mutaciones en la línea germinal que predisponen al cáncer, y que constituyen la etiología de los síndromes de cáncer

hereditario. Es probable que el progreso en la genética del cáncer favorezca una mayor atención sobre la historia familiar en las consultas médicas, a fin de identificar individuos con alto riesgo de presentar cánceres de cualquier localización¹⁰⁸.

Aunque los síndromes hereditarios de cáncer colorrectal que se transmiten de una forma autosómica dominante son responsables de una pequeña proporción de tumores, su importancia clínica y biológica es considerable debido a que, dichos tumores, frecuentemente se presentan a una edad más temprana y, por tanto, contribuyen de una forma más importante a la cantidad de años perdidos de vida. Además, el despistaje, el diagnóstico precoz y la cirugía han demostrado ser eficaces en la reducción de la mortalidad en los dos síndromes hereditarios de cáncer colorrectal conocidos, la poliposis familiar adenomatosa (FAP), y el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC)⁷⁸.

a) Patrones de presentación

El cáncer colorrectal normalmente se presenta en uno de estos tres patrones: esporádico, hereditario o familiar²³. (Fig. 1)

- La **enfermedad esporádica** supone aproximadamente el 70% de los cánceres colorrectales en la población. Es común en personas mayores de 50 años de edad y entre sus factores etiopatogénicos destacan los factores medioambientales, dietéticos y el normal envejecimiento de la población
- Menos de un 10% de los pacientes tienen una **predisposición hereditaria** al cáncer colorrectal. Los síndromes hereditarios se subdividen en polipósicos, en los cuales los pólipos son un dato clínico fundamental de la enfermedad, y los no polipósicos, donde o no hay pólipos o

éstos son apenas indistinguibles de la mucosa, los denominados adenomas planos. Entre los primeros se encuentran la poliposis familiar adenomatosa y los síndromes polipoideos hamartomatosos; en los segundos destaca el Síndrome de Lynch con sus variantes I y II.

- La tercera forma de presentación, y la menos entendida, se conoce como ***cáncer colorrectal familiar***. En ella, las familias presentan el cáncer de dicha localización con demasiada frecuencia para considerarse esporádico, pero no tiene un patrón hereditario consistente. Más de un 25% de todos los casos pueden ser asignados a dicho patrón.

b) Aproximación clínica

En la opinión de Giardiello⁶¹, el paso más importante que lleva al diagnóstico de un síndrome de cáncer hereditario es una exhaustiva historia familiar mediante la confección de árboles genealógicos, que debe estar enfocada a identificar tumores en todos los sitios y de todos los tipos, la edad del familiar afecto cuando se diagnosticó el cáncer, la presencia de cánceres múltiples, cualquier asociación con características fenotípicas, tales como adenomas colónicos, y la documentación de los hallazgos patológicos siempre que sea posible. Esta información, con frecuencia, será fundamental para identificar un posible síndrome de cáncer colorrectal hereditario. Posteriormente, los tests moleculares genéticos aportarán la verificación a este diagnóstico cuando identifiquen una mutación relacionada con el síndrome en la línea germinal⁴³. Una vez se ha establecido el diagnóstico, el sujeto y sus familiares deben ser informados y sometidos, si así lo desean, al test genético

que les permita conocer si son portadores de dicha mutación para instituir medidas de vigilancia estrecha y reducir la morbimortalidad¹⁰⁷.

c) Aspectos diagnósticos

Grosso modo, existen dos clases de cánceres hereditarios colorrectales basados en la localización predominante del tumor, denominados distal y proximal. Los síndromes de cáncer de colon hereditarios más frecuentes son la **Poliposis Familiar Adenomatosa (PAF)** y el **Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (HNPCC)** o Síndrome de Lynch. La PAF y la mayoría de los casos de CCR esporádicos pueden ser considerados como paradigma de los tumores colorrectales distales, mientras que los cánceres colorrectales hereditarios no polipósicos están más presentes en la segunda clase de tumores o proximales^{102,109}.

Los síndromes con características fenotípicas, tales como los múltiples pólipos de la poliposis familiar adenomatosa, son más fáciles de diagnosticar que aquellos que no las poseen; sin embargo, el fenotipo atenuado de esta enfermedad, caracterizado por pocos adenomas colónicos y con una edad de presentación más tardía para el CCR que la forma clásica (55 vs 39 años) tiene un diagnóstico más dificultoso, a pesar de un alto índice de sospecha por la historia familiar¹⁰⁵.

En el caso del HNPCC podemos considerar cinco características que nos ayudan a identificar a las familias afectadas¹⁰⁹:

- ✓ Edad de aparición del CCR más temprana que en la población general (45 vs 63 años).

- ✓ Un patrón particular de cánceres primarios dentro de la familia, tales como cánceres colónicos y de endometrio.
- ✓ La supervivencia, que difiere de la norma para el cáncer específico¹⁹⁰.
- ✓ Características patológicas distintivas.
- ✓ La quinta característica y *sine qua non* es la identificación de la mutación en la línea germinal en los miembros afectados de la familia.

II.- ASPECTOS GENÉTICOS DEL CÁNCER COLORRECTAL

Desde el punto de vista genético, se acepta desde hace años que el cáncer colorrectal tiene un claro componente familiar³³; en este sentido, estudios poblacionales han demostrado que el riesgo de padecer esta enfermedad es, aproximadamente, dos veces mayor entre los familiares de primer grado de un paciente ya afecto de CCR^{65,92}.

Antes de 1990 el papel que los factores hereditarios tenían en la etiología del cáncer adulto era poco entendido y despertaba escaso interés entre los médicos, con la única excepción de la poliposis familiar adenomatosa. Desde hace dos décadas, este interés se ha incrementado de una forma notoria. Como ejemplo, decir que en las *West Midlands*, las referencias a cánceres familiares en 1991 constituían menos de 1% de todas las referencias genéticas clínicas, mientras que, 10 años más tarde, éstas eran de más del 30%³².

Entender los factores genéticos que condicionan la predisposición para el desarrollo de un CCR y, en general, de

cualquier tipo de neoplasia hereditaria, implica el conocimiento de las diferentes fases de la replicación celular y de sus mecanismos de control.

a) **Replicación del ADN**

La replicación del ADN, según describe Chung³¹, tiene lugar durante la preparación para la mitosis o división celular y, consecuentemente, cada célula hija llevará una réplica exacta del genoma de la célula progenitora. Muchas proteínas nucleares trabajan en asociación para ejecutar este proceso en tres fases: iniciación, elongación y terminación.

La replicación siempre se origina en determinados puntos específicos de un cromosoma, justo en el momento en que la célula entra en la fase S o de síntesis del ADN del ciclo celular⁷. La enzima helicasa separa la doble hebra del ADN en esos puntos de inicio y su apertura da lugar a una estructura abierta, sirviendo cada una de estas cadenas como molde para la síntesis de una nueva hebra complementaria. De esta forma, cada cromosoma hijo contiene una hebra paterna y otra de nueva formación, por lo que el proceso de replicación es *semiconservador*.

Tras la separación del ADN, la enzima ADN-polimerasa comienza el proceso de síntesis para lo que precisa de un *primer* o cebador, es decir, una cadena corta de ARN localizada en el inicio de la replicación. A partir de aquí, se crean dos fuerzas de replicación bidireccionales que se alejan del punto de origen²³. El complejo que contiene la ADN-polimerasa lleva a cabo el proceso de elongación mientras añade un nuevo nucleótido

complementario al cebador. En la figura 2 se puede ver una representación de este proceso.

El conocimiento molecular ha permitido llegar al establecimiento de los distintos modos en que la replicación puede alterarse, dando origen a una mutación. Atendiendo al cambio molecular ocurrido en el ADN se distinguen⁴⁹:

1. *Sustitución de bases*: Cambio de unas parejas nucleotídicas por otras, pudiendo hablarse de una *transición*, si se origina la sustitución de una base púrica por la otra o una pirimidínica por otra de la misma clase, o de una *transversión* si el reemplazo consiste en el cambio de una base púrica por pirimidínica o viceversa.
2. *Inserciones de bases*: Modificación de la secuencia de un gen por introducción de una o más bases en algún lugar de la molécula.
3. *Delecciones de bases*: Modificación de la secuencia de un gen por pérdida de una o más bases en algún lugar de la molécula.
4. *Transposición de bases*: Modificación de la secuencia de un gen por cambio en la posición de una o más bases en algún lugar de la molécula.
5. *Inversiones de bases*: Modificación de la secuencia de un gen por giro de 180° de un grupo de bases dentro de la molécula.

Estos cambios moleculares pueden obedecer a causas muy diferentes, desde fallos del propio proceso replicativo, hasta la acción de una amplia variedad de mutágenos de muy diversa índole.

El mantenimiento de la integridad del ADN es esencial para el normal funcionamiento celular y los errores en su replicación pueden ser observados ya durante la fase de elongación. El error más común es un mal apareamiento de los nucleótidos. Una adenina siempre se aparea con una timidina y una citosina con una guanina; sin embargo la ADN-polimerasa puede, por ejemplo, aparear una adenina con una guanina y este error repetirse cada 10^3 o 10^4 pares de bases⁹⁰.

El segundo tipo de error más frecuente también ocurre durante la replicación del ADN. Consiste en una pérdida momentánea del ritmo de la replicación. Es el *slippage* o error de acoplamiento que afecta al complejo de la ADN- polimerasa y que se presenta durante la replicación de las secuencias del ADN de los microsatélites, o repeticiones cortas de dinucleótidos o mononucleótidos.

El complejo de la ADN-polimerasa constituye, por sí mismo, la primera línea de defensa frente a los errores de la replicación. A través de mecanismos escasamente definidos, la ADN-polimerasa puede, inmediatamente, reconocer un apareamiento incorrecto de los pares de bases. Una subunidad enzimática intrínseca escinde la secuencia incorrecta de la nueva hebra formada y la reemplaza por las bases correctas³¹.

Para aquellos errores que no son inmediatamente corregidos por la ADN-polimerasa, el sistema de reparación de los errores de la replicación del ADN aporta un segundo sistema de corrección. Este sistema no sólo corrige errores de apareamiento de pares de bases sino también bucles erróneos de ADN, consecuencia de errores de replicación de trectos de microsatélites¹⁵⁹.

Cuando los mecanismos de reparación de los errores postreplicativos se encuentran intactos, los errores tanto de apareamiento como de *slippage* se corrigen rápidamente y la secuencia final del ADN es correcta con estabilidad de los microsatélites. Sin embargo, cuando dichos mecanismos fallan, los errores no se corrigen y aparece, bien las mutaciones, bien la denominada inestabilidad de los microsatélites (MSI)³⁰, como se observa en la figura 3.

b) Bases genéticas

Todas las células de un organismo tienen un ADN que es virtualmente idéntico al ADN encontrado en el cigoto. Una mutación que se presente previamente o durante este punto del desarrollo se denomina mutación de la línea germinal. Una mutación en el óvulo o en el espermatozoide se transmite de padres a hijos como un defecto hereditario y es el responsable de un cáncer de igual naturaleza. Cuando una mutación se presenta espontáneamente (mutación de novo) en el espermatozoide, ovario o cigoto, los progenitores de la persona afectada no manifestarán dicha alteración, sin embargo, sí se transmitirá a las generaciones sucesivas iniciando desde ese momento un defecto hereditario²³.

Con más frecuencia, la mutación espontánea se presenta en la célula durante su etapa de crecimiento y desarrollo, dando lugar a una proliferación monoclonal de dicha célula que contiene el material genético mutado, sin que este cambio pueda transmitirse a las generaciones posteriores. El cáncer colorrectal esporádico surge como resultado de una

acumulación de múltiples mutaciones somáticas sobre el material genético celular⁴⁶.

Los genes que con más frecuencia mutan en el cáncer humano pertenecen a una de las tres clases siguientes: oncogenes, genes supresores tumorales y genes de reparación de los errores postreplicativos^{30,194}.

- Los **oncogenes** son genes que en condiciones normales estimulan la proliferación celular. Cuando estos genes mutan dan lugar a una proliferación descontrolada y, en último lugar, a un cáncer²³.
- Los **genes supresores tumorales** son genes normales cuya función desaparece cuando ambas copias o alelos del gen están inactivadas. Cuando un gen supresor tumoral se hereda como una mutación en la línea germinal, tan sólo se requiere la mutación del alelo normal para la pérdida total de función del gen. Esta hipótesis de los dos eventos mutágenos, conocida como hipótesis de Knudson (Figura 4) explica el porqué la enfermedad hereditaria se manifiesta, por lo general, a una edad más temprana que la enfermedad esporádica, así como el concepto de genes supresores que producen cáncer de un modo recesivo a nivel celular⁸⁹.
- Los genes de reparación de los errores postreplicativos constituyen el sistema de reparación de los errores del apareamiento incorrecto del ADN conocido como **missmatch repair** (MMR) y está constituido por un conjunto de genes que monitorizan el ADN recién formado y corrigen los errores originados durante la replicación³⁰. Los defectos en este sistema están asociados al llamado

fenotipo mutador. Las células con mutaciones del sistema MMR en ambos alelos acumulan errores del ADN a lo largo del genoma, afectando entre otros a los genes reguladores del crecimiento, tales como el TGF-R β II¹¹⁰. Estos genes de reparación de los errores postreplicativos son los que se encuentran mutados en el Síndrome de Lynch.

Recientemente, se han reconocido cambios genéticos sutiles que no afectan a la estructura proteica como posible causa del cáncer colónico familiar. Estos pequeños cambios, llamados polimorfismos, son ligeras variaciones en las secuencias de bases de los nucleótidos en los genes²³. Son más comunes en poblaciones que las mutaciones genéticas del cáncer hereditario, pero no siempre dan lugar a su expresión clínica.

c) Mutaciones específicas

Los genes humanos conocidos cuya mutación puede llevar al desarrollo de un tumor colorrectal son los siguientes:

1. *Oncogenes*

El oncogén *ras*, situado en el cromosoma 12, codifica una proteína que actúa como mecanismo de un solo sentido en la transmisión de señales extracelulares de crecimiento y regula la transducción de señales celulares. La activación de *ras* lleva a un estímulo continuo de crecimiento que puede estar en la base de la carcinogénesis. Las mutaciones de *K-ras*, uno de los tres tipos conocidos de *ras*, se detectan en más del 50% de los casos de cáncer colorrectal esporádico y

en pólipos grandes y el reconocimiento de sus mutaciones puede ser de utilidad en el diagnóstico precoz del cáncer colorrectal¹⁸⁰.

El oncogén *src* codifica una proteína que directamente modifica el citoesqueleto y su disrupción puede ser un hecho precoz en el proceso de la transformación maligna y la carcinogénesis²⁴.

Otros oncogenes implicados en el cáncer de colon esporádico incluyen el *c-myc* y el *c-erbB*²³.

2. Genes supresores tumorales

De los genes supresores tumorales conocidos, el *p53* es el que con más frecuencia aparece mutado en el cáncer humano⁸⁸. El *p53* normal actúa deteniendo el ciclo celular para favorecer la reparación del ADN o para inducir la muerte celular programada, denominada apoptosis, por lo que se conoce a este gen como guardián del genoma. Más del 75% de los tumores colorrectales esporádicos exhiben inactivación de *p53*. La identificación de las mutaciones de *p53* en el cáncer colorrectal tiene implicaciones pronósticas. Las personas con tumores que tienen mutación de *p53* tienen peor pronóstico y menor supervivencia que aquellas otras, con igual estadio, que no presentan la mutación⁹¹.

Otro gen supresor conocido es el gen *APC*, causante de la Poliposis Familiar Adenomatosa, cuya función es la inhibición de la proteína β -catenina la cual, a su vez, regula la proliferación celular¹⁶¹. Las mutaciones de este gen son importantes en la transformación precoz de la célula, de forma que cuando se presenta en la línea germinal, nos

encontramos ante una poliposis familiar adenomatosa, mientras que la mutación somática es un evento precoz en el desarrollo de un cáncer esporádico de colon.

En 1989, Fearon⁴⁷ identificó el gen llamado “*deleted in colorectal carcinoma*” (*DCC*) en el brazo largo del cromosoma 18. Dicho gen codifica una proteína que se piensa juega un papel importante en las interacciones entre las células. El 70% de los carcinomas colorrectales y el 50% de los adenomas avanzados han mostrado tener mutaciones en *DCC*.

La presencia de la proteína *DCC* se correlaciona con la tasa de supervivencia, de forma que ésta es similar entre los pacientes con estadio II de CCR que no expresan proteína *DCC* y la de estadios III más avanzados¹⁶³. Esta información puede ser de utilidad para la selección de un subgrupo de pacientes con estadio II de CCR que podrían beneficiarse de un tratamiento con quimioterapia adyuvante. Según el estudio publicado por Gal y colaboradores⁵⁹ en el año 2004, la expresión de la proteína *DCC* sirve para identificar a un subgrupo de pacientes que responden favorablemente a la quimioterapia adyuvante, con mayor supervivencia e intervalo libre de enfermedad. En ausencia de tratamiento complementario en los pacientes *DCC+*, las tasas antes indicadas cayeron significativamente. Por dicho motivo, la determinación rutinaria de dicha proteína pudiera ser de gran utilidad en el algoritmo terapéutico.

Recientes estudios sugieren que otro gen supresor, *DPC4* (*deleted in pancreatic cancer*), adyacente a *DCC* puede ser el gen que se pierde en la mutación del cromosoma 18¹⁸¹.

3. Genes de reparación de los errores postreplicativos (MMR)

Estos genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *PMS1*, *PMS2* y *MSH6*) están involucrados en la corrección de los errores originados durante la replicación del ADN, y su alteración origina, bien la presencia de secuencias anómalas en los microsatélites, bien mutaciones no corregidas³⁰. La consecuencia de la primera es la llamada inestabilidad de microsatélites (MSI), que frecuentemente se encuentra en el tejido tumoral de pacientes con cáncer colorrectal hereditario no polipósico. La secuela de la segunda es una acumulación de mutaciones no reparadas que lleva a la transformación tumoral. Se han estudiado muchos de los loci de estos MMR con el fin de conocer cuáles son los más comúnmente afectados en el HNPCC¹⁸.

4. Genes modificadores

Además de los genes descritos, muchos otros pueden ser importantes en la carcinogénesis del colon, aunque no se conozca su papel exacto ni los mecanismos de acción. Ejemplos de lo anterior son los genes que codifican la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y el gen receptor proliferador-activador del peroxisoma (PPAR)²³.

d) Genética molecular

La genética molecular del cáncer colorrectal es la mejor entendida de las neoplasias humanas. Los modelos de carcinogénesis se basan en la evidencia experimental de que la acumulación de mutaciones lleva a la alteración de genes

específicos tales como oncogenes, genes supresores tumorales y otros genes implicados en la regulación del crecimiento tumoral y la proliferación, dando lugar a la expansión clonal neoplásica⁴⁶.

Fearon y Vogelstein⁴⁶ describieron las bases moleculares del cáncer de colon esporádico al describir un modelo de carcinogénesis en varios pasos. Este modelo describe un acúmulo de eventos genéticos en el que cada uno de ellos confiere a la célula una ventaja selectiva de crecimiento. Estos cambios llevan, en último lugar, a un crecimiento celular no inhibido, a la proliferación y al desarrollo clonal tumoral. El efecto acumulativo de estas mutaciones somáticas, más que el orden en el que se producen, es la causa del cáncer de colon esporádico.

El cáncer colorrectal se desarrolla a través de un proceso de pasos secuenciales reconocidos a nivel histopatológico por la progresión de la mucosa normal a un carcinoma invasivo, conocido como secuencia adenoma-carcinoma. En la mayoría de los carcinomas colorrectales, la inactivación del gen *APC*, localizado en el brazo largo del cromosoma 5¹⁷, comienza el proceso que lleva a la displasia, generalmente en forma de adenoma. Desde aquí, las mutaciones adicionales en los oncogenes, incluyendo los genes de la familia *ras*, y en los genes supresores tumorales localizados en el cromosoma 18q como el *DCC*, *SMAD2*, *SMAD4*, y en el 17q (*TP53*) llevan a la progresión desde el adenoma inicial al adenoma intermedio y, finalmente, al carcinoma. (Figura 5). Se pueden encontrar en los tumores colorrectales diferentes combinaciones de estas alteraciones³⁶.

Sin embargo, en los CCR hereditarios, el número de alteraciones en los oncogenes y en los genes supresores tumorales es demasiado alto como para ser explicado sólo por mutación espontánea, por tanto, probablemente, se requiera de un genotipo inestable para incrementar la tasa de estas mutaciones que lleve al desarrollo de un tumor¹¹¹.

Se pueden identificar, por tanto, dos mecanismos genéticos de carcinogénesis aparentemente distintos:

1. El primero y más común, se caracteriza por la inactivación secuencial de genes supresores tumorales (*APC*, *p53*, *DCC*, *SMAD2*, *SMAD4*). Los tumores que surgen de esta “**vía supresora**” muestran inestabilidad cromosómica (CIN), con anormalidades citogenéticas y pérdida alélica.

El mecanismo exacto que lleva al proceso de CIN no es bien conocido⁶⁴. Mientras que las mutaciones de los oncogenes son generalmente eventos dominantes únicos que ocurren más frecuentemente por mutación genética, la inactivación de los genes supresores tumorales depende de la pérdida funcional de los dos alelos y es más un proceso cromosómico, generalmente una delección. Dado que ésta lleva aparejada una pérdida simultánea de los loci de los genes situados próximos a los genes supresores tumorales y, ocasionalmente a la pérdida de un cromosoma completo o de uno de sus brazos, estos eventos se encuentran fuertemente asociados a una pérdida de heterocigosidad (LOH) en polimorfismo hipervariables (minisatélites y microsatélites) localizados en la región de la delección³⁶.

2. El segundo mecanismo es típico de los tumores del HNPCC. Esta “**vía mutadora**” se caracteriza por la inestabilidad de microsatélites (MSI) que aparece a lo largo del genoma⁶⁴. Recientes estudios apuntan a que la inactivación del gen *MLH1*, a través de la promoción de la hipermetilación pueda también ser causa de la alta inestabilidad del genoma en el CCR esporádico³⁷.

En estados normales, la tasa de mutación cromosómica es más alta que la genómica. Por tanto, en tumores con un sistema de reparación intacto es esperable ver frecuentes deleciones cromosómicas realizando la clásica vía de la tumorigénesis (vía supresora). Cuando la vía mutadora está presente, la tasa de mutación genética se eleva unas 100 ó 1000 veces, lo que hace que las alteraciones cromosómicas que llevan a la LOH sean mucho menos frecuentes.

Aunque estos dos mecanismos de inestabilidad genómica pueden ser diferenciados por sus características moleculares, existen varias evidencias que sugieren cierto grado de solapamiento entre ellos, y de que la presencia de MSI y CIN no representan mecanismos completamente distintos, pudiendo coexistir en algunos tumores, no existiendo una razón para que la LOH no exista en tumores que expresan MSI⁶⁴.

B.- POLIPOSIS FAMILIAR ADENOMATOSA

I.- ASPECTOS CLÍNICOS

La poliposis familiar adenomatosa (PAF), descrita por primera vez en 1925 por Lockhart-Mummery¹⁰⁰, con una incidencia de 1:8000 recién nacidos¹⁵, representa el segundo síndrome más frecuente de predisposición genética al cáncer colorrectal, tras el cáncer de colon hereditario no asociado a pólipos, siendo la responsable del 1 al 2% de todos los casos de CCR.

A pesar de la fuerte desventaja selectiva que supone la presencia de la enfermedad, la incidencia de PAF se mantiene por la aparición de nuevas mutaciones, que supone una cuarta parte de todos los casos¹⁵.

La PAF se caracteriza por la presencia de cientos o miles de pólipos adenomatosos en el colon que, irremediablemente, evolucionan hacia el carcinoma si no se diagnostican a tiempo y se trata al paciente mediante colectomía o proctocolectomía profiláctica, siendo el riesgo de presentar cáncer directamente proporcional al número de pólipos³⁸.

Los pólipos pueden desarrollarse a edades muy tempranas, aunque por lo general este proceso se presenta entre la segunda y la tercera década de la vida, con una edad media de 16 años. Los pacientes pueden permanecer asintomáticos durante años y cuando la clínica aparece, el riesgo de padecer cáncer se sitúa en el 75%. La edad promedio de aparición del cáncer es de 39 años y el fallecimiento de los enfermos no tratados de forma preventiva se sitúa a los 42 años.

La PAF también manifiesta la aparición de pólipos adenomatosos con capacidad de transformación maligna en tramos digestivos altos, sobre todo en el duodeno¹²⁸. En los pólipos

situados en la papila, dicha transformación llega a ser del 12%, de modo que, incluso una vez tratado el colon, la degeneración de estos pólipos es causa de muerte en muchos de estos pacientes⁴⁵.

El Síndrome de Gardner se considera en estos momentos como una variante de la PAF y hace referencia a la asociación de pólipos colónicos con tumores quísticos epidermoides y tumores osteoides benignos en los huesos largos o mandíbula. Según Lofti y colaboradores¹⁰¹, los tumores desmoides constituyen una causa importante de morbilidad en los pacientes afectados de PAF, al crecer, por lo general, en la pared abdominal o en el mesenterio hasta alcanzar un tamaño considerable, precisando frecuentemente de cirugía.

Existe una variante atenuada de la PAF, denominada aPAF, que se caracteriza por un menor número de pólipos en el colon, generalmente menos de 50, con predominio en el colon derecho, de aparición más tardía y con degeneración entre 10 y 15 años más tarde que en la variante clásica. Se asocia, además, con una mayor afectación de los tramos digestivos altos con numerosos pólipos hiperplásicos en el fundus gástrico y adenomas duodenales¹⁰⁵.

En ambos casos de poliposis, junto al riesgo de presentar CCR o cáncer duodenal, los pacientes tienen además el riesgo añadido de padecer cáncer de tiroides, hepatoblastomas, tumores desmoides, tumores de las vías biliares y otras alteraciones fenotípicas, como la hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina (HCEPR)⁵². Esta alteración se presenta aproximadamente en el 60% de los familiares con PAF, no afecta a la visión, puede ser detectada por oftalmoscopia a cualquier edad y, por tanto, puede ser utilizada para identificar parientes de riesgo antes de la aparición de los pólipos.

La base genética de la PAF es una mutación germinal del gen *APC*, que se hereda de forma autonómica dominante con una penetrancia del 100%, por lo que cada uno de los hijos del paciente afectado tiene, en principio, un 50% de riesgo de padecerla, y una marcada variación fenotípica de la enfermedad⁶². Es por tanto preciso realizar árboles genealógicos detallados de las familias afectas y conseguir un control sistemático de los enfermos y de sus familiares directos, con objeto de realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad y evitar la aparición del CCR. Si no se dispone de pruebas genéticas, los familiares directos del enfermo deben comenzar a estudiarse mediante colonoscopia a los 14-16 años, y posteriormente cada año, hasta alcanzar los 40-45, momento en el que puede descartarse razonablemente la enfermedad. También hay que realizar endoscopias gastroduodenales para investigar la posible afectación de tramos digestivos altos⁴⁵. En la figura 6 se aprecia una representación del gen *APC*.

II.- ASPECTOS GENÉTICOS

a) El gen *APC*

Para esclarecer el origen genético de la PAF fueron necesarias numerosas investigaciones hasta que en 1987, mediante técnicas de mapeo genético, se localizó el gen en el brazo largo del cromosoma 5¹⁷ (Figura 7). Posteriormente, en 1991, se pudo identificar el gen responsable al que se denominó *adenomatous poliposis coli (APC)*^{69,87}. Este gen está constituido por 8.535 pares de bases y 21 exones, que codifican una proteína de 2.843 aminoácidos. El exón 15 comprende el 75% de la secuencia codificante y es también el

lugar donde con más frecuencia se producen las mutaciones, tanto somáticas como germinales, que afectan al gen¹⁴.

La proteína APC juega un papel fundamental en la regulación de los niveles intracelulares de β -catenina mediante su degradación, disminuyendo su concentración en el citoplasma y estabilizando los tejidos. Por consiguiente, la mutación de APC conlleva la acumulación de β -catenina, condicionando la pérdida de adhesión celular y activación de la proliferación, que provoca un crecimiento incontrolado de las células epiteliales originándose, de esta forma, los pólipos⁴⁵.

b) Mutaciones germinales en APC

En la mayoría de los pacientes con PAF se han hallado mutaciones en la línea germinal del gen APC³⁴. El 95% de éstas corresponden a “mutaciones no conservadoras” que dan lugar a una proteína truncada con una función anómala. Según la hipótesis descrita por Knudson⁸⁹, diseñada con el fin de explicar a nivel genético la historia natural de la PAF, existiría, además de una mutación inicial en la línea germinal, un segundo evento que provoca la malignidad. Este segundo suceso sería una mutación adicional en el otro alelo sano o pérdida de heterocigosidad en ese locus⁹³.

Un tercio de todas las mutaciones de la línea germinal ocurre entre los codones 1061 y 1309. El resto se distribuye homogéneamente entre los codones 200 y 1600, y rara vez fuera de estos márgenes^{45,93}.

El tipo de mutación germinal en el gen *APC* parece determinar la naturaleza del segundo evento hacia la

carcinogénesis. Si la mutación ocurre entre los codones 1194 y 1392, existe una fuerte selección para la pérdida alélica del *APC* como segundo evento del desarrollo de un adenoma colorrectal. Si la mutación germinal se presenta fuera de esta región, este segundo acontecimiento en la tumorigénesis es la producción de mutaciones truncantes⁹³.

c) Correlaciones genotipo-fenotipo en la PAF (Fig.8)

El riesgo de desarrollar manifestaciones específicas de PAF se correlaciona con la mutación del *APC* que se ha heredado. De esta forma, han sido descritas varias asociaciones fenotipo/genotipo con una considerable variedad en la expresión fenotípica dentro de las familias afectas y entre individuos con la misma mutación, como puede verse en la figura 8. En este sentido, las mutaciones entre los codones 1250-1464 se asocian a la presencia de un fenotipo grave con gran número, más de 5.000, de pólipos colorrectales¹²⁵, aunque algunos pacientes con fenotipo similar tienen mutación del *APC* en el codón 233 del exón 6 y en los codones 486 y 499 del exón 11¹²⁶. De igual modo, la mutación en el codón 1309 y en su extremo 3' provoca un debut temprano de la enfermedad con fenotipo grave^{25,126}.

Las mutaciones que suceden en los extremos 5' (codones 78-163) o 3' del gen, o en la región de procesamiento post-transcripcional del exón 9, dan lugar a formas atenuadas de PAF¹⁵⁷, mientras que las que producen entre los codones 457-1444 se relacionan con hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina⁵². Las afectaciones extracolónicas parecen presentarse con mucha

más frecuencia en pacientes con mutaciones entre los codones 1445 y 1578, o entre los codones 1395 y 1493, según algunos autores ²⁶.

Se ha descrito una distinta evolución de la mucosa del muñón rectal y el riesgo de cáncer a este nivel de los pacientes sometidos a colectomía subtotal profiláctica, dependiendo de la localización de la mutación en el gen *APC*. Por esta razón, el análisis genético podría también determinar el tipo de tratamiento quirúrgico adecuado de cada paciente ¹⁷⁴. No obstante, es necesario clarificar con mayor profundidad las correlaciones entre genotipo y fenotipo, para que en un futuro sea posible diseñar pruebas genéticas que aborden exclusivamente el estudio de los lugares clave del gen, para conocer la evolución y pronóstico de cada enfermo.

d) Mutaciones somáticas

Más del 60% de todas las mutaciones somáticas de *APC* ocurren en menos del 10% de la secuencia codificadora del gen entre los codones 1286 y 1513; a esta región se la denomina *Mutation Cluster Region* (MCR), donde existen dos sitios calientes para las mutaciones somáticas en los codones 1309 y 1450 ³⁴.

En la mayoría de los cánceres esporádicos colorrectales, las mutaciones somáticas dan lugar a una pérdida alélica de *APC*³⁰, que se presenta muy temprano en la vía de la tumorigénesis colorrectal. Estas mutaciones se encuentran en la mayoría de los adenomas y carcinomas de colon y recto, incluyendo adenomas de tamaño inferior a 5

mm. De hecho, la inactivación de ambos alelos de *APC* es un fenómeno muy común en el cáncer colorrectal^{79,125}.

**C.- CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO
NO POLIPÓSICO (HNPCC)
O SÍNDROME DE LYNCH**

El Síndrome de Lynch se caracteriza por el desarrollo de una variedad de cánceres incluyendo las localizaciones colorrectal, endometrial y, con menor frecuencia, de intestino delgado, estómago, vías urinarias, ovario y cerebro. Este síndrome es debido a una mutación de uno de los genes de reparación de los errores de replicación del ADN, denominados mismatch-repair. Su característica principal es la aparición de tumores múltiples a temprana edad¹⁷⁹.

I.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El Síndrome de Lynch tuvo un inicio más dificultoso en su reconocimiento que la PAF. Históricamente, Warthin¹⁸⁶ en 1895 fue el primero en identificar e informar sobre una familia, conocida como *familia G*, domiciliada en Michigan y con una historia familiar cargada de múltiples tumores. En su informe inicial, en 1913, describió su árbol genealógico, mostrando ejemplos adicionales de lo que él denominó “fraternidades cancerosas”. Doce años más tarde, informó acerca del seguimiento de dicha familia, haciendo notar que la mayoría de los tumores se presentaban en el estómago, colon y útero¹⁸⁷.

La edad moderna del entendimiento de esta enfermedad comienza con Lynch en 1966¹⁰², quien describió dos nuevas familias de Nebraska y Michigan, *las familias M y N*, que se caracterizaban por un síndrome de cáncer familiar con un patrón similar de tumores, incluyendo el CCR. Ante la similitud entre las familias descritas, Lynch convoca una reunión con 600 descendiente de la *familia G* y cataloga como de herencia autosómica dominante el patrón de este cáncer familiar¹⁰³.

A pesar de lo ampliamente documentado del caso, muchos siguieron pensando que se trataba sólo de una curiosa y excepcional agregación de una enfermedad común, como eran los cánceres, e incluso que podía ser la consecuencia de la exposición a agentes medioambientales desconocidos. Sin embargo, si se hizo notar el hecho de que predominaba la presentación en determinados órganos, como el colon derecho en el CCR, y que afectaba a individuos demasiado jóvenes para tener cáncer. De una forma importante, “el cáncer de la familia G” demostró que la tendencia en los miembros afectos era la aparición de tumores a edades tempranas, mientras que no era así en los no afectados¹⁰².

II. EVOLUCIÓN DE LA NOMENCLATURA

Desde 1970 hasta 1990, se realizaron múltiples esfuerzos para el estudio biológico del síndrome sin éxito. Durante todo este tiempo, fue referenciado con múltiples nombres como *fraternidades cancerosas*, *síndrome del cáncer familiar*, *cáncer hereditario colorrectal de sitio específico*, *Síndrome de Lynch con sus variantes I y II*, *cáncer hereditario colorrectal no polipósico*, *Síndrome de Muir-Torre*, *Síndrome de Turcot*, etc. A partir de los años 80 los términos con más aceptación fueron Síndrome de Lynch y Cáncer colorrectal hereditario no polipósico.

En 1984, se utiliza por primera vez el término Síndrome de Lynch²⁰ en un intento de optimizar el nombre de síndrome de cáncer familiar que parecía no reconocer la especificidad de determinados órganos para el desarrollo de tumores. En este mismo artículo, también se acuñó el término de Síndrome de Lynch I y II, con el fin de diferenciar a las familias que sólo presentaban

cánceres colorrectales (Lynch I) de aquellas otras que presentaban además tumores en el útero u otra localización (Lynch II)²⁰.

En 1985, Lynch empleó el término de HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) para enfatizar el hecho de que esta enfermedad era distinta de la PAF, focalizando toda la atención en el cáncer colorrectal¹⁰⁴.

Se han utilizado muchos términos para nombrar a la misma enfermedad, incluyendo al propio Lynch, y otros síndromes ya descritos aparecen como posibles variantes; sin embargo, la clarificación vendría unos pocos años más tarde.

III.- GENÉTICA DEL SÍNDROME DE LYNCH

El cáncer es fundamentalmente un desorden genético, lo que significa que, mutaciones en genes específicos, confieren a las células tumorales una ventaja selectiva para el crecimiento⁵³. Estas mutaciones se pueden presentar de forma esporádica o hereditaria en la línea germinal, lo que da lugar a una predisposición hereditaria para el desarrollo de cáncer de aparición temprana. La identificación de estos genes con susceptibilidad para el cáncer ha permitido conocer el proceso celular que, de ordinario, protege contra la formación de tumores. La definición de las bases genéticas del HNPCC ha demostrado la fascinante conexión existente entre la maquinaria celular que regula la replicación y la reparación del ADN con la formación del cáncer³⁰.

La replicación es el proceso por el que el ADN se copia como paso previo para la división celular. Los errores de la replicación son inevitables, de ahí que exista un sistema de reparación especializado para prevenir la acumulación de mutaciones

perjudiciales en el genoma. El sistema de reparación de los errores de la replicación del ADN (MMR) funciona como un guardián que identifica y corrige los errores en los apareamientos de las bases del ADN. El mal funcionamiento de este sistema da lugar a un fenotipo mutador y a la inestabilidad de los microsatélites^{30,138}.

La conexión entre estos fenómenos y la deficiencia del sistema MMR en *Escherichia coli* y en levaduras, aporta un acercamiento inicial a la identificación de los defectos de MMR como causa de susceptibilidad al cáncer en HNPCC/Síndrome de Lynch en el hombre¹⁵⁹.

La familia de las proteínas para la reparación de los errores de la replicación está conservada en la evolución. Mientras que en *E. Coli*, un homodímero MutS detecta el error replicativo y recluta un homodímero MutL que efectúa la reparación, en la célula eucariótica se han identificado, al menos, 6 homólogos al MutS y 4 del MutL; más aún, los diferentes homólogos de MutS y de MutL pueden formar heterodímeros en diferentes combinaciones de acuerdo a los sustratos¹³⁸.

En el HNPCC, un alelo de estos genes reparadores muestra una mutación germinal y el otro alelo normal se inactiva o pierde por mutación somática, lo que lleva a la acumulación de errores de la replicación del ADN, con incremento de las mutaciones y, por último, a la aceleración del proceso de la carcinogénesis²⁰⁰.

Entre los 9 genes humanos del MMR identificados hasta la fecha, las mutaciones en *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* explican más del 95% de todas las mutaciones asociadas al Síndrome de Lynch. Estos genes también están implicados en las señales que inducen apoptosis, por lo que su inactivación no sólo podría incrementar la frecuencia de mutaciones sino además, conferir una ventaja

selectiva para el crecimiento, dando lugar a la formación del tumor¹³⁷. En la figura 9 se puede observar la localización cromosómica de los genes del sistema MMR.

a) Identificación de los genes MutS y su asociación a HNPCC

Los análisis de enlace o *linkage* en dos familias con Síndrome de Lynch, una de Canadá y la otra de Nueva Zelanda, permitieron identificar en el cromosoma 2p16 el primer locus conocido que genera susceptibilidad para este síndrome¹³⁵. Como *MutS*, *MSH2* es el responsable de identificar y reparar los errores de apareamiento. En el momento actual, *MSH2* es el segundo en frecuencia de los genes que aparecen mutados en el Síndrome de Lynch, habiéndose descrito en él unas 200 mutaciones diferentes, lo que significa un 40% de las asociadas al síndrome¹³⁷.

Se ha encontrado que el factor de unión asociado a los errores de replicación predominante en humanos (mismatch-binding), llamado *MutS*•, consiste en dos proteínas, *MSH2* y *MSH6*; esta última fue originalmente identificada como una proteína de unión G/T, o GTBP, y se determinó su secuencia⁴². De hecho, la proteína *MSH6* parece ser la subunidad responsable del reconocimiento del error replicativo dentro del complejo *MSH2/MSH6*.

Los estudios en ratones aportaron la evidencia inicial de que la mutación en *MSH6* podía causar susceptibilidad para el cáncer y pronto aparecieron los primeros informes en humanos demostrando la mutación germinal en *MSH6* que se presentaba en familias clínicamente atípicas con CCR¹²². Si bien estos primeros casos iniciales mostraron profusión de inestabilidad de

microsatélites en el tejido tumoral, estudios posteriores han demostrado que no siempre estas mutaciones germinales se acompañan de dicho evento²⁰¹. La tasa de mutaciones en *MSH6* asociadas al Síndrome de Lynch es aproximadamente del 10%¹³⁷.

Además del *MutS*• se conoce otro factor de unión a los errores de replicación llamado *MutS*•, consistente en la unión de *MSH2* y *MSH3*. *MSH6* y *MSH3* se turnan para ser funcionalmente complementarios. Mientras *MutS*• es el responsable de la reparación de los errores de la replicación base a base y de bucles de inserción/delección pequeños, *MutS*• repara bucles de inserción/delección con un número de nucleótidos entre 2 y 8 no emparejados. Aunque *MSH3* muestra frecuentes mutaciones somáticas en tumores con inestabilidad de microsatélites y su inactivación simultánea puede potenciar las consecuentes mutaciones en otros genes del MMR, no se han detectado mutaciones germinales asociadas al HNPCC¹⁴¹. La complementariedad funcional con *MSH6* ofrece una probable explicación para la falta de mutaciones germinales en *MSH3* en las familias con Síndrome de Lynch⁷⁵.

b) Identificación de los genes humanos MutL y su asociación con HNPCC

Como en el caso de *MSH2*, la clonación fue el método usado para identificar *MLH1*, el principal gen homólogo en humanos del *MutL*. Los análisis en familias suecas permitieron el mapeo del locus *MLH1* en 3p21 y la identificación del gen en esta región mostró mutaciones hereditarias en los pacientes con Síndrome de Lynch²¹. Hoy en día, aproximadamente se conocen

250 mutaciones germinales diferentes en *MLH1* que explican el 50% de todas las mutaciones asociadas a este síndrome, siendo el gen de mayor susceptibilidad genética en relación al mismo¹³⁷.

Existen dos genes más homólogos del *MutL*, *PMS1* en 2q31-33 y *PMS2* en 7p22, que fueron identificados gracias a la secuenciación de sus homólogos en bacterias y levaduras. Las mutaciones asociadas a *PMS2* se han encontrado en pacientes con Síndrome de Turcot, que se caracteriza por una combinación de tumor cerebral primario y adenoma o carcinoma colorrectal¹²². Basados en todos los datos disponibles, las mutaciones en *PMS2* están asociadas a distintos fenotipos. La heterocigosidad para las mutaciones germinales puede predisponer a la aparición temprana del CCR aparentemente espontáneo, mientras que la homocigosidad puede estar asociada bien con el Síndrome de Turcot o con un síndrome de cáncer infantil consistente en tumores primarios del neuroectodermo en ausencia de cáncer de colon¹⁸⁴.

En asociación con *MLH1*, el *PMS2* contribuye a la corrección de apareamientos incorrectos de bases y de bucles de inserción-delección y este complejo (*MutL α*) forma el *MutL* principal en el humano. En la apoptosis, *PMS2* también puede tener actividad independiente de *MLH1*, lo que enfatiza la importancia de *PMS2* como gen de susceptibilidad para el cáncer¹³⁸.

Algunos estudios¹⁸⁴ apuntan a la posibilidad de una infraestimación de la frecuencia de mutación en *PMS2* debido a los actuales métodos diagnósticos.

En la misma familia portadora de la mutación en *PMS1* se descubrió, además, una mutación germinal en *MSH2* y posteriores estudios no han sido capaces de demostrar mutaciones de *PMS1* no asociadas a otras anomalías genéticas. En el momento actual, no existen evidencias convincentes de que la mutación germinal en *PMS1* cause predisposición al Síndrome de Lynch. Este gen es conocido por formar junto a *MLH1* un heterodímero (*MutL β*) en células humanas, pero la posible implicación de este factor en el sistema MMR está aún por demostrar¹⁴⁶.

En busca de proteínas adicionales a *MLH1*, se identificó una proteína codificada por un gen humano novel, *MLH3*, localizado en 14q24.3⁹⁹. El complejo *MLH1-MLH3* (*MutL γ*) se sugirió que participaba en la reparación de bucles de inserción-delección. En el momento actual *MLH3* puede estar asociado con un Síndrome de Lynch atípico con presencia de MSI muy variable¹³⁸.

IV.- INESTABILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES Y CÁNCER DE COLON HEREDITARIO

El investigador español Manuel Perucho¹³⁹ fue el primero en utilizar, de una forma arbitraria, un iniciador de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) sobre el ADN de cáncer de colon buscando inserciones o deleciones genómicas en el ADN tumoral. Comprobó que, aproximadamente en el 12% de las secuencias de ADN de los CCR, aparecían pequeñas mutaciones que no tenían nada que ver con las pérdidas alélicas a gran escala que había estado buscando. Clonó las secuencias mutantes y encontró que estas inserciones y

delecciones se presentaban en las secuencias de los microsatélites o repeticiones de mono/dinucleótidos. Independientemente, Thibodeau¹⁶⁷ descubrió una inestabilidad del genoma presente en el 28% de los cánceres colorrectales, sobre todo en los tumores localizados en el lado derecho, y acuñó el término de inestabilidad de microsatélites (MSI). Ambos autores estuvieron de acuerdo en que esto representaba una vía novedosa de desarrollo tumoral, pero no conocían ni el mecanismo implicado ni su asociación con el cáncer de colon hereditario.

Al mismo tiempo, el Grupo de Colaboración Internacional para el estudio del HNPCC realizó el análisis del genoma en busca del locus del Síndrome de Lynch en dos familias con cáncer de colon familiar. En 1993, este grupo¹³⁵ descubrió una asociación significativa a un locus del cromosoma 2p. Pensando en que el gen del cáncer de colon familiar tenía que ser un gen supresor tumoral, se llevaron a cabo experimentos de pérdida de heterocigosidad, cuyo resultado fue el hallazgo de secuencias de microsatélites mutadas y lo señalaron como “fenotipo de error de la replicación”. No mucho más tarde, Lindblom y colaboradores⁹⁷ encontraron un segundo locus en el cromosoma 3p en familias con cáncer hereditario y en estos tumores también se evidenció la presencia de inestabilidad de microsatélites.

Existen cientos de miles de microsatélites en el genoma humano. Durante la replicación del ADN, las mutaciones que se presentan en algunos microsatélites originan una incorrecta alineación de sus subunidades, dando lugar a contracciones y elongaciones de la cadena. Estas anomalías son, por lo general, reparadas por las proteínas de los genes reparadores de los errores postreplicativos (MMR); sin embargo, en los tumores con deficiencia

de dichas proteínas la reparación es defectuosa y se origina la inestabilidad de los microsatélites³¹ que puede ser detectada por diferentes medios, como se aprecia en la figura 10.

Según Boland¹⁸, el descubrimiento de la inestabilidad de los microsatélites y su relación con el HNPCC en 1993, “abrió un nuevo capítulo en la biología tumoral y en el manejo clínico de los pacientes con alta susceptibilidad al cáncer”. Desde esta primera descripción se han realizado numerosos estudios del CCR basados en la MSI. La consecuencia directa del defecto de la reparación del ADN es el así llamado “fenotipo mutador o de error de la replicación”. Más que una transformación maligna causada de forma directa, la deficiencia de la reparación de la replicación del ADN, crea un entorno que permite que se acumulen las mutaciones en otros genes que regulan el crecimiento. La mayoría de las secuencias de microsatélites en el genoma se localizan en regiones no codificantes o intrónicas, y las mutaciones en estos intrones se cree son silentes y sin consecuencias. Sin embargo, los genes pueden contener microsatélites dentro de sus regiones codificantes, que incluyen receptores para los factores de crecimiento, entre ellos *transforming growth factor- β receptor II*, *insulin-like growth factor II receptor*, reguladores del ciclo celular, reguladores de la apoptosis e, incluso, los mismos genes de reparación de la replicación como *MSH3* y *MSH6*. La transformación hacia la malignidad ocurre, por tanto, cuando estos genes diana mutan. Esta vía MSI representa un paradigma novedoso de la tumorigénesis humana³² y se representa en la figura 11.

Boland y colaboradores¹⁸ demostraron la importancia de identificar pacientes con CCR que mostraran alta frecuencia de MSI, dado su relación con mutaciones en los genes del sistema

MMR y el impacto directo sobre el diagnóstico y el manejo de estos pacientes y sus familiares. Además, la biología de los tumores con alta frecuencia de MSI (MSI-H) difiere de la de los tumores con baja frecuencia (MSI-L) y con los que muestran estabilidad en los microsatélites.

La mayoría de los tumores de las familias con criterios clínicos para el HNPCC muestran también positividad para la MSI, fenómeno que sugiere que la deficiencia del sistema MMR subyace en la mayoría de los tumores del Síndrome de Lynch. Paradójicamente, cuando se testan a estas familias en busca de mutaciones en MMR, entre un 45% y un 86% muestran una mutación. En aquellas familias con CCR que no cumplen estrictamente con los criterios clínicos, las llamadas familias HNPCC-like, la proporción de mutaciones en *MLH1* o *MSH2* es aún más baja (8-30%)¹⁰⁸. Considerando esta evidencia, Lynch y de la Chapelle¹⁰² propusieron que la presencia o ausencia de una mutación germinal en uno de los genes MMR debe ser incorporada en la definición del HNPCC. Mediante este criterio, el diagnóstico del HNPCC será erróneo en algunos pacientes, dado que no todos los genes MMR están estudiados y que los métodos de detección de las mutaciones no son perfectos.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los microsatélites muestran MSI, se han utilizado una amplia variedad de marcadores diferentes con el fin de definir el fenotipo tumoral. Inicialmente, los más usados consistieron en repeticiones de dinucleótidos¹⁶⁸ y, sólo más tarde, se incorporaron los mononucleótidos⁴⁰. Pronto se observó que el número de microsatélites que mostraban MSI parecía variar de un tumor a otro, sugiriendo la presencia de tres

grupos distintos de tumores, dos de los cuales estaban caracterizados por diferentes niveles de inestabilidad.

Históricamente, la falta de consenso sobre la definición de MSI llevó a discrepancias en la información sobre el fenotipo tumoral asociado al defecto en el sistema MMR. El número de microsatélites y la proporción que demuestra inestabilidad para ser clasificado como MSI era variable en los diferentes estudios. En 1998, un grupo de trabajo del National Cancer Institute publicó las guías clínicas para el test de MSI a fin de asegurar uniformidad en la definición y en el diagnóstico de la MSI entre los laboratorios¹⁸. Estas guías clínicas aportaron un panel de referencia de cinco loci de microsatélites validados, consistente en marcadores de repeticiones de 2 mononucleótidos (BAT25 y BAT26) y tres dinucleótidos (D2S123, D5S346 y D17S250)⁴⁰. Usando este panel y según la positividad para los distintos loci de microsatélites, se clasificaron los tumores en MSI-H, MSI-L o MSS. El grupo de trabajo recomendó loci alternativos para el test de MSI, de forma que los laboratorios pudieran expandir sus paneles para incluir marcadores que pudieran aportar información adicional.

Se recomendó un nivel de corte en 30-40% en la MSI para definir la MSI-H. Los tres grupos de tumores según la estabilidad de sus microsatélites se definieron como MSS o microsatélite estable, cuando no muestra inestabilidad en ninguno de los marcadores, MSI-L o de baja frecuencia de MSI, cuando menos de un 30-40% de los marcadores muestran inestabilidad, y MSI-H o de alta frecuencia de MSI, cuando más de un 30-40% de los marcadores muestran inestabilidad. Esta clasificación fue adoptada en la conferencia de consenso del National Cancer Institute en 1998¹⁹.

Entre un 12 y un 15% de CCR no seleccionados muestran MSI-H en el ADN tumoral^{1,2} pero sólo una cuarta parte de éstos, el 3% del grupo inicial, representan a pacientes con el Síndrome de Lynch; los otros 10-12% son una forma adquirida, no familiar, de CCR. Sin embargo, casi todos los CCR del Síndrome de Lynch tienen MSI alto.

Típicamente, en las células tumorales, la mitad o más de todos los microsatélites tienen mutaciones, por tanto, la MSI sirve como un excelente marcador de deficiencia en la reparación. Dado que la MSI se encuentra en casi todos los cánceres colorrectales hereditarios no polipósicos, se considera innecesario buscar mutaciones en la línea germinal de los genes MMR en aquellos pacientes cuyos tumores no tengan MSI. Una excepción es la mutación en *MSH6* que puede no mostrar inestabilidad de microsatélites hasta en un 14% de los CCR¹²².

El uso de marcadores con mononucleótidos en busca de MSI es importante en la detección de anomalías en *MSH6*. Las mutaciones en este gen se presentan en aproximadamente el 10% de las familias con Síndrome de Lynch y se asocian con una versión atenuada del síndrome¹⁸. Varios estudios han demostrado la relación entre la mutación germinal en *MSH6* y los tumores MSI-L²⁰¹. Mientras las células con mutaciones en *MLH1*, *MSH2* o *PMS2* muestran una pronunciada inestabilidad, tanto en los mono como en los dinucleótidos, las mutaciones en *MSH6* no parecen estar fuertemente asociadas con MSI en las repeticiones de mononucleótidos cuando se compara con las de dinucleótidos. Dado que el *MSH6* está implicado en la corrección de apareamientos de bases aisladas, pero no en la corrección de bucles, se intuye que el defecto en *MSH6* da lugar a inestabilidad

en los loci de mononucleótidos pero no en los de dinucleótidos. Por tanto, la clasificación de algunos tumores asociados al Síndrome de Lynch como MSI-L, puede estar derivado de un error asociado a la utilización de determinados marcadores en el análisis de MSI.

Los estudios demuestran que los tumores que muestran ausencia de proteínas implicadas en MMR (*MSH2*, *MLH1*, y *PMS2*) están muy relacionados con los tumores con fenotipo MSI-H⁹⁸. Por otro lado, la ausencia de expresión de proteínas MMR es infrecuente en cánceres de colon MSI-L y rara en tumores MSS. La expresión de proteínas anómalas en la mayoría de los tumores MSI-L puede ser debida al número y al tipo de marcadores utilizados para el análisis de MSI. En aquellos casos con ausencia de expresión de proteínas para *MSH6*, la inestabilidad se observa más frecuentemente con repeticiones de mononucleótidos en comparación con el uso de secuencias de dinucleótidos. Por tanto, si el panel de marcadores utilizados para definir la MSI incluye una alta proporción de dinucleótidos, es más probable que un tumor sea definido como MSI-L más que como MSI-H¹².

En otros estudios, los análisis inmunohistoquímicos también muestran que casi todos los tumores MSI-H sin mutación germinal en MMR, muestran una pérdida de expresión de *MLH1*. Estudios posteriores apuntan a la metilación del promotor *MLH1* como la causa probable de la pérdida de expresión del gen en esos tumores esporádicos³⁷.

En el año 2002, el grupo de seguimiento del National Cancer Institute¹⁶⁹ añadió nuevos criterios para realizar el test de MSI. Las recomendaciones consistían en análisis de seguimiento de los tumores clasificados como MSI-L y en los casos en que sólo las secuencias de dinucleótidos estaban mutadas. Concretamente,

para este último caso, se recomendaba el uso de loci de mononucleótidos para excluir MSI-L.

Cuando se usan las recomendaciones del National Cancer Institute, los estudios han demostrado una excelente correlación entre la presencia de mutación germinal en los genes MMR y el fenotipo tumoral MSI-H¹⁷⁹.

a) MSI y CCR esporádico

Aunque dependiendo del tipo y número de marcadores utilizados, los cánceres de colon esporádicos muestran MSI-L en una frecuencia entre el 5 y el 50% y para MSI-H entre el 10-20%^{1, 40, 167,168}.

La presencia de tres diferentes grupos de tumores (MSI-H, MSI-L y MSS) en el cáncer de colon esporádico suscita muchas cuestiones sobre la etiología y las diferencias entre estos grupos. Los que presentan fenotipo MSI-H muestran características clinicopatológicas distintas ya que se presentan predominantemente en el colon proximal, con más frecuencia en mujeres y con tendencia a la diploidía¹⁶⁷, además también muestran una mejora de la supervivencia¹⁰⁷ y varias características histopatológicas que incluyen alto grado histológico, diferenciación mucinosa o células en anillo de sello, características medulares y respuesta inmune como reacción linfoide Crohn-like con exceso de linfocitos infiltrando el tumor¹². Ninguno de los tumores MSS ni MSI-L demuestran tales asociaciones y, en general, no se distinguen unos de otros. Todos estos datos sugieren que los tumores MSS y MSI-L son diferentes de los tumores MSI-H y en estos datos se basan algunas de las recomendaciones de cribado del Síndrome de Lynch.

b) Análisis de MSI e Inmunohistoquímica en lesiones precancerosas

Existe controversia si en las lesiones precancerosas, tales como los adenomas, existe material apropiado para los análisis de MSI e inmunohistoquímica (IHC). En el clásico modelo de la evolución del CCR, los adenomas son neoplasias en estadios precoces¹⁸¹, pero no todos progresan a carcinomas invasivos. Se ha informado que los adenomas colorrectales de los Síndromes de Lynch frecuentemente tienen un componente vellosos y displasia de alto grado, de forma que mientras los pacientes con Síndrome de Lynch desarrollan adenomas en una tasa similar a la población general, la secuencia adenoma-carcinoma parece estar acelerada, por lo que se ha sugerido un fenotipo “adenoma agresivo”¹⁰⁶. El 57% de los adenomas colorrectales en el Síndrome de Lynch presentan MSI². La falta de MSI en una subpoblación de adenomas de Síndrome de Lynch es más probablemente debida a una falta de adecuada generación de células en división como para permitir el acúmulo de MSI detectable, a pesar de una común pérdida de expresión de proteínas MMR por inmunohistoquímica.

lino y colaboradores⁷⁷ estudiaron 30 adenomas colónicos y 17 pólipos hiperplásicos de 24 individuos afectados por el HNPCC. Se obtuvo el ADN de estas muestras y se analizaron la MSI y las mutaciones conocidas de la deficiencia de los genes MMR. La mayoría de los adenomas de los pacientes con diagnóstico definitivo de HNPCC aportó una MSI alta (80%). De verdadero interés fue el descubrimiento de la transición de MSI-L a MSI-H que está relacionado con el hallazgo de displasias de alto grado y la mutación de secuencias codificadoras que, a su vez, puede llevar a

mutaciones secundarias sobre *MSH3* y *MSH6*. Es posible observar cambios genéticos avanzados en adenomas de pequeño tamaño.

V.- DESCRIPCIÓN CLÍNICA

La descripción de las características clínicas del Síndrome de Lynch ayuda a la identificación de individuos predispuestos al desarrollo de CCR y tumores de otras localizaciones, lo que resulta de interés por la posibilidad de realizar medidas preventivas.

a) Herencia dominante

El Síndrome de Lynch se caracteriza por una herencia autosómica dominante. En su árbol genealógico clásico, la mitad de los parientes de las generaciones sucesivas presentan CCR, cáncer de endometrio y de otras localizaciones. En contraste con una familia afectada de PAF, en los que una tercera parte de los casos tienen su origen en una mutación *de novo* del gen *APC*, las familias Lynch con una nueva mutación en el sistema MMR son raras. Debido a la alta penetrancia de la enfermedad, los saltos generacionales son muy raros. Esta es la razón por la que la vigilancia mediante colonoscopia en las familias Lynch se recomienda sólo en los parientes de primer grado, y no en los de segundo, de los miembros afectados por la enfermedad¹⁷⁹.

b) Variedad de tumores

Se puede encontrar un amplio espectro de tumores en el Síndrome de Lynch. El patrón de los tumores ha cambiado con el tiempo. En las primeras familias descritas por Warthin a principios del siglo XX, los cánceres gástricos y de endometrio

eran los más comunes^{13,186}, mientras que, años más tarde, en las generaciones siguientes, el CCR era el tumor más frecuente^{103,114,179,195}. La variación del patrón de los cánceres con el paso de los años refleja el cambio en la incidencia de los tumores en la población en el mismo periodo de tiempo, lo que también ocurre con las diferencias geográficas¹³⁰. Estas observaciones sugieren que, incluso en el Síndrome de Lynch, los factores medioambientales juegan un papel importante en la carcinogénesis.

Para saber cuál es el programa de vigilancia más apropiado, debemos conocer previamente los tumores que pertenecen al espectro tumoral del Síndrome de Lynch. No hay dudas de que además del cáncer colorrectal y de endometrio, los tumores de intestino delgado, estómago, tracto urinario, ovario, cerebro y de origen sebáceo están asociados con el síndrome. Para la mayoría de estos tumores, los estudios han demostrado que la ratio entre tumores observados y esperados está aumentada^{175,188}.

No existe certeza de que los tumores de mama y próstata pertenezcan al espectro tumoral del síndrome^{158,178}, dado que su incidencia no es mayor que en la población general pero, en algunos estudios, se ha demostrado la presencia de MSI en tumores de estas localizaciones de pacientes de familias Lynch. Esto permitiría hipotetizar que la mutación genética en el sistema MMR jugaría un papel importante en la progresión del cáncer, pero no en la iniciación del tumor dado que su frecuencia no es mayor que en los sujetos no afectados del síndrome¹⁷⁹.

El riesgo de desarrollar un CCR en los portadores de los defectos del sistema MMR varía de un 30 a un 85%^{4,72,175}. El riesgo depende del sexo y del gen MMR involucrado. Desafortunadamente el riesgo exacto de presentar un CCR es desconocido por los sesgos de los estudios que incluyen familias seleccionadas en base, precisamente, a su mayor frecuencia de CCR.

El riesgo del cáncer de endometrio es del 30 al 50%¹⁸⁹ y el de otros tumores asociados al Síndrome de Lynch es menor del 10%. Existen estudios que avalan la posibilidad de que la aparición de tumores extracolónicos viene marcada por la presencia de la mutación en *MSH2*¹⁷⁵, mientras que familias con mutaciones en *MSH6* se caracterizan por el desarrollo de CCR a edad más avanzada y un mayor riesgo de presentar tumores de endometrio⁷².

c) Edad temprana de aparición

Todos los cánceres asociados al síndrome se caracterizan por la aparición a edad temprana, lo que parece estar relacionado con la presencia de la mutación germinal en uno de los genes de reparación del ADN.

Estudios previos han demostrado que la edad en el momento del diagnóstico del CCR disminuye en generaciones sucesivas de familias Lynch, en lo que se denomina anticipación¹¹⁹. Voskuil y colaboradores¹⁸⁵ en un estudio sobre 51 familias con diagnóstico de Síndrome de Lynch, encontraron un incremento del riesgo relativo para CCR en generaciones sucesivas. Sin embargo, los propios autores sugieren que este

fenómeno pueda deberse a un posible sesgo de inclusión en el nacimiento de la cohorte.

d) Tumores sincrónicos y metacrónicos

Una de las características del Síndrome de Lynch es la presencia de múltiples tumores en un mismo paciente. Hasta un 18% de pacientes con CCR con mutación de los genes MMR tienen un tumor sincrónico y/o metacrónico¹⁷⁹. En pacientes con la combinación de CCR y otro tumor relacionado al Síndrome de Lynch, la presencia de MSI es cercana al 50% de los casos. Dada la alta probabilidad de desarrollar un segundo CCR tras el primero, algunos autores recomiendan una cirugía más agresiva, como una colectomía subtotal, tras el diagnóstico de un CCR en un paciente de la familia Lynch¹⁸³.

e) Características del adenoma/carcinoma colorrectal

En un reciente estudio, de Jong⁸¹ demostró que los portadores de defectos en el sistema MMR desarrollaban adenomas con más frecuencia que los no portadores y que éstos eran, además, más grandes y con características histológicas asociadas a un mayor riesgo de degeneración maligna, tales como alto grado de displasia y presencia de un patrón vellosa más extenso. Otra peculiaridad es su localización, predominantemente en el colon proximal.

Los portadores de este defecto genético sometidos a vigilancia, presentan su primer adenoma a una edad media de 43 años y el primer síntoma de un cáncer colorrectal a los 46. Estos hallazgos, en combinación con la observación de que una relativamente alta proporción de pacientes desarrollan CCR

dentro de los 3 años siguientes a una colonoscopia limpia, sugieren que la secuencia adenoma-carcinoma está acelerada, tardando menos de 3 años en realizarse, en comparación con los 10-15 años del caso de CCR esporádico¹⁷⁹.

La mayoría de los adenomas de los portadores muestran MSI o ausencia inmunohistoquímica en una de las proteínas del MMR, por tanto, ambos análisis se pueden considerar de utilidad en pacientes jóvenes con adenomas grandes (>7 mm) y alto grado de displasia⁸¹.

Algunos estudios sugieren que los pacientes de familias Lynch con CCR sobreviven más que otros no seleccionados afectados de la misma enfermedad con el mismo estadio, aunque es posible que dichos estudios retrospectivos tengan un sesgo de selección. También, *in vitro*, se ha demostrado que los CCR con MSI son más resistentes a los agentes quimioterápicos, pero es necesario estudios prospectivos para confirmar estos hallazgos¹⁷⁹.

f) Criterios clínicos para el Síndrome de Lynch

Hasta hace 15 años, el diagnóstico de Síndrome de Lynch se hacía en base a la ausencia de características patognomónicas en contraste con la PAF, en la cual cientos de adenomas colónicos confirman la enfermedad. Sólo la presencia de una historia familiar hacía sospechar el diagnóstico.

En 1990, el Grupo de Colaboración Internacional para el HNPCC (ICG-HNPCC) se reunió en Ámsterdam y desarrollaron unos criterios clínicos para ayudar a coordinar la investigación de esta enfermedad¹⁷². Se tuvieron en cuenta consideraciones matemáticas para evitar la confusión con posibles agregaciones

de cánceres de colon esporádicos y se llegó al siguiente acuerdo:

Criterios de Ámsterdam I (Ámsterdam 1990)

- ✓ Tres o más familiares deben presentar cáncer colorrectal verificado histológicamente, uno de los cuales ha de ser pariente de primer grado de los otros dos, excluyendo la Poliposis Adenomatosa Familiar.
- ✓ El CCR debe aparecer, al menos, en dos generaciones sucesivas.
- ✓ Al menos un caso de CCR debe haber sido diagnosticado antes de los 50 años.

Estos criterios ayudaron a unificar la investigación y a definir el fenotipo. Desde el principio se reconoció que eran muy restrictivos y podrían llegar a excluir a familias muy pequeñas. En 1999, el ICG-HNPCC volvió a reunirse en Coimbra para consolidar los progresos y reconoció la importancia de los tumores no colónicos, dando lugar a los Criterios de Ámsterdam II¹⁷⁷.

Criterios de Ámsterdam II (Coimbra 1999)

- ✓ Tres o más familiares deben presentar un cáncer asociado al CCHNP: CCR, endometrio, intestino delgado o tracto renal verificado histológicamente o mediante informe médico, uno de los cuales ha de ser pariente de primer grado de los otros dos, excluyendo la Poliposis Adenomatosa Familiar.
- ✓ Debe haber, al menos, dos generaciones sucesivas.

- ✓ Al menos un caso de CCR debe haber sido diagnosticado antes de los 50 años.

En Bethesda, en 1996, se organizaron múltiples conferencias internacionales a fin de unificar conceptos, clasificación y nomenclatura sobre la enfermedad. Una consecuencia directa fue el desarrollo de los llamados “Criterios clínicos de Bethesda”¹⁵⁰, que describen prácticamente todas las condiciones clínicas en las que hay sospecha de Síndrome de Lynch. Si un paciente cumple uno de estos criterios, entonces existe indicación de realizar estudios genéticos moleculares adicionales, bien de MSI del cáncer colorrectal o análisis inmunohistoquímicos de proteínas MMR. Muchos estudios han demostrado la utilidad de estos criterios en la selección de familias para los análisis de mutación ¹⁵⁹. Estos criterios fueron posteriormente actualizados en diciembre de 2002 en Bethesda¹⁶⁹.

Criterios de Bethesda clásicos (1996)

- ✓ Pacientes con CCR que pertenecen a familias que cumplen los Criterios de Ámsterdam.
- ✓ Pacientes con 2 neoplasias asociadas al HNPCC, incluyendo CCR sincrónico o metacrónico y/o cáncer extracolónico (endometrio, ovario, gástrico, hepatobiliar, intestino delgado, carcinomas de células transicionales de uréter o pelvis renal).
- ✓ Pacientes con CCR y un familiar de primer grado con CCR, neoplasia extracolónica asociada al HNPCC o adenoma colorrectal; uno de los cánceres diagnosticado

antes de los 45 años de edad y el adenoma antes de los 40 años de edad.

- ✓ Pacientes con CCR o cáncer de endometrio diagnosticado antes de los 45 años de edad.
- ✓ Pacientes con CCR localizado en el colon derecho e histológicamente indiferenciado diagnosticado antes de los 45 años de edad.
- ✓ Pacientes con CCR tipo células en anillo de sello (compuesto por más del 50% de células en anillo de sello) diagnosticado antes de los 45 años.
- ✓ Pacientes con presencia de adenoma colorrectal diagnosticado antes de los 45 años de edad.

Criterios de Bethesda modificados (2002)

- Cáncer colorrectal diagnosticado en pacientes de menos de 50 años.
- Presencia de cánceres múltiples asociados al HNPCC sincrónicos o metacrónicos, independiente de la edad.
- Cáncer colorrectal con MSI-H histológicamente diagnosticado en un paciente < 60 años.
- Individuos con CCR y uno a más parientes de primer grado con un tumor relacionado con HNPCC, con uno de los tumores diagnosticado antes de los 50 años.
- Individuos con CCR y dos o más parientes de primer o segundo grado con tumores relacionados con HNPCC, independiente de la edad.

g) Importancia de los criterios en la práctica clínica

Los Criterios de Ámsterdam son ampliamente usados en la práctica clínica en todo el mundo. A las familias que los cumplen se les debe realizar un análisis de MSI y/o inmunohistoquímico, a fin de identificar el defecto genético del sistema MMR implicado, seguido de un análisis de la mutación del gen. Después de la identificación, los familiares de primer grado deben someterse a vigilancia colonoscópica sin demora.

Los Criterios de Ámsterdam son aún útiles dado que aportan una terminología uniforme y permiten la comparación de los resultados de los estudios publicados. Desde que se sabe que el Síndrome de Lynch está originado en un defecto del sistema MMR y que éste puede ser identificado a través de la MSI, se ha prestado más atención a los Criterios de Bethesda que describen todas las condiciones clínicas en las que está indicada la búsqueda de MSI. Todos los especialistas implicados en el tratamiento del cáncer deben conocer estos criterios a fin de identificar a todas las familias sospechosas de Síndrome de Lynch¹⁷⁹.

En general, se puede decir que los pacientes afectos de Síndrome de Lynch pueden ser identificados en base a la edad de presentación y a una historia familiar característica que cumple los Criterios de Ámsterdam y, en un intento de seleccionar pacientes para el diagnóstico molecular, se propusieron las guías clínicas de Bethesda. Pero incluso entre personas de alto riesgo para el desarrollo de tumores, la sensibilidad de los criterios se sitúa entre un 40 y un 80%¹⁰⁴ y, entre pacientes no seleccionados con cáncer colorrectal, es del 50% o menos³.

Según el trabajo de Hampel⁷⁰, tanto los Criterios de Ámsterdam como los de Bethesda fallaron en 5 de 23 portadores de mutación en MMR dentro de una cohorte de 1066 pacientes. A pesar de ello, estos criterios son aún válidos en situaciones donde no es posible el análisis secuencial de un gran número de pacientes.

Con el fin de evaluar la eficiencia de los Criterios de Ámsterdam y de Bethesda modificados en la identificación de pacientes con mutaciones de la línea germinal en *MLH1* y *MSH2*, Wolf y colaboradores¹⁹⁷ diseñaron un estudio sobre 81 familias austriacas HNPCC no relacionadas entre sí. Como resultado, se propuso un esquema de trabajo (Figura 12).

VI.- INCIDENCIA DEL SÍNDROME DE LYNCH

a) Prevalencia según los Criterios de Ámsterdam

La estimación inicial más alta fue la realizada por Mecklin¹¹² quien encontró que entre el 3.5 y 5.5% de todos los CCR de una provincia finlandesa eran atribuibles al Síndrome de Lynch. Por otra parte, en la relativamente pequeña región de Módena, en el norte de Italia, entre 3.4 – 4.5% de todos los CCR se estimaron que eran debidos al Síndrome de Lynch¹⁴³. Sin embargo, en un amplio estudio multicéntrico llevado a cabo en Finlandia, que incluía la población estudiada previamente, la estimación de la incidencia del Síndrome de Lynch estaba comprendida entre el 0.7-2.4% de la población¹¹⁴. Dada la temprana edad de aparición del síndrome, muchos investigadores intentaron extrapolar la incidencia del Síndrome de Lynch a todas las edades a partir de la incidencia de una

cohorte de pacientes jóvenes. Usando esta estrategia, Westlake y colaboradores¹⁹⁵ concluyeron que la incidencia global en pacientes de menos de 50 años era de 3.1% y la incidencia correspondiente para todos los CCR era de 0.3%. De igual modo, Kee y Collins⁸⁶ la estimaron en un 6% en menores de 55 años, con una incidencia total entre 1 y 2.6%.

Las razones para tan amplias diferencias entre las estimaciones según los distintos estudios son:

- Diferencias interpoblacionales en las mutaciones genéticas del sistema MMR o en la mutación de los genes modificadores.
- Diferencias interpoblacionales en la dieta y factores de estilo de vida.
- Diferencias en la eficiencia de recogida de datos.
- Diferencias en los métodos de cálculo.
- Sesgos de inclusión.

Es probable que algunos de estos factores, si no todos, contribuyan a la variación en los diferentes estudios.

b) Redefinición del Síndrome de Lynch

Después de la clarificación que supuso el papel de los genes MMR en el Síndrome de Lynch, la definición de la enfermedad comenzó a incorporar la presencia o ausencia de mutaciones en estos genes. Entre las familias diagnosticadas clínicamente, la proporción de mutaciones en el sistema MMR, encontradas por estudios moleculares, varía considerablemente entre los investigadores, situándose entre el 30 y el 90%¹⁰⁹, no siendo esperable una concordancia del 100% debido a cambios esporádicos que se pueden presentar en tres familiares, por la

existencia de mutaciones genéticas de alta penetrancia en otros genes distintos a los MMR, presencia de alelos predisponentes de baja penetrancia en otros genes e imperfecciones del sistema de detección de mutaciones²⁹.

Estas consideraciones sugieren que el diagnóstico de Síndrome de Lynch puede ser establecido de al menos dos formas: bien por criterios clínicos, bien por positividad para la mutación del MMR. Es obvio que el diagnóstico en base a criterios clínicos fallará en la estimación, pero también la positividad para la mutación errará en los cálculos de incidencia del Síndrome de Lynch, aunque por diferentes mecanismos. Sin embargo, si el síndrome es definido molecularmente, existe el riesgo de la sobreestimación, dado que se pueden diagnosticar mutaciones poco importantes y cambios secuenciales de significado clínico desconocido¹³⁶.

Por todo lo anteriormente expuesto, de la Chapelle²⁹ propuso definir el Síndrome de Lynch exclusivamente basándose en la presencia de mutaciones deletéreas o perjudiciales en uno de los genes del MMR. Se define mutación deletérea a toda mutación truncante, incluyendo los errores de engranaje, que altere el ADN, y a aquella que se produzca en regiones de regulación que conlleve la ausencia de transcripción o de proteína. La patogenicidad de las mutaciones que comportan cambios en las bases, de las exónicas silentes y la de otros cambios, que no se consideren a priori deletéreos, deben ser valorada individualmente.

c) Cálculo de la incidencia estimada en base a estudios poblacionales

Con el fin de evitar el sesgo asociado a los estudios sobre familias de alto riesgo, se han utilizado informes poblacionales para estimar la penetrancia, con el inconveniente de que, cuando la tara es rara, hace falta realizar el genotipo de un gran número de individuos, lo que encarece el estudio⁵⁸.

La extrapolación de datos a la población general a partir de poblaciones seleccionadas de alto riesgo es incorrecta, pero sirve para realizar una primera aproximación a la estimación de este síndrome. En un estudio del sur de California, a 1136 sujetos se le encuestó sobre la historia familiar de cánceres. Entre los 227 con una historia familiar positiva para CCR, 5 tenían mutación genética de los MMR, concluyendo los autores que la prevalencia del Síndrome de Lynch está probablemente más cerca del 1% que del 5%¹³⁴. En un estudio similar británico, Evans y colaboradores⁴⁴ encontraron 3 mutaciones asociadas al Síndrome de Lynch en una serie inicial de 1329 pacientes.

Las estimaciones sobre la incidencia del Síndrome de Lynch deben estar basadas en todos los pacientes con CCR y/o tumores asociados al síndrome. Como las detecciones de mutaciones son muy costosas como método de despistaje, la mayoría de los estudios hacen la detección de la inestabilidad de microsatélites como primera aproximación al diagnóstico, seguido de la identificación de la mutación en aquellos pacientes positivos para la MSI. Existen diferencias interesantes en la frecuencia de tumores MSI positivos entre los diistintos estudios, que oscilan entre el 8.3-20%. Es tentador postular que las diferencias en las frecuencias de MSI son debidas a diferencias entre las poblaciones o regiones, siendo las de menor incidencia en países mediterráneos, como Italia o Eslovenia, y el de mayor

Estados Unidos. Sin embargo, no pueden hacerse conclusiones definitivas. Otro aspecto que interfiere en los resultados es el hecho de que los estudios de detección de mutación se realizan casi con exclusividad sobre los genes *MLH1* y *MSH2*²⁹.

En el estudio finlandés de Salovaara y colaboradores¹⁵¹, en un 2.7% de los 1044 pacientes estudiados con CCR, se detectó una mutación en *MLH1* y/o *MSH2*. Es posible que esta cifra sea el reflejo de que estas dos mutaciones fundadoras estén ampliamente distribuidas entre la población del este de Finlandia y que originan casi el 70% de todos los casos de Síndrome de Lynch en esta región, resultando que el este de Finlandia puede tener más incidencia que muchas otras regiones.

Basándose en estos estudios publicados, se puede concluir que, según las estrategias y técnicas actuales, la proporción de CCR debida a Síndrome de Lynch se encuentra entre el 1 y el 3% de la mayoría de las poblaciones²⁹. Como sólo se estudian los genes *MLH1* y *MSH2* y la mayor parte de los cambios en las bases se consideran no deletéreos, las cifras pueden estar infraestimadas. Si en la misma cohorte de pacientes se estudiaran los genes *MSH6* y *PMS2* se detectarían más casos.

Este hecho está enfatizado por el estudio de Goodfellow⁶⁸, en el que 441 pacientes no seleccionados con cáncer de endometrio y de dos zonas geográficas distantes se estudiaron en busca de mutaciones en *MSH6*, encontrándose en el 1.6% de los mismos (7 pacientes) mutación a dicho nivel.

A los estudios anteriores hay que hacer varias consideraciones:

- Todos los estudios están realizados en países occidentales, predominantemente sobre población blanca del mundo industrializado. La situación puede ser bien diferente, por ejemplo, en el tercer mundo o en la población no blanca de países industrializados.
- La inestabilidad de los microsatélites se ha presentado como el “patrón oro” para la detección de las deficiencias del MMR, pero no ha sido posible determinar su sensibilidad. Es posible que, mientras la MSI sea el único método de cribaje, los falsos negativos de MSI lleven a cifras equívocas de Síndrome de Lynch. Recientemente, se ha estudiado la valoración inmunohistoquímica (IHC) de las proteínas del MMR en los tumores, cuya sensibilidad para detectar MSI es hasta del 100%⁹⁸. Por tanto, en el futuro, la IHC puede incluso reemplazar a la MSI como método de cribaje.

d) Incidencia del Síndrome de Lynch

Para calcular la prevalencia, un método sería multiplicar la incidencia acumulada de CCR (por ejemplo a los 70 años) por la proporción de todos los CCR debidos a Síndrome de Lynch. Usando esta estrategia, la prevalencia de mutaciones en MMR en la población del este de Finlandia está calculada en 2.7% del 5% que es la incidencia acumulada de CCR¹⁵¹. Con el mismo método y con un 80% de penetrancia entre los portadores de la mutación, Terdiman¹⁶⁶ concluyó que la tasa de portadores de la mutación en la población general se sitúa entre 1:1600-1800. Hay que tener en cuenta que estas cifras están infraestimadas dado que:

1. Se ignoran las mutaciones en *MSH6* y *PMS2*.
2. Ni las mutaciones ni la detección de MSI son 100% sensibles.
3. Las estimaciones se han hecho sólo en base al CCR.

En conclusión, si la proporción de todos los CCR debidos al Síndrome de Lynch se encuentra entre un 1 y 3% y el riesgo acumulado de CCR es del 5%, la incidencia en la población general se sitúa entre 1:2000 y 1:660, por lo que es razonable concluir que el Síndrome de Lynch es una de las enfermedades hereditarias más comunes en el hombre²⁹.

VII.- ESPECTRO TUMORAL

Está bien establecido que los portadores de las mutaciones en los genes del sistema MMR tienen alto riesgo de desarrollar cánceres en el colon y endometrio^{5,175}. Sin embargo, existen otros tipos de tumores observados en los portadores del Síndrome de Lynch y en los familiares de alto riesgo.

Es evidente que definir el espectro tumoral no es simplemente una cuestión de listar los cánceres que pueden afectar a los pacientes con este síndrome. Además, no existe evidencia de que estos pacientes no puedan desarrollar cualquier tipo de neoplasia, por lo que la lista podría incluir cualquier tumor humano. El espectro tumoral debiera incluir sólo aquellos tumores que estén asociados al Síndrome de Lynch, pero no existe acuerdo en lo que quiere decir asociación. Al respecto existen dos puntos de vista¹⁹²:

1. El cáncer asociado al Síndrome de Lynch es aquél que se presenta en los pacientes afectados con mayor frecuencia que en la población general. Este tipo de asociación se demuestra comparando las tasas de los portadores frente a los no portadores o la de los afectados *versus* la población general.

2. Los cánceres asociados son aquellos que se derivan del defecto genético portado por el paciente. Se demuestra porque un tumor en un paciente con Síndrome de Lynch con una mutación conocida, muestra pérdida o inactivación de uno de los alelos del gen mutado y la presencia de inestabilidad de microsatélites en el tumor.

En el Síndrome de Lynch, los estudios dependientes del genotipo son difíciles de interpretar a causa de que la detección de la mutación no es 100% sensible. La mayoría de las estimaciones de la penetrancia basadas en el genotipo se hacen sólo sobre dos genes, *MLH1* y *MSH2*. Las mutaciones sobre *MSH6* dan cuenta sólo de una minoría de familias Lynch, y su fenotipo difiere del típico de este síndrome: los tumores endometriales son más comunes, la edad de aparición del cáncer es más tardía y la penetrancia es baja. Existe también alguna evidencia de que las mutaciones en *MLH1* y *MSH2* no son equivalentes fenotípicamente¹⁹².

Las familias Lynch en las que no se ha encontrado una mutación pueden ser portadoras de mutaciones en cualquier gen de reparación de los errores de la replicación, y estas mutaciones pueden tener mayor o menor penetrancia que las mutaciones encontradas con las técnicas corrientemente usadas. Esto significa

que las estimaciones de la penetrancia basadas en tales familias están sesgadas en una extensión y dirección desconocidas.

Los estudios que no dependen del genotipo basan sus datos en la valoración clínica, principalmente en el fenotipo tumoral, para identificar a las familias y los casos del Síndrome de Lynch. El fenotipo tumoral de un caso individual nunca es un indicador sensible ni específico del síndrome; la historia familiar es siempre una parte de la evidencia de que un paciente dado tiene este síndrome. No existe una forma correcta de eliminar este sesgo de inclusión.

Finalmente, debe hacerse notar que algunos de los tipos de tumores asociados al Síndrome de Lynch son más bien raros. En tales casos, incluso si el riesgo es muy fuerte, el número de diagnósticos hechos puede ser pequeño. En estos casos, la fuerza del estudio para detectar elevaciones del riesgo es bajo excepto en una muestra muy grande de casos de Síndrome de Lynch.

A pesar de estas cuestiones, es importante identificar lo mejor posible los tumores asociados al Síndrome de Lynch. En el año 2001¹⁹¹ parecía haber una clara evidencia para incluir como tumores asociados los de endometrio, estómago, ovario, tracto urológico, intestino delgado, tracto hepatobiliar y tumores cerebrales. De éstos, el cáncer de endometrio es el más común¹⁰⁸, apareciendo una media de 15 años antes que en la población general¹⁸⁶. Existe un riesgo aumentado para los tumores de intestino delgado, mientras que para los cánceres de pulmón, mama, próstata, vejiga, laringe o cerebro el riesgo relativo es similar a la población general¹⁰⁸. Otros estudios parecen confirmar estas conclusiones¹¹⁴.

En Francia, Parc y colaboradores¹²⁹ realizaron un estudio prospectivo de 348 sujetos, pertenecientes a 163 familias, en las que se estableció una mutación en *MLH1* o *MSH2*. El análisis de la historia tumoral en los sujetos y sus familiares mostró que, aproximadamente la mitad de los tumores, se localizaban en el colon proximal al ángulo esplénico. En los varones, una cuarta parte de los tumores estaban en el colon distal o en el recto, mientras que en las mujeres, la proporción de estos tumores era menor (19%) y el cáncer de endometrio suponía la cuarta parte de los tumores diagnosticados. En el intestino delgado se localizaba el 6% de los tumores en ambos casos. El 10% restante de ambos grupos se repartía entre tumores más raros como el estómago, sistema nervioso central, ovario, tracto biliar, riñón y tracto urinario. Las neoplasias de mama, tiroides, pulmón y próstata eran infrecuentes en ambos grupos de pacientes.

Park y colaboradores¹³¹ investigaron a 1011 individuos pertenecientes a 66 familias coreanas con Síndrome de Lynch, centrándose en el riesgo de cáncer gástrico (28 familias con Criterios de Ámsterdam y 38 que no los cumplían). Se calculó el riesgo relativo global y por edad en estas familias frente a la población general, identificándose 25 pacientes con cáncer gástrico de entre 22 familias Lynch. El riesgo de cáncer gástrico en pacientes con CCR y en sus familiares de primer grado fue de 2.1 veces mayor que en la población general (95% de intervalo de confianza; rango: 1.4-3.2). El riesgo relativo (RR) de cáncer gástrico en las generaciones más jóvenes era mucho mayor (11.3 veces a los 30 años y de 5.5 veces a los 40). Además, el RR era mayor en familias con mutación positiva que en las que no presentaban mutación (3.2 vs 1.6 veces).

Existe controversia sobre la relación cáncer de mama y Síndrome de Lynch. Según Risinger y colaboradores¹⁴⁸, no hay duda de que este tumor es parte integral del síndrome y basa su afirmación al observar dos tumores de mama en familias con mutación de *MLH1*. En ambos casos, los tumores de mama mostraron alta inestabilidad de microsatélites con pérdida de la expresión del alelo *wild-type MLH1*. También se examinaron otros 4 tumores más de mama de otras familias con Síndrome de Lynch que presentaban MSI en este mismo estudio. Otros autores¹⁷⁸ sin embargo, no han encontrado un aumento del riesgo de cáncer de mama en la población de los Países Bajos.

En el año 2002, se aumentó la relación de tumores asociados con un caso de leiomiomasarcoma en el seno de una familia con Criterios de Ámsterdam positivos y con inestabilidad de microsatélites en la isla de Tenerife¹¹⁶.

VIII.- DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El establecimiento de un diagnóstico genético del HNPCC ha llenado el hueco dejado por la investigación de los criterios clínicos del síndrome. Los tests genéticos nos permiten, no sólo garantizar el diagnóstico de una parte importante de familias con una historia no confirmada clínicamente, sino también investigar la presencia o ausencia de mutaciones en cada miembro de una familia.

Los principales tests disponibles para la investigación son¹⁷¹:

1. El test de la inestabilidad de los microsatélites.
2. La inmunohistoquímica de las proteínas de los genes reparadores del ADN.
3. La secuenciación del ADN.

a) Test de la inestabilidad de los microsatélites

Los microsatélites son repeticiones de secuencias simples de ADN, entre 1 y 6 pares de bases, que se distribuyen a lo largo del genoma. Su origen se piensa que es defecto de apareamiento durante la replicación del ADN³⁰. La MSI se caracteriza por elongaciones y contracciones del número de repeticiones en múltiples loci de microsatélites que el sistema MMR normalmente reconoce y repara. Sin embargo, en ausencia de un MMR funcional, estos errores no se corrigen y dan lugar a la inestabilidad genómica³¹.

Para la detección de MSI, se extrae ADN de bloques tisulares embebidos en parafina o de tumores en fresco. Para el tejido tumoral, se usan aquellas áreas que contengan más de un 70% de células tumorales y, para los controles correspondientes, el ADN se obtiene de la mucosa normal adyacente o de otros tejidos no neoplásicos del paciente.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza para amplificar y marcar con isótopos o fluoresceína una región de ADN que contenga microsatélites, seguida de una separación en base al tamaño de los productos de la PCR. La MSI se puede observar mediante la comparación de los patrones de electroforesis del ADN amplificado, tanto del tejido tumoral como del sano, y se puntúa en base a la aparición de fragmentos nuevos en el ADN de los tumores. El test comprende un panel de marcadores propuestos por el Grupo Internacional de Colaboración que incluye: BAT25, BAT26, DS123, D5S346 y D17S250. Según el porcentaje de inestabilidad que presenten las muestras, éstas se clasifican en MSI-H, MSI-L y MSS³.

Está claro que los marcadores de las repeticiones de mononucleótidos deben estar incluidos en cualquier panel de marcadores de microsatélites utilizados para la detección de tumores MSI-H. Éstos son relativamente estables y algunos datos sugieren que su uso tiene una mayor sensibilidad y especificidad para la detección del fenotipo MSI-H¹⁶⁴. Los marcadores dinucleótidos son menos sensibles y específicos que los primeros para la detección del fenotipo MSI-H, pero son importantes con propósitos de control de calidad, especialmente para minimizar el número de muestras a analizar.

En la actualidad, los tri, tetra y pentanucleótidos no se utilizan para los estudios de MSI desde que se ha demostrado su estabilidad en tumores MSI⁴⁰.

b) Inmunohistoquimia (IHC)

Dado que la MSI-H parece ser un marcador fenotípico de defecto del MMR, es importante tener un mayor conocimiento de las proteínas implicadas en estos casos. Mientras se identifican los genes asociados al MMR del ADN, se están desarrollando anticuerpos frente a estas proteínas. Estos anticuerpos se han convertido en agentes de gran utilidad tanto para la investigación como para la práctica clínica mediante estudios inmunohistoquímicos.

El examen del tejido colorrectal tumoral, en busca de la pérdida de expresión de las proteínas MMR mediante inmunohistoquimia, complementa el análisis de MSI en el cribaje de defectos de MMR en el Síndrome de Lynch¹². Al igual que el test de la MSI, la IHC se realiza sobre bloques de tejido tumoral embebidos en parafina. Las células tumorales que demuestran

una ausencia de mancha nuclear, cuando las células normales que las rodean si la presentan, se dice que tienen una ausencia de expresión de proteínas.

El análisis de IHC de tumores de individuos de moderado y alto riesgo está disponible para *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* y *PMS2*. La falta de expresión para *MSH2* está casi siempre acompañada de una pérdida secundaria de *MSH6* e, igualmente, la falta de expresión de *MLH1* se asocia a una pérdida de *PMS2*. Sin embargo, la pérdida de *MSH6* y *PMS2* puede presentarse en solitario, en cuyo caso representa el defecto primario. La razón mecánica para la pérdida concomitante de estas proteínas no es del todo conocida. Se especula con que la combinación de proteínas se une como un complejo de MMR y, es posible, que la pérdida de una parte de este complejo afecte a la expresión o a la localización celular de la otra parte¹⁴². En la práctica, la pérdida en solitario de *MSH6* o *PMS2* presenta una fuerte evidencia de mutación germinal en el gen respectivo. Sin embargo, la pérdida de expresión de *MLH1* es indicativa, bien de una mutación germinal o bien de la hipermetilación del promotor de ese gen³⁷.

La pérdida de expresión proteica de MMR está muy relacionada con el fenotipo MSI-H^{72,98,167}. Con la excepción de lo publicado por Hendriks y colaboradores⁷³ y algunos casos de *MSH6*, existen muy pocas situaciones que muestren MSI-L/MSS con una pérdida concomitante de expresión de las proteínas MMR. En una serie de 1463 tumores analizados en la Clínica Mayo, sólo el 0.2% con fenotipo MSS/MSI-L mostraron pérdida de una de las proteínas MMR. En dichas muestras se evidenció pérdida de *MSH6*¹².

Por otra parte, no todos los tumores con un fenotipo MSI-H revelan una pérdida asociada de expresión de proteínas. Aproximadamente el 95% de los casos MSI-H se asocia a la pérdida de *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2*, mientras que el restante 5% se debe a etiología desconocida⁸². Alguno de estos casos pueden deberse a una mutación insensible de uno de los genes ya citados que de lugar a una pérdida de función, pero sin alterar su expresión. Alternativamente, puede tratarse de la alteración de otros genes MMR.

c) Secuenciación del ADN

Es el “gold standard” para la detección de mutaciones. Consiste en comparar cada par de bases de un gen, o parte de él, en muestras de sangre con las correspondientes regiones normales del ADN. A pesar de su alta fiabilidad, tiene una sensibilidad del 70%¹⁵⁶, incluso cuando se realiza en sujetos muy seleccionados con diagnóstico clínico de HNPCC basados en los Criterios de Ámsterdam. Además, la secuenciación del ADN continúa siendo cara y laboriosa, aunque, una vez se ha detectado la mutación en un sujeto, los parientes pueden ser testados a un bajo coste y dentro de un periodo de tiempo corto, dado que el estudio puede ser realizado sólo sobre la región mutada¹⁷¹.

d) Estrategia de diagnóstico para la identificación de pacientes con Síndrome de Lynch (Fig. 13)

El establecimiento del diagnóstico de Síndrome de Lynch ha sido dificultoso debido a la falta de características fenotípicas como ocurre en la PAF. Dado que el CCR

familiar/hereditario es heterogéneo y que el CCR esporádico es relativamente común en la población con agregación familiar, la historia familiar por sí misma no es ni sensible ni específica para hacer un diagnóstico de Síndrome de Lynch. De las familias con diagnóstico clínico de HNPCC, sólo en un 70% encontraremos evidencia de defectos en el MMR y, además, la anormalidad puede estar presente en cualquiera de al menos 4 genes diferentes⁴¹. Por tanto, para identificar mejor las mutaciones en la línea germinal de pacientes con historia familiar y/o criterios clínicos de Síndrome de Lynch, se recomienda un procedimiento diagnóstico escalonado¹⁷¹.

Primeramente se realiza un análisis de MSI e IHC sobre el tejido tumoral, como una evaluación inicial de individuos con riesgo alto de ser portadores de defectos germinales de MMR. Los tumores que tengan MSI-H y/o pérdida de expresión de una proteína MMR (o asociación con pérdida de *MSH6*) tienen una fuerte evidencia de presencia de mutación germinal en ese gen respectivo y se han de realizar esfuerzos para determinar la mutación precisa. Dado que esta mutación se puede presentar en cualquier lugar a lo largo de todo el genoma, se emplea bien la secuenciación directa del ADN o bien técnicas de despistaje de la mutación. Ambas se encuentran limitadas por el hecho de que no detectan deleciones largas, duplicaciones ni otros desarreglos genómicos. Recientes estudios¹⁶⁵ indican que estas mutaciones conforman una significativa proporción de las observadas en *MSH2* (aproximadamente el 30%) y *MLH1* (del 5-10%). Por tanto, debido a la presencia de deleciones y duplicaciones, los métodos basados en PCR deben ser parte del

protocolo rutinario de detección de mutaciones para el Síndrome de Lynch.

La realización de estos últimos análisis, sin realizar previamente una MSI y/o IHC, puede ser innecesariamente cara y llevar a resultados erróneos, dado que, aproximadamente el 30-40% de las familias con Criterios de Ámsterdam positivos y la mayoría de los CCR de aparición precoz, no tienen defectos del sistema MMR¹².

IX.- SEGUIMIENTO EN EL SÍNDROME DE LYNCH

Una vez se diagnostica el síndrome, el sujeto presenta entre un 70 y un 80% de posibilidades de desarrollar un CCR^{175,182} y más de un 50% de riesgo de presentar un cáncer de endometrio, antes de los 50 años si la paciente es portadora de una mutación en *MLH1* o *MSH2*, o antes de los 55 si pertenece a una de las familias *MSH6*^{4,5}. El propósito principal de la vigilancia es la detección precoz de las neoplasias en los estadios asintomáticos, que pueda ser aplicada a los miembros de las familias que cumplen los Criterios de Ámsterdam o en aquellos individuos con síndromes similares al de Lynch y con una mutación desconocida¹¹⁵.

El seguimiento correcto debe estar precedido de una minuciosa charla informativa sobre la naturaleza del síndrome, su historia natural y la necesidad de vigilancia a lo largo de la vida. Los estudios deben comenzar entre los 20 y los 25 años y deben prolongarse hasta los 50 años o más, por lo que hay que evaluar las consecuencias psicosociales de un seguimiento a largo plazo⁶. Sin embargo, también el médico debe saber que las recomendaciones

presentes están basadas en el conocimiento actual y en la opinión de expertos, más que en evidencias.

La necesidad de un único abordaje para la prevención del cáncer en los familiares con síndromes de cánceres hereditarios ha dado lugar al desarrollo de clínicas especializadas. En septiembre de 1995, el Instituto del Cáncer Hereditario de la Universidad de Creighton creó la Clínica para la Prevención del Cáncer Hereditario (HCPC). Entre sus objetivos, trasladar los avances en biología molecular de cánceres hereditarios y la experiencia institucional a métodos de prevención clínicamente aplicables a familias con riesgo aumentado de tumores. Posteriormente, Lemon y colaboradores⁹⁵ publican sus primeros resultados, según los cuales, aquellos pacientes que perciben tener un mayor riesgo de desarrollar cánceres, en base a su historia personal y/o familiar, desean realizarse test genéticos para conocer su propio riesgo tumoral, las necesidades de salud de sus hijos, la toma de decisiones de una cirugía, planear el futuro, tener hijos o para los seguros de vida. Una vez informados de los riesgos potenciales, beneficios y limitaciones de los test de ADN, algunos individuos declinan realizarse dicha prueba.

a) Información a las familias

Una vez se ha desarrollado el árbol genealógico, si se tiene una razonable certeza de estar ante un síndrome hereditario de cáncer, hay que empezar a educar a la familia sobre los programas de despistaje y seguimiento, a fin de que comprendan los beneficios de los tests genéticos. Hay que estar atentos a los problemas potenciales que se pueden presentar como miedo, ansiedad, aprensión, problemas con los seguros

sanitarios, discriminación laboral y disputas entre los familiares¹⁰⁸.

b) Guías clínicas de seguimiento

✓ Tumores colorrectales

En base a estudios observacionales, se recomienda a los individuos con mutación asociada al Síndrome de Lynch una colonoscopia cada 1-3 años, comenzando entre los 20-25²² y el Grupo de Colaboración Internacional para el HNPCC ha hecho suya esta recomendación¹⁷². Es mandatorio realizar una colonoscopia completa, dada la distribución predominante del CCR en el colon derecho en comparación con la población general⁷⁸.

La eficacia del intervalo de 1 a 3 años entre las colonoscopias surgió de un estudio finlandés en el que se compararon los resultados tras la vigilancia de un grupo frente a portadores de la mutación que rehusaron el seguimiento. La frecuencia de los CCR disminuyó un 60% y la mortalidad global un 65% durante el seguimiento de 15 años y no se identificaron muertes relacionadas con el CCR en el grupo del seguimiento. Los tumores observados en el estudio fueron catalogados como Dukes A y B en un 25% de los casos y un 75% de adenomas⁷⁸.

Se han podido diagnosticar tumores asintomáticos dentro de un periodo de vigilancia de dos años¹⁷³, por lo que algunos autores propugnan un seguimiento anual para portadores probados de la mutación¹⁰⁹, pero no existe evidencia de que éste sea el intervalo más óptimo. Dado que el riesgo de CCR es bajo antes de los 30 años en las familias con mutación en *MLH1* y *MSH2*, y muy bajo para la mutación en *MSH6*⁵, la realización

de una colonoscopia cada 2 o 3 años durante los 10 primeros de seguimiento podría ser suficiente, para posteriormente pasar a una vigilancia más estrecha superados los 30 años¹¹⁵.

✓ Tumores ginecológicos

El carcinoma de endometrio es el segundo en frecuencia de los cánceres extracolónicos del Síndrome de Lynch⁵. El riesgo acumulado es mayor del 50% en las mujeres portadoras y la media de edad en el momento del diagnóstico, como se ha mencionado con anterioridad, es de 50 años en las familias *MLH1* y *MSH2* y de 55 en las *MSH6*⁴. Sin embargo, no se han observado diferencias en las tasas de supervivencia entre las mujeres con Síndrome de Lynch cuando se las compara con la población general, dado que este tumor es una causa infrecuente de muerte.

El ICG-HNPCC⁷⁶ recomienda a partir de los 30-35 años, vigilancia anual o bianual para el carcinoma de endometrio mediante ecografía transvaginal o mediante biopsia de endometrio. Este seguimiento permite el diagnóstico precoz de lesiones premalignas y tumores, pero no existen datos disponibles de que aporte beneficio clínico en pacientes asintomáticas.

Un seguimiento menos frecuente y focalizado en grupos de riesgo, como mujeres portadoras de mutación en *MSH6*, podría ser una buena alternativa.

Es importante enfatizar que todas las mujeres con mutación en alguno de los genes MMR, independientemente de la edad, a quienes se les practique una cirugía abdominal por CCR deben tener un examen ginecológico previo a la cirugía

para descartar tumores sincrónicos o procesos endometriales premalignos¹¹⁵.

✓ Otros tumores

Los otros tumores extracolónicos asociados al HNPCC son el carcinoma gástrico, ovario, intestino delgado, pelvis renal, uréter y tracto urinario, páncreas y tracto biliar¹¹³. También se ha encontrado asociación con tumores cerebrales, así como con tumores de piel, el más típico de todos es el adenoma y carcinoma sebáceo. Es probable, que a medida que los portadores de la enfermedad avancen en edad, se encuentren nuevos tipos de tumores asociados a la mutación del sistema MMR¹⁵⁸.

La asociación del Síndrome de Lynch con los tumores de pulmón¹⁷⁵, próstata¹⁵⁸ y mama¹⁷⁸ es controvertida.

Se ha sugerido que los portadores de mutación en *MSH2* tienen un riesgo incrementado de tumores extracolónicos frente a los portadores de *MLH1*, pero no existe evidencia de que se deba instituir programar de vigilancia específicos para cada mutación¹⁷⁵.

El despistaje para todos los cánceres extracolónicos parece ser imposible o ineficaz. La citología de orina, la ecografía abdominal y la determinación del marcador CA-125 para las mujeres, se ha usado como método de detección precoz de tumores de riñón, tracto urinario u ovario sin que la evidencia demuestre su eficacia⁷⁶.

c) Otras medidas preventivas

Durante los últimos años, informes crecientes indican que la aspirina, AINEs y los inhibidores de la COX-2, disminuyen el riesgo de adenomas colorrectales en los pacientes con CCR esporádico y hereditario¹⁶². Estudios randomizados¹⁴⁰ muestran una significativa reducción en el número de adenomas en pacientes esporádicos y en la PAF. El CAPP2 es un gran estudio de colaboración internacional diseñado para establecer la importancia de la aspirina en la prevención de adenomas colorrectales y de carcinomas en el Síndrome de Lynch, cuyos resultados se publicarán en unos años. Los estudios preliminares parecen indicar que en el futuro, la quimioprevención debe ser combinada con la vigilancia en grupos de alto riesgo, como portadores de la mutación, en el Síndrome de Lynch.

La importancia de los factores de riesgo para el cáncer, como el tabaco, la obesidad y los hábitos dietéticos no se han estudiado en el Síndrome de Lynch, pero si se ha informado de diferencias en la edad de la primera manifestación y en el riesgo de tumores metacrónicos entre individuos con idénticas mutaciones¹¹⁵.

d) Guía clínica recomendada

En la tabla número 1 se resumen las recomendaciones hechas por el Grupo de Colaboración Internacional para el seguimiento de los pacientes con diagnóstico de HNPCC⁷⁶, a fin de diagnosticar tumores precoces.

e) Indicaciones para seguimiento individualizado

No existen estudios que muestren que el seguimiento se modifique de acuerdo con la afectación genética o el tipo y localización de la mutación. Si se sabe que entre los afectados por la mutación en *MSH6*, la edad de presentación de los primeros síntomas es mayor, por lo que se recomienda que el seguimiento comience a partir de los 30 años⁷³.

f) Coste-efectividad

El coste mínimo del seguimiento de un individuo con Síndrome de Lynch consiste en unas 20-30 colonoscopias durante su vida. Vasen y colaboradores¹⁷⁶ estimaron que la vigilancia con colonoscopias aumentaba unos 7 años la esperanza de vida y que el coste del seguimiento era menor que el del tratamiento del tumor diagnosticado. La identificación de los portadores mediante análisis de la mutación se ha demostrado ser coste-efectivo comparado con la vigilancia de todos los miembros de la familia, sobre todo cuanto más numerosa sea ésta¹⁴⁵.

g) Resultados del seguimiento

Järvinen y colaboradores⁷⁸ evaluaron la eficacia del seguimiento con colonoscopias en un ensayo controlado de HNPCC a lo largo de 15 años. La incidencia de CCR y las tasas de supervivencia se compararon con dos cohortes de miembros de alto riesgo de 22 familias con HNPCC. A 133 sujetos se les sometió a colonoscopia cada 3 años y a 119 controles no se les realizó ningún seguimiento. Los resultados mostraron que el CCR se desarrolló en un 6% de los pacientes seguidos frente a

un 16% de los controles ($p=0.014$). La tasa de CCR se redujo en un 62%. Todos los tumores en el grupo de estudio fueron locales y ninguno causó la muerte; en comparación, en el grupo control, se registraron hasta nueve muertes secundarias a CCR. La tasa de mortalidad global fue de 10 versus 26 en los grupos de estudio y control respectivamente ($p=0.003$). La conclusión fue que el seguimiento con colonoscopia cada tres años previene la muerte por CCR y disminuye la mortalidad global aproximadamente en un 65% en las familias HNPCC.

Sin embargo, el CCR en el HNPCC se puede presentar a pesar de un seguimiento intensivo. El objetivo del estudio de Renkonen-Sinisalo y colaboradores¹⁴⁷ fue determinar si la supervivencia asociada al CCR era mayor entre los pacientes diagnosticados por colonoscopia frente a los que presentaban síntomas. Los resultados fueron de un 93% a los 10 años vs el 68% registrado para el grupo de no vigilancia ($p<0.02$).

En el año 2006, de Jong y colaboradores⁸³ publicaron los resultados de un programa de vigilancia iniciado a finales de la década de los 80 en Holanda. Se evaluó la efectividad de este programa mediante la valoración de la mortalidad secundaria al CCR y al cáncer de endometrio antes y después de 1990 y la comparación de la mortalidad de causa tumoral (excepto la del CCR y de endometrio) con la mortalidad en la población general. Los resultados se resumen en una disminución de la mortalidad causada por el CCR y que, con excepción de los tumores cerebrales, no existía un incremento de la tasa de mortalidad respecto a otros tumores.

h) Indicaciones de la cirugía

Desde la identificación de los genes responsables del HNPCC, los médicos están más alertas sobre este síndrome y, en consecuencia, se reconocen un número mayor de familias portadoras de este defecto genético. Una cuestión importante es si el manejo clínico del CCR asociado a HNPCC debe diferir del realizado a los CCR esporádicos. Hasta ahora, existía un acuerdo general sobre que la colectomía subtotal era el tratamiento quirúrgico de elección para los pacientes con un HNPCC bien definido con CCR precoces. Esta recomendación se apoyaba en el riesgo significativo del desarrollo de un CCR metacrónico según varios grupos de trabajo¹⁸³. Sin embargo, un reciente estudio mostró que las colonoscopias periódicas de los miembros de las familias con alto riesgo para HNPCC conlleva una significativa reducción en la tasa de CCR y la gran mayoría de los tumores detectados mediante seguimiento, se encuentran en estadios precoces⁷⁸.

Otro estudio reciente¹⁷⁰ mostró que la colectomía subtotal en pacientes con poliposis familiar adenomatosa lleva a una disminución importante de la calidad de vida en comparación con la población general, cuestión que no es enteramente extrapolable a los pacientes con HNPCC, en quienes la colectomía es mejor tolerada gracias a una mayor cantidad de intestino preservado. Desafortunadamente, los estudios de calidad de vida después de diferentes opciones quirúrgicas no consideran específicamente a los pacientes con HNPCC, en quienes el riesgo de presentar tumores sincrónicos o metacrónicos después de una resección de colon limitada podría tener un considerable impacto en la calidad de vida debido al miedo al cáncer.

Con el fin de considerar cuál es el mejor tratamiento para pacientes con HNPCC, de Vos tot Nederveen y colaboradores¹⁸³ realizaron un estudio de análisis de decisión y compararon los efectos sobre la salud entre las principales opciones quirúrgicas. Los resultados de su estudio mostraron que en pacientes jóvenes, la colectomía subtotal y la proctocolectomía llevan a un significativo incremento de la esperanza de vida en comparación con las resecciones segmentarias o hemicolectomías. Añadido a esta cuestión, se suma el peso de una segunda cirugía. Si se asume un riesgo constante del 16% cada 10 años después de una colectomía parcial, los pacientes que presentan un CCR primario con menos de 60 años, tienen un riesgo de una segunda cirugía debido a un nuevo CCR entre un 20 a un 60%, mientras que el riesgo de cáncer de recto tras una colectomía subtotal es de 1% por año¹⁴⁹. En base a estos hallazgos y tras estas consideraciones, este grupo de investigación consideró la colectomía como el tratamiento de elección en pacientes jóvenes con alto riesgo de HNPCC.

Aunque la proctocolectomía se asocia con un mayor incremento en la esperanza de vida, esta opción no se considera en los pacientes con HNPCC debido a sus peores resultados funcionales. Sin embargo, si el cáncer primario asienta en el recto, la proctocolectomía con anastomosis ileorrectal parece ser el tratamiento de primera elección.

En pacientes mayores de 60 años, la proctocolectomía y la colectomía subtotal sólo llevan a un ligero incremento de la esperanza de vida, incluso en tumores detectados en estadios precoces. También, en pacientes añosos, el riesgo medio para el desarrollo de un segundo tumor es relativamente bajo. Como

consecuencia, en estos pacientes se considera a la resección segmentaria como una opción quirúrgica apropiada¹⁸³.

Para la detección de CCR en pacientes con historia familiar sugestiva de HNPCC, los análisis de IHC y/o MSI sobre biopsias son herramientas útiles para confirmar la presencia de inestabilidad de microsatélites, con lo que pueden ser utilizados como paso previo a la toma de decisión de una opción quirúrgica.

En conclusión, aunque la vigilancia intensiva de los pacientes con HNPCC reduce la incidencia de CCR y la mortalidad global, permanece un riesgo importante de desarrollar este tumor. Si el diagnóstico se produce en personas jóvenes (<60 años), el tratamiento de elección parece ser la colectomía subtotal, en base a la diferencia existente en la expectativa de vida entre las opciones terapéuticas y la disminución del miedo al riesgo de un posible segundo tumor. En pacientes añosos, la resección segmentaria es también una opción de tratamiento adecuada¹⁸³.

La cirugía profiláctica antes del diagnóstico de neoplasia no se recomienda, dado que cerca del 20% de los portadores nunca desarrollan CCR y sólo se justifica en determinadas circunstancias como la imposibilidad de una vigilancia regular¹⁸².

En el caso de Síndrome de Lynch II, DeCosse³⁹ considera que cuando se plantea una cirugía por la presencia de un CCR, se debe ofrecer como opción la realización de histerectomía y doble anexectomía, sobre todo a mujeres postmenopáusicas, dado el riesgo de tumores de endometrio.

El interés de esta colectomía profiláctica y/o extirpación profiláctica de endometrio y ovarios, se evaluó en 347 individuos

de 20 familias con HNPCC, testadas para las mutaciones *MLH1* o *MSH2*¹⁰⁸. De los evaluados, 144 fueron positivos para la mutación. Antes de conocer los resultados de la positividad para las mutaciones, se discutió con los pacientes sobre la posibilidad de realizar una colectomía y/o una cirugía ginecológica profiláctica. Aproximadamente la mitad de hombres y mujeres contestaron afirmativamente. Dos terceras partes de las mujeres, también considerarían una cirugía ginecológica. La decisión se mantuvo tras conocer los resultados de las mutaciones.

Se ha valorado también el beneficio de la cirugía ginecológica profiláctica. Schmeler y colaboradores¹⁵³ diseñaron un estudio para determinar la reducción en el riesgo de cánceres ginecológicos asociado a la histerectomía y doble anexectomía profiláctica en mujeres con Síndrome de Lynch. Se identificaron 315 mujeres con mutaciones germinales documentadas asociadas al síndrome. De ellas, se les realizó histerectomía a 61 mujeres y anexectomía bilateral a 47, y se estableció un grupo control con las mujeres que no se sometieron a ningún tipo de cirugía profiláctica. No se detectaron tumores de endometrio, ovario o cáncer peritoneal primario entre las pacientes que fueron intervenidas. En el grupo control, un 33% de las pacientes presentaron cáncer de endometrio, para una densidad de incidencia de 0.045/mujer/año, y el cáncer de ovario se presentó en un 5% del grupo control, para una densidad de incidencia de 0.005/mujer/año. Estos hallazgos sugieren que la histerectomía profiláctica con anexectomía bilateral es una estrategia efectiva para la prevención de

cánceres de endometrio y ovario en mujeres con Síndrome de Lynch.

X.- SUPERVIVENCIA DEL CÁNCER COLORRECTAL EN EL SÍNDROME DE LYNCH

Watson y colaboradores¹⁹¹ realizaron, en 1998, un estudio de cohorte retrospectivo comparando las supervivencias entre los casos de HNPCC, formada por 274 pacientes de 98 familias, con una serie hospitalaria de 820 casos consecutivos de CCR. Los resultados fueron que los pacientes con CCR de familias con diagnóstico de HNPCC tenían un menor estadio tumoral ($p < 0.001$), y menos metástasis a distancia en el momento del diagnóstico ($p < 0.001$). En el análisis de supervivencia de acuerdo a su estadio, los casos de HNPCC tuvieron una mejor supervivencia global.

El menor estadio tumoral en el momento del diagnóstico justifica el menor número de metástasis, pero su supervivencia fue de todos modos mejor que la del grupo de tumores colorrectales no seleccionados con el mismo estadio tumoral. Es de interés que la tasa de mortalidad ajustada a edad y estadio tumoral es de dos tercios de la tasa de mortalidad de la serie no seleccionada.

XI.- CONSEJO GENÉTICO

La interpretación de los tests genéticos para el CCR no es sencilla. La amplia variedad de pruebas disponibles, los diferentes contextos clínicos en los que se pueden obtener y la dificultad en la interpretación de algunos resultados, son algunos ejemplos de la complejidad de esta cuestión.

a) Consejo genético y valoración del riesgo

El consejo genético es un proceso de comunicación dinámica entre el paciente y el médico, quien aporta información y educación dentro de un equipo multidisciplinar. El consejo genético está dirigido a los individuos con interés en conocer la estimación de su riesgo personal. Aquellas personas con mayor riesgo de desarrollar malignidad se podrán beneficiar de las pruebas de cribaje, mientras que a los de menor riesgo se les podrá tranquilizar al saber que su riesgo de CCR no es mayor que el de la población general. Aún más, aquellas personas que hayan sobrevivido a un cáncer podrán conocer el riesgo de presentar una recidiva o un segundo tumor o el riesgo de sus familiares, especialmente sus hijos.

El consejo genético es apropiado cuando la historia familiar es sugestiva de una predisposición hereditaria para los tumores. La presencia o ausencia de una historia familiar de neoplasias benignas o malignas ayuda a determinar si una persona tiene una mayor probabilidad de tumores. Otros rasgos familiares pueden ser característicos de un síndrome genético y sugerir un riesgo incrementado de cáncer. El análisis del árbol genealógico es multigeneracional e incluye detalles de ambas partes de la familia. Se debe intentar documentar todos los diagnósticos de cánceres y para cada caso obtener información sobre al menos la generación previa y posterior. La edad actual o la edad en el momento de la defunción es importante para cada probando, dado que una muerte temprana podría explicar la ausencia de una historia familiar positiva. El conocimiento de las edades de los miembros de la familia también puede ayudar

a determinar cuando los individuos de mayor riesgo se beneficiarán de un seguimiento mayor.

Según Wong y colaboradores¹⁹⁸, se recomienda consejo genético a aquellos individuos con un riesgo absoluto mayor de un 10%, según la tabla número 2.

Aunque el análisis del árbol genealógico es vital para la valoración del riesgo individual, la historia médica previa o la influencia de factores medioambientales no se debe olvidar, incluso ante la existencia de susceptibilidad hereditaria.

La valoración del riesgo es sólo una parte del proceso global educacional en el consejo genético que también debe incluir información sobre los genes implicados, del proceso de paso a las generaciones sucesivas y la historia natural de una enfermedad neoplásica. Otros fines educacionales incluyen la recomendación de modalidades de seguimiento para la detección precoz de tumores y las diferentes opciones profilácticas.

La realización de tests genéticos se propone cuando la historia familiar de un paciente sigue un patrón hereditario autonómico dominante. Las familias que deben realizarse estas pruebas incluyen aquellas portadoras de mutación en *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2* o *MSH6* o las familias que cumplan los criterios clínicos para PAF o HNPCC. La decisión de realizar tests genéticos es personal y está basada en el consentimiento informado que incluye información de los genes testados y sus implicaciones, limitaciones e impacto de los resultados sobre la persona y otros miembros.

b) Interpretación de los test genéticos

b.1) Implicaciones de un resultado positivo

Estos pacientes deben ser educados en el riesgo de desarrollar un CCR, así como un tumor de otras localizaciones, con la consideración de conocer que su pronóstico es mejor que el de los pacientes con CCR esporádico¹⁹¹. Deben someterse a una colonoscopia completa cada dos años, a partir de los 20, y anualmente después de cumplir los 40^{22,172}. La vigilancia sobre la posible aparición de un carcinoma ovárico o endometrial es también importante en las mujeres afectadas por el síndrome, aunque de eficacia menos probada²². En aquellos pacientes que desarrollen un CCR se debe indicar una colectomía total o proctocolectomía¹⁸³.

b.2) Implicaciones de un test negativo

Un paciente con test negativo perteneciente a una familia con mutación conocida no tiene riesgo de padecer HNPCC, dado que su resultado es concluyente. Consecuentemente, el riesgo de presentar un cáncer colorrectal es similar al de la población general y debe seguir los programas de vigilancia generales¹⁹⁸.

OBJETIVOS

La posibilidad de que un individuo, tomado de la población general, desarrolle un CCR se estima entre un 3 y un 6%¹⁸³ y, de éstos, hasta un 5% tendrán su origen en la mutación de los genes de corrección de los errores postreplicativos del DNA⁹⁴.

Con el objetivo de determinar la existencia o no de una zona geográfica con alta incidencia de síndrome de Lynch en la isla de Tenerife, así como las alteraciones genéticas específicas asociadas a estas familias, se inició la identificación y estudio genético de los sujetos guía y sus familiares de primer y segundo grado.

Los objetivos del presente trabajo podemos enumerarlos así:

1. Identificar familias afectadas por el Síndrome de Lynch en la isla de Tenerife
2. Estudiar y valorar posibles variaciones en el espectro de presentación tumoral en una zona genéticamente muy estable
3. Identificar la (las) mutaciones responsables de la enfermedad

MATERIAL Y MÉTODO

I.- RECOGIDA DE DATOS

La búsqueda de posibles familias que pudieran ser catalogadas como afectas de Síndrome de Lynch, comienza a partir de los pacientes diagnosticados de CCR en el Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario de Canarias. Este Hospital es el centro de referencia del Área Norte de Tenerife, cuyo censo es de 334.673 habitantes³⁵.

A partir de los datos incluidos en el historial clínico de estos pacientes y siguiendo un protocolo de recogida de los mismos, se obtuvo una serie de parámetros que se codificaron como variables referentes a la filiación, antecedentes, diagnóstico, clínica, tratamiento, morbilidad, mortalidad y seguimiento. Una vez cumplimentados los formularios se introdujeron en una base de datos Microsoft Access, que incluye pacientes desde 1985 a 2003. Para el presente trabajo fueron de gran utilidad los datos referentes a la filiación y antecedentes personales y familiares. En caso de que éstos aparecieran, se realizó una exhaustiva historia familiar con árbol genealógico completo. El estudio comenzó por el paciente guía y se extendió hasta el primer ancestro conocido y a sus descendientes con tumor hipotético o confirmado. Con tal fin, se utilizaron los registros clínicos y, cuando no fue posible, los certificados de defunción. Para aquellos pacientes de las primeras generaciones, muertos hacía más de 40 años, la memoria familiar sirvió para establecer la localización tumoral.

Se excluyeron del estudio aquellas familias de pacientes no nacidos en las Islas Canarias, así como aquellos cuyos antecesores, de al menos tres generaciones, no fueran oriundos canarios o no existiera parentesco de sangre entre ellos.

Las familias cuyos individuos habían nacido en Canarias pero no cumplían los criterios de Ámsterdam fueron catalogados como de baja probabilidad y, por lo tanto, no sospechosos de padecer Síndrome de Lynch, siendo utilizados como grupo control.

De esta forma, entre enero de 1998 y diciembre de 2001, se localizaron 10 familias del Valle de La Orotava que cumplían los criterios de Ámsterdam II en su totalidad y con inestabilidad de microsatélites presente en sus tumores, de acuerdo con los criterios propuestos en la reunión de consenso de Bethesda.

*Criterios de Ámsterdam II*¹⁷⁷

- ✓ Tres o más familiares deben presentar un cáncer asociado al CCHNP: CCR, endometrio, intestino delgado o tracto renal, verificado histológicamente o mediante informe médico, uno de los cuales ha de ser pariente de primer grado de los otros dos, excluyendo la Poliposis Adenomatosa Familiar.
- ✓ Debe haber, al menos, dos generaciones sucesivas.
- ✓ Al menos un caso de CCR debe haber sido diagnosticado antes de los 50 años.

*Criterios de Bethesda modificados*¹⁵⁰

- Cáncer colorrectal diagnosticado en pacientes de menos de 50 años.
- Presencia de cánceres múltiples asociados al HNPCC sincrónicos o metacrónicos, independiente de la edad.
- Cáncer colorrectal con MSI-H histológicamente diagnosticado en un paciente < 60 años.

- Individuos con CCR y uno a más parientes de primer grado con un tumor relacionado con HNPCC, con uno de los tumores diagnosticado antes de los 50 años.
- Individuos con CCR y dos o más parientes de primer o segundo grado con tumores relacionados con HNPCC, independiente de la edad.

Con todos ellos se realizó una base de datos en formato SPSS que contenía las siguientes variables:

- Nombre
- Apellidos
- Edad
- Sexo
- Municipio
- Nombre genérico de la familia
- Número identificativo
- Extracción del ADN de sangre y tumor
- Número de tumores diagnosticados
- Localización de los mismos
- Estatus de la mutación.

Se registraron 541 pacientes, 102 de los cuales habían fallecido antes del comienzo del estudio, por lo que 439 sujetos eran candidatos a la secuenciación del ADN obtenido mediante extracción sanguínea. Se excluyeron para el análisis genético, no para la confección de los árboles genealógicos, los individuos menores de edad. La única excepción fue un paciente de 6 años que falleció de un tumor del SNC durante el estudio, y del que se

obtuvo muestra de ADN con el consentimiento materno previo al fallecimiento.

Se realizó una primera reunión informativa donde se les explicó a los familiares las características del síndrome, los objetivos del estudio y las posibles repercusiones personales, sociales, económicas, éticas y otros de los resultados tanto afirmativos como negativos. A todos ellos se les ofreció la oportunidad de participar y para los que aceptaron se obtuvo el consentimiento informado. Si el paciente era analfabeto, un testigo imparcial presenciaba la lectura y comentario del consentimiento informado, después firmaría el paciente, así como el testigo imparcial y el que lo hubiese leído. Si el paciente era mentalmente incapaz se obtendría el consentimiento informado de un progenitor, tutor o representante legal. A los individuos menores de edad al inicio del estudio, se les ofreció la posibilidad de sumarse al mismo cuando alcanzaran la mayoría de edad.

El investigador principal, en nombre del equipo de investigación, garantizaba en estas reuniones que la información que se recibiera sería confidencial y sólo sería divulgada al comité ético hospitalario. Esta confidencialidad garantizaba que tan sólo el investigador principal conocería las identidades de las muestras a estudio, las cuales serían “ciegas” para el resto de los diferentes participantes en el mismo, incluyendo el análisis genético y el tratamiento informático de los resultados. Asimismo se explicó que los datos generados por este estudio serían considerados confidenciales, excepto para su posible inclusión en una publicación médica que resumiera los resultados del estudio. También se les informó que los resultados se entregarían de forma individual y personal en sobre cerrado para mantener la confidencialidad en

todo momento, de tal forma que los resultados no serían notificados ni entregados a familiares fueran cuales fueran su grado de parentesco. Además se suministraría una segunda copia para el Centro de Salud con objeto de mantener informado al médico de familia, ante la aparición de síntomas de alarma, aunque la decisión última de la utilización de dicha carta sería del propio paciente.

En los casos de resultado positivo con predisposición genética para el desarrollo de tumores, se les ofertó la posibilidad de seguimiento por los diferentes médicos especialistas del propio hospital, centralizado en el investigador principal del proyecto que coordinaría las diferentes consultas del programa de vigilancia.

Se estableció un grupo control con 30 individuos sin antecedentes familiares operados de CCR en el mismo hospital, etiquetados como esporádicos y procedentes del mismo área geográfica de estudio. Adicionalmente, se estableció un segundo grupo control con 70 muestras de ADN anónimas del banco de sangre.

Los datos en cuanto a incidencia, edad de aparición de tumores y distribución de los mismos hallados en las familias del estudio, se compararon con los últimos registros poblacionales de cáncer disponibles para la Comunidad Autónoma de Canarias, correspondiente al año 1997¹⁵⁵.

II.- ÁRBOLES GENEALÓGICOS DE LAS FAMILIAS DEL ESTUDIO

Con la ayuda del programa Cyrillic 2.0 Pedigree Editor (Cherwell Scientific Publishing Ltd.) se elaboraron los árboles

genealógicos de aquellos individuos intervenidos de CCR en el Hospital Universitario de Canarias. En función del cumplimiento o no de los Criterios de Ámsterdam, los árboles fueron clasificados en grupos de alta y baja probabilidad de Síndrome de Lynch, localizándose respectivamente a 10 y 30 familias en cada grupo. En aquellas con alta posibilidad de Síndrome de Lynch, se expandió el estudio del árbol, lo cual mostró la aparición de mayor número de tumores como se refleja en la figura 14.

En los árboles correspondientes a las familias de alta probabilidad se prestó especial atención a aquellos miembros afectos, haciendo constar las relaciones familiares entre los mismos, el tipo de cáncer del primer diagnóstico de tumor, si éste era de tipo colorrectal con su localización o uno de los tumores asociados al Síndrome de Lynch, la edad en el momento del diagnóstico y si el paciente se encontraba fallecido en el momento de la realización del estudio. En las familias de baja probabilidad la ampliación del árbol no mostró mayor número de tumores.

Aleatoriamente el programa asignaba a cada individuo un número identificativo, sólo conocido por el equipo investigador, con el que a partir de ese momento se realizaba el resto del estudio, lo que garantizaba la confidencialidad de las muestras enviadas al laboratorio para el análisis genético y estadístico.

Hay que destacar que un mismo paciente guía, sirvió para la identificación de dos familias, paterna y materna, ambas con criterios de inclusión para el Síndrome de Lynch.

III.- EXTRACCIÓN DEL ADN

1) Reactivos y soluciones:

a.1. Los reactivos utilizados fueron:

- De Farmacia: Ficoll-Paque
- De Boehringer: Proteinasa K, DNAasa
- De Merck: Etanol absoluto, Acetato de Amonio, Fenol, Cloroformo, Alcohol isoamílico, NaCl, TrisHCl, EDTA, SDS

a.2. Las soluciones empleadas:

- Buffer TENS: NaCl 4M, TrisHCl 1M, EDTA 0.5M, SDS 10%.
- TE: TrisHCl 10mM, EDTA 1mM
- Fenol-cloroformo-isoamílico: TrisHCl 0.1M (pH 8), Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico 25:24:1.
- Cloroformo-isoamílico: Relación 24:1 de Cloroformo:alcohol isoamílico
- Buffer de extracción de ADN: 10mM de TrisHCl (pH 8), 100 mM EDTA (pH 8), 20µg/mL RNAasa libre de DNAasa, 0.5% de SDS.

2) Sangre

Se analizaron muestras de sangre total anticoagulada con EDTA K₃, extraída por venopunción en todos los individuos participantes. Para aquellos pacientes no residentes en las islas, la extracción de sangre se realizó en su lugar de origen y enviada al laboratorio para su análisis, congelada a -4°C.

Los linfocitos se separaron de los hematíes mediante preparación en un tubo cónico de 10 ml según el método de Fontino⁵⁶, que sigue los siguientes pasos:

1. Sobre un colchón de 2-3 ml de Ficoll-Paque (Farmacia), se le añaden 4-5 ml de la muestra de sangre.
2. Se centrifuga durante 10-15 minutos a 3500 rpm a temperatura ambiente.
3. Tras la centrifugación se obtienen diferentes capas siendo la de linfocitos la cuarta, que se aspira y se diluye con tres volúmenes de solución salina.
4. Nueva centrifugación durante 10 minutos a 3500 rpm y a temperatura ambiente. Se retira el sobrenadante y se obtiene un pellet de linfocitos aptos para la extracción del ADN.
5. Si los pellets obtenidos son macroscópicamente hemáticos, se resuspende el pellet en 1 ml de TE, como hemolizante, y se vuelve a centrifugar la muestra durante 10 minutos a 3500 rpm desechando el sobrenadante.

La obtención del ADN se realizó mediante lisis celular seguida de digestión de los núcleos con proteinasa K y extracción fenólica.

1. Se resuspenden los pellets con los linfocitos con 500µl de buffer TENS. Se añaden 50-100µl de proteinasa K a 10 mg/ml y se incuba a 55°C durante al menos 2 horas y, posteriormente, a 90°C durante 10 minutos para inactivar la proteinasa.
2. Se añade a la muestra igual volumen de Fenol-Cloroformo y se invierte varias veces el tubo para mezclar las fases.

3. Se centrifuga la muestra a 13.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. En la fase superior se encuentra el ADN que se toma y se hace precipitar con 1/10 del volumen de Acetato amónico 3M y el doble del volumen de etanol absoluto a -20°C .
5. Nuevamente se centrifuga la muestra a 13.000 rpm durante 5 minutos, se decanta el sobrenadante y se lavan los pellets con 1 ml de etanol al 70%.
6. Se centrifuga a 13.000 rpm durante 5 minutos más, se decanta el etanol, se deja secar totalmente el pellet de ADN y se resuspende en una solución de 100 μl de TE.
7. La muestra de ADN se conserva en congelador, a -20°C , hasta su análisis.

3) Extracción del ADN tumoral

c.1) De muestras congeladas

1. Se corta el tejido y, tras añadir nitrógeno líquido, se golpea hasta pulverizarlo.
2. Una vez evaporado el nitrógeno y descongelado el tejido, se añaden 5 ml de Buffer de extracción del ADN.
3. El material se incuba durante 1 hora a 37°C en baño con agitación.
4. Se le añaden 100 μL de Proteinasa K a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.
5. El lisado tisular se incuba durante 3 horas en un baño de agua a 50°C .

Tras el enfriamiento de la muestra se procede a su extracción fenólica, consistente en:

1. Se enfría la solución a temperatura ambiente y se añade igual volumen de fenol. Se mezclan las dos fases suavemente durante 10 minutos.
2. Se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos y se añade un volumen igual de fenol-cloroformo-isoamílico en proporción 25:24:1. Se mezclan las dos fases durante 10 minutos.
3. Tras centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añade un volumen igual de cloroformo-isoamílico, a razón de 24:1 y se mezclan las dos fases, suavemente, durante 10 minutos.
4. Nuevamente se centrifuga la muestra durante 15 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. Se añaden 0.2 volúmenes de acetato amónico 10M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se agita suavemente por inversión del tubo. En este momento el ADN precipita.
5. Se recoge con un asa y se lava con etanol al 70%, centrifugándolo durante 5 minutos a 13.000 rpm. Esta misma operación se repite dos veces.
6. Se elimina el etanol dejándolo secar durante unos minutos. Tras la adición de 0.5 ml de agua estéril y dos horas a 37°C, el ADN tisular se encuentra listo para su estudio.

c.2) Extracción del ADN de muestras parafinadas

- ◆ *Tampón de Digestión*

Para la realización del proceso de extracción del ADN a partir de muestras embebidas en parafina, es precisa la preparación previa del tampón de digestión cuya composición es:

H₂O mili-Q. 890µl, 4450µl, 8.9ml

Tampón 10X de PCR 100 µl, 500 µl, 1 ml

Proteinasa K [20 mg/ml], 10µl, 50µl, 100µl

Total 1000µl, 5ml, 10ml

◆ *Procedimiento:*

1. Se atempera el baño de agitación a 56°C y, a continuación, se pasan dos cortes de 10 micras a un tubo eppendorf de 1.5 ml, añadiéndose 1200 µl de Xilol para desparafinar.
2. Se arrastran los trozos de parafina al fondo y se centrifuga durante 5 minutos a 14000 rpm.
3. Se retira el pellet con una micropipeta y se repiten los pasos anteriores.
4. Se añaden 1200 µl de etanol absoluto a temperatura ambiente y se mezcla bien suavemente.
5. Se vuelve a centrifugar durante 5 minutos a 14000 rpm, se elimina el sobrenadante con una pipeta sin retirar el pellet y se vuelven a repetir los pasos anteriores.
6. Posteriormente, se seca poniendo el eppendorf abierto a 37°C durante 15 minutos en la estufa hasta que el etanol se haya evaporado.
7. Añadimos 300 µl de Tampón de Digestión y se agita manualmente.

8. Sellamos los eppendorfs con parafilm y se incuban a 56°C en el baño con agitación hasta la total digestión del pellet, unas 12-24 horas. En este paso se puede parar y congelar a -20°C.
9. Si se decide continuar, se atempera la centrifuga a 4°C, se añaden 200 µl de Fenol – Cloroformo - Isoamílico y se agita la mezcla manualmente.
10. Se centrifuga durante 5 minutos a 14000 rpm a 4°C y pasamos el sobrenadante, que es donde se encuentra el ADN, a un tubo Eppendorf cuidando de no coger la interfase que es donde están las proteínas.
11. Se añade 0.1 vol (45 µl) de Acetato de Na 2 o 3M y 2 vol (900 µl) de Etanol absoluto y se agita manualmente durante 5 minutos.
12. Esperamos durante al menos 1-2 horas a 20°C para que precipite el ADN y centrifugamos durante 15 minutos a 14000 rpm, a 4°C y eliminamos el sobrenadante.
13. Se añaden 150 µl de Etanol al 70% frío y se agita manualmente.
14. Nuevamente se centrifuga durante 15 minutos a 14000 rpm a 4°C, se decanta el etanol, este paso se realiza dos veces, y la segunda vez, después de decantar, se extrae el resto de etanol con una micropipeta.
15. Se seca poniendo el eppendorf abierto a 37°C durante 15 minutos en la estufa hasta que el etanol se haya evaporado.

16. Añadimos 30 μl de TE pH 8.0, sellamos los eppendorfs con parafilm, incubamos 1 hora en baño a 56° C y después en la estufa a 37° C hasta la total disolución del ADN, proceso que llevará unas 24-48 horas. La muestra se conserva a -20° C.

IV.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Con el método de extracción del ADN utilizado, extracción fenólica y purificación mediante precipitación con etanol, el material obtenido es suficiente para su cuantificación mediante espectrofotometría.

La técnica se basa en que el espectro de absorción del ADN presenta un máximo a una longitud de onda de 260nm. de forma que la lectura, a dicha longitud, permite calcular la cantidad de ADN presente en la muestra, correspondiendo la absorbancia 1 a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de cadena doble, a 40 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de cadena sencilla y ARN, y a 20 $\mu\text{g/ml}$ de oligonucleótidos.

Para el cálculo de las muestras se realizó una dilución 1/50 y se cuantificó la concentración de ADN en un espectrofotómetro Lambda II Uv/Vis spectrofotometer de Perkin Elmer.

Se calculó la concentración de ADN aplicando la fórmula:
 $\text{ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = 2.5 \times \text{Absorbancia a } 260 \text{ nm.}$

V.- INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Para certificar la inestabilidad de microsatélites, se utilizó un panel de cinco microsatélites estandarizados con repeticiones de mono y dinucleótidos¹⁸. Adicionalmente, para confirmar el estatus de inestabilidad se añadió un segundo panel que incluía repeticiones de dinucleótidos¹¹⁷, cuyas secuencias se describen en la tabla 3.

Se registraron como tumores con MSI de alta frecuencia (MSI-H) los que exhibían cambios en la movilidad de los fragmentos de PCR de al menos un 40% de los microsatélites analizados, en comparación con la mucosa normal. Cuando los tumores mostraban inestabilidad en menos de un 40% de los marcadores, se consideraba MSI de baja frecuencia (MSI-L). Finalmente, los tumores con estabilidad de microsatélites no mostraban inestabilidad en los marcadores analizados.

VI.- PÉRDIDA DE HETEROCIGOCIDAD

Para la valoración de la pérdida de heterocigosidad, se utilizaron algunos de los microsatélites descritos en la tabla número 3. Los marcadores usados para la LOH en el gen *APC* fueron: AC1, D5S107; y para el gen *DCC*: MC1 y D18S74E. Respecto a TP53, su pérdida de heterocigosidad se estimó mediante dos microsatélites, el loci D17S1176 (intrónico al gen) y el adyacente a D17S578⁶⁶.

La LOH se evaluó de acuerdo a la siguiente ecuación: $L = (T2 \times N1) / (T1 \times N2)$, donde T1, T2, N1 y N2 son las densidades de los alelos 1 y 2 en las muestras de tumor y de mucosa normal respectivamente. Si el valor de L se encuentra entre 1.67 y 0.6,

entonces uno de los alelos presenta una disminución mayor del 40%, siendo positiva la LOH.

VII.- DETECCIÓN DE *K-ras* Y MUTACIONES EN *p53*

Las mutaciones en el codón 12 del gen *k-ras* se detectaron mediante PCR-RFLP enriquecido como describió Kahn y colaboradores en 1991⁸⁵.

Se utilizó una PCR-SSCP para analizar los exones 5 – 8 del gen *TP53* siguiendo los primers y condiciones descritas por Georgiades y colaboradores⁶⁰ en 1999, con modificaciones menores. En la electroforesis para la detección de mutaciones se incluyeron muestras con mutaciones conocidas para ser utilizadas como controles.

VIII.- AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS MEDIANTE PCR-SSCP DEL EXÓN 13 DEL GEN *MSH2*

a) Reactivos y soluciones:

1. Tampón PCR 10x: (10mM TrisHCl, pH9; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂).
2. Taq-Polimerasa (Promega)
3. Cebadores o Primers *MSH2* (1+5):
 - *Msh2-1*: 5'- CGCGAT TAATCATCAGTG- 3'
 - *Msh2-5*: 5'- ATGGCACAAAACACCCAA - 3'
4. dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Boëhringer-Manheim)
5. ADN a amplificar

6. Agua destilada
7. Aceite mineral (Perkin-Elmer)

b) Material

Termociclador: DNA Thermalcycler de Perkin-Elmer

c) Mezclas

Las reacciones fueron hechas a un volumen final de 50 μ l, donde se incluyen:

- ✓ 30 μ l de H₂O
- ✓ 10 μ l polymejor 5x
- ✓ 5 μ l de Tampón 10x PCR (10 mM TrisHCL, pH 9.0; 50 mM KCL; 1.5 mM MgCl₂.)
- ✓ 2 μ l de dNTP a 2.5 mM.
- ✓ 1 μ l de Msh2 (1 + 5) a 25 μ M.
- ✓ 1 μ l de Taq DNA polimerasa (2.5 unidades)
- ✓ 1 μ l de DNA.
- ✓ Una gota de aceite

Se agita para obtener una buena mezcla.

d) Condiciones de la PCR

Se lleva la mezcla al termociclador, en el que tenemos programadas las condiciones para la amplificación:

1^o Fase: 95^o durante 3 min

2^o Fase: 1 min a 94^oC, 1 minuto a 47^oC, seguido de
1 min a 72^oC (x 30 ciclos)

3^o Fase: 72^oC durante 20 min

En estas condiciones, el fragmento de 180 bp es digerido con la enzima *Hsp92II* durante 3 horas a 37°C. El alelo codificante para Arginina (R) origina un fragmento de 183 pb, no cortado por *Hsp92II*, mientras que el alelo codificante para Metionina (M) origina dos fragmentos de 158 pb y 25 pb, como se aprecia en la figura 15.

e) Electroforesis vertical

A continuación el producto amplificado se puede visualizar en una electroforesis en gel de acrilamida, donde el ADN va a separarse dependiendo de su tamaño molecular y de su carga. Debido a que el ADN está cargado negativamente, por los grupos fosfato, al ser sometido a un campo eléctrico va a migrar hacia el polo positivo. La tabla nº 4 refleja la composición de los geles de poliacrilamida que se confeccionan para la electroforesis.

Los reactivos en stock utilizados para la electroforesis son:

1. *TBE 5X*: se usa como buffer para mantener el pH y su composición sería:

0.47 M Trisma Base

0.44 M Ac. Bórico

0.01 M EDTA

2. *Acrilamida*: Al 30%, en una proporción acrilamida-bisacrilamida de 29:1.

3. *APS (Persulfato amónico)* en una concentración de 250 mg/ml.

f) Tinción con Bromuro de Etidio

Después de haber terminado la electroforesis se sumerge el gel en una solución de Bromuro de Etidio a 0.5 µg/ml durante 10-15

minutos con agitación de 120 unidades por minuto y se lava con agua durante otros 10-15 minutos. Se lleva a continuación el gel al transiluminador ultravioleta para ver la obtención de los resultados.

Los geles se analizaron mediante el densitómetro de imagen GS-690, el software de análisis molecular de Bio-Rad y el software de Excel de Microsoft. Se analizaron tanto las densidades como la migración de las bandas, en los tumores y en la mucosa normal. La densidad relativa de los dos alelos en cada muestra tumoral se comparó con la densidad relativa en sangre y en mucosa normal.

IX.- ANÁLISIS SECUENCIAL

Los productos de la PCR que mostraron movilidad electroforética aberrante, fueron secuenciados cíclicamente usando dideoxinucleóticos marcados con fluorcromo (Aplicado de Byosystems y Beckman) bien en el primer o en el último cebador. Los productos de esta reacción fueron separados por electroforesis capilar y analizados mediante un software de secuenciación automática (ABI310, Aplicado de Byosystems, y CEQ 2000 XL ADN Sistema de Análisis, Beckman). El software BLAST www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST se utilizó para comparar la secuencia con los datos del cADN y el genoma de MSH2 en Genbank, www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank, número de acceso: U41218 y NM_000251.

X.- ANÁLISIS DEL HAPLOTIPO

El análisis del haplotipo se realizó utilizando 5 microsatélites (D2S391, D2S288, D2S123, D2S378, D2S136) alrededor del gen *MSH2* mediante PCR. Se analizaron las muestras de ADN de miembros de dos generaciones sucesivas de las 5 familias con la mutación, así como del grupo control. El haplotipo enfermo se estimó usando el software de utilidad de linkage EH (Estimated Haplotype; <http://linkage.rockefeller.edu/software/eh/>).

XI.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se expresan con frecuencias y porcentajes. Las variables cuantitativas con medias y desviaciones típicas. Las comparaciones de proporciones para un orden de clasificación se llevaron a cabo con la prueba de Kruskal-Wallis y los valores de probabilidad fueron exactos. Se usó en los análisis estadísticos el paquete StatXact 5.0.0 (Statsoft Co, MA).

RESULTADOS

De la base de datos de CCR del Hospital Universitario, en 42 pacientes (5,7%), se recogieron antecedentes familiares de cáncer colorrectal en primer grado y en 12 pacientes (1,5%) en segundo grado. En 5 casos (0,6%) existían antecedentes familiares, tanto en primer grado como en segundo grado. En conjunto, en 49 pacientes (6,2%) se constató la presencia de algún familiar con cáncer colorrectal, como se refleja en la figura 16.

Tras la realización de la historia clínica, con especial atención a los antecedentes familiares del paciente, se consiguió identificar a 10 familias que cumplían enteramente los criterios de Ámsterdam modificados y cuyo paciente guía mostraba MSI en el tumor por el que había sido atendido. Con todo ello se realizó una base de datos en formato SPSS y, con la ayuda del programa informático Cyrillic 2.0 ya descrito anteriormente, se elaboraron los correspondientes árboles genealógicos de las familias objeto del estudio, que quedan reflejados en las siguientes figuras (Fig. 17-26).

De este modo se registraron 541 pacientes, 102 de los cuales habían fallecido antes del comienzo del estudio, casi todos ellos pertenecientes a generaciones anteriores al individuo guía, por lo que 439 sujetos eran candidatos a la secuenciación del ADN mediante extracción sanguínea. A todos ellos se les ofreció la oportunidad de participar aceptando 321 (Tabla 5).

La distribución según sexos de la totalidad de los miembros de estas familias fue de 271 mujeres y 270 hombres (50.1% y 49.9%, respectivamente), según se muestra en la figura 27.

En 107 casos (19.8%) se pudo localizar algún tipo de tumor asociado al Síndrome de Lynch. De éstos, 56 eran hombres y 51 mujeres (52.3% y 47.7%; $p= 0,56$), cuya distribución de tumores queda reflejada en las figuras 28 y 29.

La edad media de aparición de los tumores fue de 48.9 ± 0.14 años (hombres 49.6 ± 0.31 , mujeres 48.6 ± 0.25). En la tabla 6 se especifican el número de miembros afectados de cada una de las familias, así como el número de tumores encontrados y la edad en que se hizo el diagnóstico del primer tumor.

Por lo tanto, observamos que de los 541 miembros que componían las familias del estudio, 107 computaron un total de 129 tumores. (Figura 30).

La proporción de familiares con afectación tumoral fue desigual en las diferentes familias, como se aprecia en la figura 31, expresándose en la figura 32 el número de tumores encontrados en cada grupo de edad, expresados en décadas.

Como se aprecia en la figura 33, el 49.4% de los tumores aparecieron en pacientes menores de 50 años y un 3.7% en los menores de 20 años, destacando una leucemia en un paciente de 5 años, un retinoblastoma a los 2 años, un cáncer de colon a los 18 años y un tumor de SNC, a los 6 años, que causó la muerte del paciente.

Se detectaron un total de 129 tumores, de los que el CCR era el más frecuente, con un número de 65 casos (50.4%), afectando a 57 pacientes, que corresponde a un 53.3% de la población estudiada que mostraba algún tipo de tumor. La edad media de aparición de CCR fue de 53 ± 0.2 años.

A continuación se muestran las localizaciones de los distintos tumores. (Tabla 7 y Figura 34).

Un 12% de todos los tumores encontrados se encuadraron bajo el epígrafe de "otros" que se representan en la figura 35.

La segunda localización en frecuencia fue la endometrial que, con 16 casos registrados, afectaba al 5.9% de mujeres de la muestra, lo que implica un 12.4% de los tumores.

El cáncer de mama corresponde a un 4.7% de todos los tumores diagnosticados en las familias del estudio, correspondiendo a un 2.2% de la muestra, todos ellos pertenecientes a la misma familia.

En 15 pacientes se diagnosticaron tumores múltiples, lo que supone un 14.01%, con predominancia significativa del sexo femenino (60% vs 40% en los varones; $p < 0,001$) (Figura 36).

El número de tumores hallados en cada uno de estos pacientes varió de 2 a 5. En 10 pacientes se diagnosticaron 2 tumores, tres cánceres en otros 3, se localizó a un paciente con 4 tumores y, finalmente, otro desarrolló 5 tumores en 10 años. En todos los casos de tumores metacrónicos, uno de éstos era o un tumor CCR o de endometrio, excepto en dos casos cuyas asociaciones fueron melanoma, epiteloma y próstata y, en otro paciente, dos tumores de vejiga. Los datos se reflejan en la tabla 8 y en la figura 37.

La inestabilidad de los microsatélites se analizó en todos los pacientes guía y su resultado fue siempre de MSI-H. En una de las familias, la número 1, donde se encontraron gran proporción de tumores metacrónicos y sincrónicos, colorrectales y extracolónicos, se analizó la presencia de MSI con el fin de determinar la posible relación existente entre estos dos parámetros. En conjunto se analizaron tres tumores primarios (CCR de lado izquierdo, endometrio y recto), 3 tumores sincrónicos (mama, vejiga y uréter), tres tumores metacrónicos

(colon derecho, mama y endometrio) y dos recurrencias (colon y recto)

Todos los tumores CCR exhibieron MSI-H cualquiera que fuera el panel de microsatélites utilizado y su estatus resultó independiente de su localización y de si éstos eran primarios o metacrónicos. El único tumor de mama metacrónico analizado fue MSI-H. También los tumores sincrónicos de vejiga y uréter mostraron MSI-H, en un 63.7% y 45.5% de inestabilidad respectivamente.

Es de notar que ambos tumores endometriales presentaron MSI-L. El primario mostró inestabilidad en un 25% (3 de 12 marcadores) así como el metacrónico, que mostró inestabilidad exclusivamente en 1 de los 5 microsatélites testados (no se pudo testar el panel adicional por la escasa cantidad de ADN que se pudo extraer del bloque parafinado). El tumor de colon primario y su recurrencia eran MSI-H.

En la tabla 9 se resume el estatus de inestabilidad presente en cada uno de los tumores estudiados.

No se encontró pérdida de heterocigosidad ni en el gen *APC/MCC* ni en *DCC* de ninguno de los tumores. Sólo reveló LOH el microsatélite intragénico de TP53 del cáncer primario de colon izquierdo del paciente número 2, quien no presentó mutaciones adicionales en los exones 5-8 del mismo gen. Del mismo modo, no se encontró mutaciones en el codón 12 de *k-ras* en ninguno de los tumores. (Figura 38).

La investigación genética en busca de posibles mutaciones se limitó al gen *MSH2* de los pacientes guía de todas las familias, apareciendo resultado positivo en sólo 5 de ellas. Se detectaron un total de 101 tumores en estas 5 familias, de los que el CCR era el

tumor más frecuente, con un afectación del 51.4% (52 casos). El segundo tumor en frecuencia fue el de endometrio, correspondiente al 8.9% de los tumores malignos. El cáncer de mama representó el 5.9% de los tumores. La siguiente tabla (Tabla 10) muestra el espectro tumoral de las familias con la mutación del gen *MSH2*.

La figura 39 representa el espectro tumoral en las familias con la mutación encontrada.

En el análisis electroforético de este gen se encontró una banda polimórfica en las amplificaciones del exón 13 de 5 pacientes guía, lo que llevó a un análisis más detallado de estas familias. En la siguiente figura (Fig. 40) se muestra un gel SSPC representativo de una de estas familias mostrando la banda de migración aberrante.

Esta región exonal se amplificó utilizando iniciadores: *MSH2*-1:5'-CGCGATTAATCATCAGTG-3' y *MSH2*-2:5'-GGACAGAGACATACATTTCTATC-3'.

Este mismo patrón se encontró en los pacientes guía de las 5 familias. Después de la secuenciación directa de los productos de amplificación procedentes de estos pacientes guía, se observó la presencia de un nucleótido de sustitución, reemplazando una Timidina por una Guanina en el codón 688 del exón 13 de *MSH2*. Esta transversión da lugar a un resultado predecible con la sustitución no-conservadora de metionina reemplazada por arginina: M688R. (Figura 41)

El cribado para la mutación M688R mediante PCR-RFLP se llevó a cabo en los 188 miembros de las 5 familias que aceptaron participar en el estudio. Un total de 37 familiares (19.68%), habían heredado la mutación entre los cuales, 18 individuos habían desarrollado tumores malignos, mientras 19 portadores de la

mutación no presentaban cánceres en el momento del estudio. Sólo un paciente con diagnóstico de retinoblastoma no presentaba la mutación ($p < 0.001$). La proporción de familiares sin tumores entre los no portadores de mutación fue del 88.8% (150 de 169). Los datos se reflejan en la tabla 11.

El ADN tumoral de 17 casos de cáncer de colon, endometrio, vejiga, mama y recto se analizó también en busca de la mutación T→G (M688R) mediante PCR-RFLP. Después de asegurar que las muestras tumorales contenían cantidades insignificantes de tejido no tumoral, se detectó en 13 de ellos la pérdida del alelo *wild-type*, mientras que 4 no mostraron pérdida de heterocigosidad. Este hecho también se confirmó mediante la secuenciación directa de los productos de la PCR obtenida de la muestra tumoral (Figura 42 y 43).

El estudio de esta mutación en 30 sujetos con cáncer colorrectal clasificado como esporádico en base a su historia familiar, así como de 70 muestras anónimas de ADN procedente de donantes de sangre, resultó negativa en todos los casos.

Una vez concluido el estudio, siguieron apareciendo nuevos tumores en estas familias tales como dos CCR, un epiteloma, un cáncer gástrico, uno de próstata y un carcinoide de intestino delgado.

De igual manera, en aquellas familias en las que no se encontró mutación en *MSH2* se analizó posteriormente *MHL1* sin que se haya encontrado ninguna mutación hasta el momento.

DISCUSIÓN

El Síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC) es una enfermedad hereditaria predisponente a diferentes tipos de cáncer, que se transmite de forma autonómica dominante con una penetrancia del 70-90%^{4,179}. Clínicamente se define mediante los Criterios de Ámsterdam propuestos por el Grupo de Colaboración Internacional^{172,177}, posteriormente modificados en Coimbra en 1998¹⁵⁰. La presencia de CCR es el hallazgo fundamental en estas familias^{109,113,179} que, de manera característica, suele aparecer en individuos jóvenes, con tumores localizados preferentemente en el colon derecho y con alta incidencia de cánceres sincrónicos y metacrónicos; todos estos datos permiten definir el Síndrome de Lynch tipo I¹⁷⁹. La presencia de tumores de localización extracolónica, principalmente de endometrio, estómago, ovario, hígado, intestino delgado y tracto urinario define al Síndrome de Lynch tipo II¹⁷⁵. De éstos, el cáncer de endometrio es el más común^{4,5,192}, apareciendo 15 años antes que en la población general¹⁰⁸.

Genéticamente las mutaciones en los genes de reparación de los errores de la replicación del ADN, o sistema mismatch repair, son las responsables de la afectación de estas familias, localizándose en los genes *MLH1* y *MSH2* la mayor parte de estas mutaciones hasta ahora descritas^{30,109}.

Pasamos a discutir, a continuación, los diferentes aspectos de la presente memoria.

I.- DISCUSIÓN DE LA TÉCNICA EMPLEADA

a) Sobre la obtención de las muestras

Para el estudio del ADN tumoral se obtuvieron muestras del tumor, de mucosa sana situada a 5 cm del mismo y de mucosa lejana a más de 10 cm de la lesión, asimismo se obtuvieron muestras, cuando existían, de pólipos adyacentes en la pieza y/o de lesiones metastásicas. El ADN de los tumores permitió saber, al confrontarlo con la genética heredada, los cambios ocurridos en la transformación neoplásica. Este esquema también se siguió para tumores de otras localizaciones. La mucosa sana cercana nos permitía conocer el origen monoclonal o policlonal del tumor y la mucosa lejana se comparaba con el ADN de los linfocitos, que se usó como “gold estándar” para analizar la secuencia heredada por el individuo.

Existe una tendencia en algunos tumores, especialmente en los colorrectales, a contener una proporción de células no malignas. Esta fracción de células sanas es realmente útil por el hecho de que los alelos normales presentes en el ADN constitucional se encuentran también en el ADN tumoral, que puede exhibir inestabilidad de microsatélites y permite la confirmación del correcto apareamiento entre el ADN tumoral y el sano y nos indica la presencia de nuevos alelos en el primero, Esta probable contaminación del tejido tumoral con células sanas se tuvo en cuenta al tomar las muestras de la parte macroscópicamente más tumoral, como describe Cawkwell²⁷, por la importancia que este hecho puede tener en la valoración de los resultados. El propio Cawkwell²⁸, en un estudio posterior, intenta mejorar en la búsqueda, no sólo diseccionando la zona más tumoral, sino incluso con tinción

previa. En cuanto a la mucosa sana, ésta fue resecada de la zona más alejada posible del tumor con objeto de evitar la contaminación con células neoplásicas.

Para obtención de ADN que permitiera estudiar la dotación genética heredada por los individuos con vistas a buscar posibles mutaciones, se eligió la extracción de ADN de linfocitos de sangre periférica obtenida por venopunción. La razón de esta elección se basa en que el rendimiento de extracción del ADN de los linfocitos es muy alto y no es técnicamente complejo, además la venopunción no causa un dolor importante ni incomodidad al paciente, con lo que se disminuye la posibilidad de rechazo al estudio por temor a la prueba. Se valoraron otras fuentes de ADN, como biopsias de mucosa colónica obtenida por colonoscopia, pero dado lo incómodo de la exploración se estimó que el grado de rechazo sería mayor.

En algunos casos, como pacientes ya intervenidos antes del inicio del estudio o residentes en otros lugares, el ADN se obtuvo a partir de muestras parafinadas. En los pacientes ya fallecidos, ante la imposibilidad de obtener sangre para el estudio de su dotación genética heredada, las muestras de mucosa sana de los bloques parafinados sirvieron como fuente para la extracción de ADN, con el fin de demostrar la presencia o no de mutación.

Las diversas fuentes de ADN permitieron, además de la realización del presente trabajo, almacenar el excedente de material genético por congelación para futuros estudios en función del progresivo conocimiento del síndrome.

Se han descrito numerosas técnicas, como la descrita por Sambroock¹⁵² para la extracción del ADN a partir de tejido fresco y se han adaptado a los tejidos embebidos en parafina. En cuanto a la técnica de extracción del ADN genómico se utilizó la propuesta por Blin y Stafford¹⁶.

b) Sobre la reacción de la cadena de la Polimerasa o PCR

La elección como técnica de amplificación de microsatélites mediante PCR, frente al uso convencional de digestión con enzimas de restricción y Southern Blot para la detección de fragmentos de restricción polimórficos (RFLP) se justifica por²⁷:

- i. La necesidad por parte de Southern Blot de grandes cantidades de ADN de alto peso molecular, lo que limita el análisis de piezas de biopsias, normalmente pequeñas, y reduce el trabajo al tejido fresco, restringiendo el estudio retrospectivo.
- ii. Precisa de mayor tiempo para su realización, a veces una semana.
- iii. Algunos RFLP están limitados por bajos grados de polimorfismos.
- iv. La técnica es dependiente del uso de enzimas de restricción, lo que deriva en casos de digestión incompleta y alto grado de muestras no informadas.
- v. Uso de radioisótopos que precisa de recursos específicos.

En cuanto a la utilización de los *primers* u oligonucleótidos destacamos que, para poder estudiar con la técnica de PCR un determinado fragmento de ADN, debe conocerse por lo menos la secuencia de los dos extremos del mismo. Una vez conocidas dichas secuencias nucleotídicas, se sintetizan los 2 *primers*, uno para cada flanco y hebra, de modo que se unan al ADN, formándose un fragmento de doble cadena en cada hebra. A partir de aquí la enzima Taq polimerasa puede sintetizar las cadenas complementarias en dirección 5'• 3'. Se calcula que un oligonucleótido formado por 15-20 pares de bases tiene una elevada probabilidad de unirse a un solo lugar del genoma humano.

Para el diseño de los oligonucleótidos se debe tener en cuenta:

- a) Seleccionar secuencias en las que no abunden repeticiones de bases, ya que contribuyen a la inespecificidad de la amplificación.
- b) Deben evitarse secuencias que puedan formar estructuras secundarias por sí mismas, ya que dificultan la unión de los propios *primers* con el ADN inicial.
- c) Evitar que los dos *primers* tengan complementariedad entre ellos, lo que comportaría una autoamplificación.
- d) Comprobar en un banco de datos que las secuencias seleccionadas no están en otro lugar del genoma conocido, impidiendo así amplificar otras regiones no deseadas.

Si los *primers* no pueden tener 100% de complementariedad con el ADN molde en toda su extensión, sí deben tenerla con el extremo 3', por ser éste el lugar de unión de la Taq polimerasa.

La concentración de Cl_2Mg en la reacción de la PCR es muy importante ya que afecta seriamente a la especificidad de la amplificación. Habitualmente se utiliza una concentración de 1.5 mM (concentración final). Un exceso de ion Mg produce amplificaciones inespecíficas y una concentración insuficiente da lugar a un menor rendimiento. La cantidad de ion Mg debe ir relacionada con la concentración de los 4 dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Si se aumenta la concentración de dNTP por encima de 200 μM éstos quelan parte del magnesio, por lo que hay que aumentar la concentración de éste último. Los dNTPs se utilizan a una concentración final de 100 μM .

La lectura en gel de electroforesis vertical se eligió, frente a la horizontal, por su más fácil ejecución, menor duración del proceso (2 horas y media frente a 3 y media), la necesidad de menor cantidad de tampones y de ningún reactivo adicional.

Se utilizó la detección de los productos de la amplificación con bromuro de etidio por ser el método de visualización más simple y por no ser un método radiactivo.

c) Sobre la secuenciación

Básicamente, existen dos métodos que permiten determinar las secuencias nucleotídicas, el químico desarrollado por Maxam y Gilbert en 1977, y el enzimático, o método del dideoxinucleótido, descrito por Sanger y colaboradores en 1981⁴⁸.

El método químico utiliza el desdoblamiento específico del ADN por medio de ciertas sustancias químicas. Se utilizan cuatro compuestos químicos diferentes produciendo un juego de fragmentos de ADN de longitudes diferentes, determinados por las posiciones de los nucleótidos en el ADN que ha sido partido. El fragmento del ADN que será secuenciado se procesa para obtener una cadena simple marcada con un isótopo radiactivo en 5'. Esta cadena se trata con cada uno de los 4 reactivos y las 4 mezclas de las reacciones, una para cada una de las bases, se corren en calles separadas de electroforesis en gel de poliacrilamida, representando a cada una de las 4 bases G, A, T o C, siendo el fragmento más pequeño el que migre más lejos. La secuencia se lee en la dirección opuesta a la migración, obteniéndose la secuencia en dirección 5' • 3'¹³².

El método enzimático es el método de secuenciación más utilizado en la actualidad y el que se empleó en el presente trabajo. Se basa en el principio de que la síntesis del ADN se termina cuando en lugar de un desoxinucleótido normal (dNTP) se utiliza un didesoxinucleótido (ddNTP), que difiere por la ausencia de un grupo hidroxilo en la posición del carbono 3', haciendo imposible la unión con un nuevo nucleótido. El ADN a secuenciar debe ser de cadena simple y la síntesis se inicia con un cebador o *primer* y uno de los cuatro ddNTP marcado con ³²P en el grupo fosfato. Cada vez que en la secuencia aparezca el nucleótido en cuestión, el didesoxinucleótido correspondiente ocasionará la terminación de la síntesis de la nueva cadena de ADN. Las cuatro

reacciones por separado darán lugar a un juego de fragmentos de tamaños definidos, de acuerdo con las posiciones de los nucleótidos, en donde se ha terminado la síntesis del ADN. Los fragmentos se separan de acuerdo con el tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida como en el método químico. La secuencia del gel se lee en la dirección desde los fragmentos más pequeños hacia los más grandes, para determinar la secuencia nucleotídica en dirección 5' • 3'¹³².

A la hora de plantear la secuenciación del ADN, nos decidimos por el método enzimático por ser menos grosero, no precisar de material radiactivo, ni de geles de gran tamaño, indispensables en el método químico, lo que dificulta la secuenciación y la lectura posterior. La secuenciación del ADN a gran escala requiere de procedimientos automatizados, basados en la marcación del ADN con fluorescencia, y sistema de detección adecuados. Las marcas fluorescentes generalmente utilizadas son los fluoróforos, moléculas que emiten un color fluorescente distintivo cuando se exponen a la luz UV de una longitud de onda específica. Cada una de las 4 bases se puede marcar de una forma distinta. Este proceso puede realizarse en el método enzimático, no en el químico, aumentando la fiabilidad y la rapidez del mismo.

d) Sobre la inestabilidad de los microsatélites o MSI

Con el fin de estandarizar los resultados sobre la inestabilidad de los microsatélites, se utilizó el panel recomendado por el Grupo Internacional sobre la inestabilidad

de los microsatélites¹⁸. Sin embargo, las recomendaciones del grupo de trabajo concerniente a su aplicación a los tumores no CCR son inciertas. Por esta razón, también se analizó la MSI con un panel adicional con el fin de corroborar los resultados.

La MSI-H o inestabilidad de alto grado caracteriza un fenotipo único, clínico y patológico, que se identifica con el síndrome de HNPCC, mientras que la inestabilidad de bajo grado (MSI-L) y la estabilidad (MSS) se consideran fenotipos similares sin implicaciones clínicas^{12,18}.

En el presente trabajo se consideró que la MSI era de alto grado cuando más del 40% de los marcadores mostraban inestabilidad, de bajo grado cuando el porcentaje era menor de este 40%, y se consideraba MSS cuando los marcadores no mostraban inestabilidad. Otros grupos, como el de Vasconcelo¹⁷¹, consideran fenotipo MSI-H cuando el porcentaje de inestabilidad es superior al 30%. Creemos que nuestra elección se justifica por un aumento de la sensibilidad.

II.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

En el presente estudio, el trabajo se inició a partir de la observación de pacientes guías que contaban entre sus antecedentes con un número importante de miembros afectados de CCR o de otro tipo de tumores, datos que llevaron a la realización de un exhaustivo árbol genealógico hasta el primer antecesor conocido.

Tras la identificación de las familias, se pasó a determinar la presencia de inestabilidad de microsatélites en las muestras tumorales de los miembros en los que el árbol genealógico se había mostrado altamente sospechoso. El resultado fue positivo en cada una de las muestras, hallazgo que no se dio en ninguno de los tumores de familias con baja probabilidad de Síndrome de Lynch.

a) Sobre la deriva genética

Las poblaciones insulares tienen una historia demográfica de probable aislamiento desde su fundación, alrededor del año 1500, hasta bien entrado el siglo XX, lo que permite especular con que haya existido una deriva genética considerable a lo largo de unas 20 generaciones. Esta deriva genética reduciría la variabilidad alélica previa a su más reciente expansión, existiendo además un mayor grado de consanguinidad debido al bajo número de fundadores. Todo lo anteriormente expuesto hace muy interesante esta población para estudios genéticos de síndromes complejos como el de Lynch⁷⁴.

Hardy y Weinberg⁷¹ en 1908, calcularon matemáticamente las frecuencias de los genes en las poblaciones en lo que se conoce como Ley del equilibrio de Hardy-Weinberg, demostrando que la herencia en sí misma no produce cambios en las frecuencias alélicas ni genotípicas. Básicamente, esta ley establece que en una población idealizada, en la que no actúan fuerzas para el cambio, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación⁵⁰.

Se conocen diferentes procesos que producirían cambios en las condiciones de equilibrio y que, en definitiva, producirán las variaciones de las frecuencias génicas que se reconocen en el proceso evolutivo⁵¹. Pueden clasificarse en:

1. Procesos sistemáticos:

- Mutación
- Recombinación
- Migración
- Selección natural

2. Procesos dispersivos

- Deriva genética

Aunque pueden actuar conjuntamente, los procesos sistemáticos actúan en poblaciones grandes, mientras que los dispersivos lo hacen en poblaciones pequeñas.

En cualquier caso, el equilibrio de Hardy-Weinberg se basa en apareamientos al azar, sin embargo en determinadas ocasiones esto no se cumple, es el caso de la existencia, por ejemplo, de una barrera geográfica que aísla individuos que se verían forzados a elegir sus parejas sexuales dentro del grupo y no con otros miembros de la población que, llevado a su caso más extremo en poblaciones muy pequeñas, produce endogamia,

En las poblaciones grandes la muestra de genes que pasa a la generación siguiente es más o menos constante, pero en las pequeñas la muestra puede no ser representativa de la generalidad de la población, lo que originaría un error de muestreo y la desviación de las

frecuencias génicas en cualquier sentido, por lo que tenderá a fijarse aleatoriamente alguno de los alelos. Estos efectos de muestreo producidos al azar se denominan deriva genética. Esta deriva genética es, por tanto, un factor que disminuye la variación genética existente en las poblaciones y la magnitud de su efecto es inversamente proporcional al tamaño de la población de forma que, cuanto más pequeña, mayor es su efecto.

Una situación favorable para la actuación de la deriva genética es el *efecto fundador*. La colonización de nuevos territorios, por ejemplo islas, se llevará a cabo por unos cuantos individuos procedentes de una población grande continental. Los pocos individuos que comienzan la nueva colonia representan una muestra aleatoria de los genes de la población original, conduciendo a una divergencia de las frecuencias alélicas y, finalmente, de los alelos respecto a la población original por efecto de la deriva genética⁵¹.

Como podemos apreciar, muchas de las características descritas anteriormente se dan en el grupo de población objeto de nuestro estudio, originario del Valle de La Orotava. En este grupo se da un doble aislamiento, por un lado estas poblaciones insulares tienen una historia demográfica de probable aislamiento desde su fundación, alrededor del año 1500 cuando las islas fueron colonizadas hasta bien entrado el siglo XX y, por otro lado, los valles son siempre zonas geográficamente aisladas. La zona del valle de La Orotava geográficamente debió suponer grandes dificultades para sus pobladores a la hora de un intercambio genético, lo que permite especular con que haya existido una

deriva genética considerable a lo largo de unas 20 generaciones. Esta deriva genética reduciría la variabilidad alélica previa a su más reciente expansión, existiendo, además, un mayor grado de consanguinidad debido al bajo número de fundadores. Por otro lado, al ser una población bastante estable en la que los factores externos han actuado de igual manera sobre la población, muestran un escenario ideal para valorar la expresión génica del síndrome en su versión más “pura”. Es fácil comprender que las migraciones, recombinaciones, climas, hábitos de alimentación y demás factores medioambientales pueden modificar, de alguna manera, la expresión de los genes, por lo que el estudio de síndromes hereditarios en grandes zonas expuestas es dificultoso⁵¹. Al mantener estas condiciones iguales durante generaciones, la expresión del gen se manifiesta libre de otras interacciones.

b) Sobre la utilidad del árbol genealógico

Durante muchos años el poco conocimiento del síndrome, así como la escasa o nula accesibilidad a las pruebas genéticas, hizo del árbol genealógico el único arma para la detección de familias con Síndrome de Lynch. La irrupción con extraordinaria fuerza de la genética en la medicina en general y de los síndromes hereditarios en particular, en el contexto de una medicina cada vez más tecnificada, podría llegar a poner en duda la utilidad de la historia clínica, representada aquí por el árbol genealógico.

Por ello, nos propusimos valorar la correlación entre el estudio familiar exhaustivo, basado en un árbol genealógico,

con el estudio genético, evaluando la posibilidad de padecer la enfermedad. Nuestros resultados demuestran que todos los tumores de las familias sospechosas según su árbol genealógico, manifiestan una evidente inestabilidad de microsatélites, lo que orienta hacia una carcinogénesis mediada por la mutación de genes reparadores de la replicación del ADN (mismatch repair), mientras que todos los tumores de las familias no sospechosas, mostraron MSS.

Por todo lo anterior, se puede establecer que el árbol genealógico es un arma extraordinariamente eficaz para catalogar a una familia como sospecha de padecer Síndrome de Lynch, en ausencia de un test genético que permita un estudio más profundo del paciente¹¹⁸. De esta manera, se pueden identificar aquellas familias que se beneficiarían de un programa intensivo de vigilancia y estrategias de reducción de riesgo de cáncer, siguiendo las recomendaciones del Grupo Internacional de Colaboración⁷⁶, con vistas a minimizar el riesgo de desarrollar tumores relacionados con el síndrome en el futuro. Finalmente, el presente estudio refuerza la importancia de la historia clínica como instrumento fundamental para la correcta valoración del paciente, incluso en el seno de una medicina cada vez más tecnificada. Las figuras 44, 45 y 46 ponen de manifiesto la importancia de la confección de los árboles genealógicos para el correcto diagnóstico de las familias.

c) Sobre la definición de Síndrome de Lynch

No existe acuerdo sobre qué definición debe usarse para identificar este síndrome. En opinión de Watson¹⁹², la

preferencia depende del observador. La primera definición se basa en las cuestiones clínicas que rodean al síndrome, que incluyen la identificación de familias sindrómicas y el diseño de programas de prevención de los tumores. La segunda definición se apoya en parámetros biológicos, por ejemplo el interés en clarificar cómo la deficiencia en la reparación de los errores de replicación se desarrolla en diferentes tejidos y cómo se relaciona con la carcinogénesis. Ambas cuestiones son importantes, pero el interés en definir el espectro tumoral, surge principalmente de sus implicaciones clínicas que ayudan a establecer qué recomendaciones, en la prevención del cáncer, deben hacerse a los pacientes con el Síndrome de Lynch que difieran de las de la población en general.

En nuestro estudio se tuvieron en cuenta ambas definiciones al iniciarse, primeramente, sobre la sospecha clínica de una especial agregación tumoral en determinadas familias y, posteriormente, al comprobar molecularmente la presencia de una alteración de los genes mismatch y una mutación en el gen *MSH2* de un área geográfica concreta.

d) Sobre el grado de aceptación

A todos los individuos, miembros de las familias objeto del estudio, se les ofreció la oportunidad de participar, aceptando 321 de los 439, lo que significa una compliance del 73.12%, con una participación desigual entre las diferentes familias.

El primer informe, publicado en 1999 por Lerman y colaboradores⁹⁶, sobre la aceptación de los tests genéticos

encontró un bajo nivel de conformidad. Se trata de un estudio publicado en 1999 sobre 208 miembros, pertenecientes a 4 familias, a los que se contactó vía telefónica. Sólo el 43% aceptó la realización de las pruebas. Los motivos aducidos para la negación fueron: escasa información y síntomas depresivos asociados al diagnóstico del Síndrome de Lynch, especialmente entre las mujeres.

Posteriormente, en el año 2000, Aktan-Collan y colaboradores⁶ presentan en Finlandia, una aceptación del 75% de todos los miembros de las familias de alto riesgo que completaron el seguimiento.

La principal diferencia entre los estudios de Finlandia y Estados Unidos puede residir en el método de aconsejar, mientras que en Finlandia se hacía mediante una entrevista personal, en EEUU el método seguido era una llamada telefónica.

Nuestro dato de una aceptación del 73% nos parece importante y creemos se debe a varias razones:

- a) A las familias se les reunió para explicarles de forma personal en qué consiste el Síndrome de Lynch, las posibilidades de la familia de ser portadores, el ofrecimiento de realizarles las pruebas genéticas y el seguimiento médico necesario en cada caso.
- b) En dicha reunión informativa se explicó también la posibilidad de medidas preventivas para la detección precoz de tumores, en caso de ser portadores de la enfermedad, y la oportunidad de conocer la posibilidad personal de desarrollarlos.

- c) Nuestras familias provenían de una comunidad pequeña, donde se conocía de una forma natural la predisposición de los miembros de las mismas de desarrollar un tumor.
- d) En todo caso se garantizaba la confidencialidad al entregar de forma individualizada la información.

Probablemente, de todas ellas, el hecho de tratarse de una comunidad pequeña haya sido fundamental. El inicio del estudio en familias que durante generaciones habían visto la desaparición de muchos de sus individuos afectos de cáncer, se difundió entre los familiares, a veces más rápidamente que nuestros propios esfuerzos en localizarlos, y creó entre los diferentes familiares un circuito de retroalimentación positiva que, en algún caso, se vio reforzado cuando algunos individuos que en un principio no habían querido adherirse al estudio, sufrieron o conocieron la aparición de algún tumor, en alguna ocasión con resultados de muerte. En todos los casos, lo reducido del área geográfica propagaba las noticias con gran rapidez y facilitó, a nuestro entender, la aceptación del estudio en porcentajes tan altos.

e) Sobre la frecuencia del síndrome

Es difícil poder establecer la frecuencia del síndrome, dado la multitud de factores que intervienen en su diagnóstico, como la experiencia del investigador, las diferencias geográficas y otras, pero se estima que varía entre el 0.5% y el 5%, lo que la convierte en el factor

hereditario más importante para el desarrollo del cáncer colorrectal¹⁹¹.

Según de la Chapelle²⁹, partiendo de una proporción entre 1-3% de tumores de colon atribuibles al Síndrome de Lynch y a un riesgo acumulado del 5% para presentar un CCR, la incidencia de la población general se situaría entre un 1:2000 y 1:660.

En nuestra base de datos, el 6.2% de los casos presentaban antecedentes familiares de primer y/o segundo grado, de los que un 0.2% se han podido documentar como Síndrome de Lynch. Esta casuística es muy baja respecto a los estudios mencionados previamente y se debe, principalmente, a la inadecuada recogida de datos sobre los antecedentes familiares en todas las historias clínicas. Hay que tener en cuenta que la base de datos abarca un periodo temporal muy amplio e incluye un gran número de años donde el síndrome era poco o nada conocido y donde la recogida de datos no era tan exhaustiva. Por otro lado, confeccionar un fichero de cáncer familiar requiere un gran esfuerzo y dedicación por parte de personal dedicado a este fin, ya que es una labor dificultosa para médicos asistenciales. Estimamos que el número de casos puede ser mayor si se investigan más intensamente a las familias con alta probabilidad de padecerlo. Creemos que, dado que no existe una característica fenotípica de este síndrome, los pacientes no son fácilmente reconocibles; por lo tanto, hasta que no haya una mayor disponibilidad del mapa genético de la enfermedad, consideramos que se deben aplicar los Criterios de Ámsterdam¹⁷⁷ para identificar los posibles casos.

Es conocido que aproximadamente un 4% de todos los carcinomas tienen rasgos compatibles con síndrome de cáncer hereditario, fundamentalmente el cáncer de mama¹²³. El reconocimiento del síndrome es el mayor indicador de riesgo de padecer cáncer colorrectal, por lo que la historia clínica familiar debe ser minuciosamente recogida en todos los pacientes con carcinoma y, una vez detectado el síndrome, indicar el procedimiento adecuado para el diagnóstico precoz¹¹².

Pensamos que pacientes con cáncer de endometrio, tracto urinario, estómago, ovario y mama deben ser interrogados acerca de síntomas de cáncer colorrectal; por otro lado, en pacientes con CCR verificaremos si han tenido alguno de los tumores mencionados, haciendo también estas comprobaciones en sus familiares de primer grado, de manera que cuando aparezca alguna concordancia respecto a la posibilidad de estar ante un síndrome de cáncer hereditario, poner en marcha la construcción de un árbol genealógico completo. Es necesario disponer de un registro familiar y seleccionar candidatos para estudios de ADN y biología molecular en base a detectar genes deletéreos.

f) Sobre el espectro tumoral

El interés en definir el espectro tumoral surge, principalmente, de sus implicaciones clínicas que ayudan a establecer qué recomendaciones deben hacerse, en la prevención del cáncer, a los pacientes con el Síndrome de Lynch que sean diferentes a las de la población general. Pero definir el espectro tumoral como una compilación de

tumores para los que los pacientes con Síndrome de Lynch presentan un alto riesgo, tiene las dificultades metodológicas que supone comparar la incidencia de tumores que se presentan en las familias afectas con la población general.

La principal información sobre el espectro tumoral deriva de estudios retrospectivos de familias con historia significativa, que crean estimaciones erróneas debidas al sesgo de inclusión, al favorecer la inclusión de casos muy graves y, a su vez, los datos recogidos prospectivamente a partir de familias de alto riesgo, pueden estar sesgados por factores familiares, medioambientales y genéticos, y no familiares, como el cribaje del cáncer¹⁹².

En nuestro estudio la valoración del espectro tumoral demostró que era similar al descrito en otras áreas geográficas, tanto en Europa como en Estados Unidos, representando el cáncer colorrectal un 50% de los tumores encontrados^{13,113,179,195}. La principal novedad en relación a dicho espectro tumoral es la aparición de un leiomioma en uno de los familiares que el análisis inmunohistoquímico y genético certificó como asociado al Síndrome de Lynch¹¹⁶.

En nuestra serie, se detectaron un total de 129 tumores de los que el **cáncer colorrectal** era el más frecuente, con un número de 65 casos (50.4%), afectando a 57 pacientes, que corresponde a un 53.3% de la población estudiada que mostraba algún tipo de tumor. Por contra, los datos para la población de la isla de Tenerife muestra que el tumor maligno más frecuente en el hombre es el cáncer de próstata y pulmón, con un 17.07% y 16.21% respectivamente y, en la mujer, el de mama con una frecuencia relativa de 29.57%,

siendo las cifras para el CCR de 9.84% y 11.97% para hombre y mujeres, respectivamente, según datos publicados por la consejería de sanidad de gobierno de Canarias¹⁵⁵ (Fig. 47). Estos datos son sumamente interesantes porque muestran que en nuestra población la influencia genética fue capaz de alterar la normal frecuencia de los tumores en la isla, lo que habla de su penetrancia y su frecuencia en la población estudiada, fruto quizás del efecto fundador que pudo darse en esta comunidad.

No se pudo estudiar la localización de los tumores en el colon en todos los casos, dado la falta de información al respecto en los certificados de defunción. Sin embargo, cuando este dato pudo ser verificado, se comprobó una alta incidencia de tumores en el colon derecho (37%), dato similar a los registrados en otras series¹³, siendo la distribución de los tumores en el colon restante también equivalente¹⁹².

En cuanto al **cáncer de endometrio**, éste fue el segundo en frecuencia en total coincidencia con trabajos anteriores^{108,189}. En nuestra casuística, el 12.4% de los tumores eran de este tipo, afectando a un 5.9% de mujeres de la muestra. Nuevamente este dato es mayor que el publicado para la población de la isla, con un registro para este tipo de tumor de 5.3%¹⁵⁵.

La incidencia del **cáncer de mama** en las familias estudiadas fue mayor que en otras series¹⁷⁸ (5% vs 3%), aunque podría tratarse de una sobreestimación dado que todos los tumores de mama aparecieron en la misma familia (familia nº 1).

Existen discrepancias sobre su inclusión como tumor asociado a este síndrome. En 2001, Scout y colaboradores¹⁵⁴ informaron de una remarcable alta incidencia de cáncer de mama en los miembros de las familias con HNPCC, especialmente en las portadoras de la mutación *MLH1* (Tasa de incidencia estandarizada de 14.77, IC del 95%) y en los grupos mutación-negativos (TIE: 18.3, IC del 95%). No se halló un aumento de la incidencia en los portadores de la mutación *MSH2* (TIE: 2.02, IC del 95%). Hasta entonces, estudios previos como los realizados por Watson y Lynch¹⁸⁸ en 1993, informaban de incidencias mucho menores de cáncer de mama en HNPCC, identificando sólo 19 casos en el seno de 23 familias. Otro estudio de Aarnio y colaboradores⁵ en 1999, sobre portadores de mutación MMR, informó de una tasa de incidencia estandarizada de 1.4 con un intervalo de confianza del 95%.

Estas contradicciones llevaron a Vasen y colaboradores¹⁷⁸ en 2001, a evaluar el riesgo de presentar cáncer de mama en las familias HNPCC alemanas. Los resultados arrojaron que sólo 4 de los 187 portadores de la mutación en *MLH1* y 3 de los 141 con mutación en *MSH2*, desarrollaron cáncer de mama. La tasa observada / esperada (O/E) en ambas poblaciones fue de 0.6 con IC del 95%. La media de edad al diagnóstico fue de 46 años (32-59 años). Este estudio sugiere que el riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama no está aumentado en el HNPCC, aunque pueden presentar una edad de aparición más temprana. Una posible explicación para esta precocidad

de los cánceres de mama en las familias HNPCC es que, al igual que el resto de la población, los primeros estadios de la enfermedad se presentan alrededor de los 40 años, pero la presencia de defectos en los genes MMR, les lleva a una acumulación de mutaciones en los genes implicados en la progresión del cáncer de mama, lo que acelera el desarrollo tumoral¹⁷⁸.

Es sabido que existen dos genes responsables del desarrollo de los tumores de mama, el *BRCA*₁¹²⁰, localizado en el cromosoma 17, y el *BRCA*₂¹⁹⁹ en el cromosoma 13. No obstante, no se debe olvidar que, además de estos genes, existen otros factores genéticos que predisponen al cáncer de mama, como las mutaciones en el gen *p53* o en el gen *ATM*¹²⁴, así como la adquisición del fenotipo de inestabilidad genética, donde se incluye el Síndrome de Lynch tipo II⁵⁷.

A favor de la inclusión de este tipo de cáncer en el espectro tumoral del síndrome se encuentran Risinger¹⁴⁸ y González-Aguilera⁶⁷, quienes se basan en la presencia de MSI en el gen *MLH1* de los miembros de las familias HNPCC.

Es también de interés la baja incidencia de **cáncer gástrico** entre las familias del presente trabajo, un 0.01%, en comparación con las primeras series publicadas al respecto¹³, donde el cáncer gástrico era el segundo en frecuencia tras el CCR. Sin embargo, las cifras aquí presentadas están más de acuerdo con estudios más actuales, que muestran que este tipo de tumor no es tan prevalente entre las familias afectas de Síndrome de Lynch¹⁷⁹.

Respecto a la presencia de un **retinoblastoma** en nuestra serie, decir que se pudo demostrar, a través del análisis genético de la muestra remitida al laboratorio que confirmó la ausencia de mutación, que dicho tumor no se podía incluir entre los asociados al síndrome. Como es sabido, el desarrollo de tumores de esta estirpe se ha asociado a la presencia de mutaciones en el gen *RB1* que a la mutación en uno de los genes MMR¹²⁴.

En nuestra serie podemos observar como los tumores más frecuentes asociados al síndrome son el CCR, el endometrio y la mama, con diferencias apreciables respecto a la población de Tenerife¹⁵⁵. (Figura 48).

Todas las cifras anteriores implican que la deriva genética y la consanguinidad, junto al aislamiento de la población del estudio, no ha alterado sustancialmente el espectro tumoral de este síndrome que, en general, es similar al de otras poblaciones descritas en la literatura. Como único dato significativo mencionar una muy baja frecuencia de cáncer gástrico que confirma la tendencia de estos tumores en las sociedades europeas occidentales.

g) Sobre el leiomioma

En la relación de tumores identificados en las familias afectas del síndrome aparece, por primera vez descrito en la literatura, la presencia de un leiomioma asociado a HNPCC¹¹⁶. Hasta ese momento, la aparición de sarcomas en las familias Lynch sólo ha sido descrita excepcionalmente¹¹³. Nuestra paciente, en quien convergían antecedentes familiares de Síndrome de Lynch, tanto por

parte del abuelo paterno como de la abuela paterna, presentó un leiomioma, lo que amplía las posibilidades de presentación de otros tumores extracolónicos propios de este síndrome.

Cuando la paciente fue diagnosticada se conocían sus antecedentes por parte de la abuela paterna (Figura 49). Dada la agresividad del tumor y la edad del diagnóstico se realizó una historia y árbol genealógico más detallados, lo que permitió descubrir los antecedentes de la familia del abuelo paterno y filiarlos como Síndrome de Lynch (Figura 50). Los resultados preliminares del análisis de los tumores de ambas ramas familiares mostraron una alta inestabilidad de microsatélites, lo cual confirma que ambas familias eran portadoras del síndrome.

Estos antecedentes, unido a la temprana edad de aparición del tumor en la paciente, permitían asociar el caso al Síndrome de Lynch descartando la posibilidad de que se tratara de un caso esporádico de leiomioma en una familia portadora del síndrome. Estos datos, aportados por el árbol genealógico al principio del estudio, se vieron confirmados al final del mismo cuando, identificada la mutación causante, se comprobó que la paciente era portadora heterocigoto de la mutación y que el tumor presentaba una pérdida del alelo normal restante, mostrando una homocigosis del alelo mutado.

La revisión de la literatura nos permite afirmar que la asociación de un leiomioma a un Síndrome de Lynch no ha sido informada. Joseph-Reinete y colaboradores⁸⁴ describieron la asociación de un sarcoma gástrico asociado al

síndrome, sin embargo en este caso el análisis inmunohistoquímico de actina y desmina fue negativo. Por el contrario, en nuestro paciente ambos análisis fueron positivos, lo cual indica, de forma clara, su origen muscular. (Figuras 51 y 52).

El conocimiento actual de la genética molecular de los sarcomas de partes blandas, pone de manifiesto que las alteraciones más frecuentes involucran a genes supresores de tumor y, en menor medida, a algunos oncogenes. Así, en los leiomiomas, se han descrito cambios en la expresión y pérdida homocigótica (pérdidas bialélicas) del gen RB1¹⁶⁰. Además la pérdida de una copia del cromosoma 13 en la región de RB1 se ha encontrado en el 35% de sarcomas¹⁶⁰. También se han descrito pérdidas del cromosoma 17 asociadas a la región de p53⁹⁴, así como alteraciones del gen MDM2¹³³. En cuanto a los oncogenes, se ha demostrado la activación de K-ras en algunos leiomiomas⁶³. Por el contrario el análisis de la inestabilidad de microsatélites, anomalía característica de los tumores asociados al Síndrome de Lynch, en estos sarcomas de partes blandas revela una baja frecuencia (2 de 216), indicando que la mutación en los genes reparadores no juega un papel fundamental en el desarrollo de los sarcomas. De hecho, algunos autores como de Wind¹⁹⁶ proponen que la inestabilidad de microsatélites en los sarcomas (rhabdomiomas) es un fenómeno secundario y tardío en la evolución del tumor. Esto podría explicar la escasa presentación de estos tumores en familias portadoras del síndrome¹¹⁶.

h) Sobre la edad del diagnóstico de los tumores

De las diez familias estudiadas, en 107 casos (19.8%) se pudo localizar algún tipo de tumor asociado al Síndrome de Lynch. De éstos, 56 eran hombres y 51 mujeres (52.3% y 47.7%; $p= 0,56$), con una proporción similar a la ratio hombre/mujer de la población tumoral de la isla de Tenerife (57:43)¹⁵⁵ y con una edad media de aparición de los tumores de 48.9 ± 0.14 años (hombres 49.6 ± 0.31 , mujeres 48.6 ± 0.25). La edad media de presentación en el conjunto de la población de Tenerife es de 63.9 años¹⁵⁵. Este dato habla de la gran predisposición de las familias afectas a padecer tumores y, por lo tanto, de la necesidad de su identificación y seguimiento.

Es de notar que el 49.4% de los tumores aparecieron en pacientes menores de 50 años, cuando la tasa específica para todas las localizaciones tumorales en relación a este grupo de edad, tanto para hombres como para mujeres, según datos de la Comunidad Autónoma para la isla de Tenerife en el año 1997, es de 4.39% para los varones y 10.48% para las mujeres¹⁵⁵, lo que totaliza un 14.87% de todos los tumores.

Es también de interés la presencia de tumores en pacientes menores de 20 años: una leucemia en un paciente de 5 años, un retinoblastoma a los 2 años, un cáncer de colon a los 18 años y un tumor del SNC a los 6 años.

La media de edad de aparición de los tumores en las familias estudiadas se encuentran dentro del rango descrito en otras series publicadas por Mecklin¹¹⁴, Vasen¹⁷⁵, Westlake¹⁹⁵ y Benetti¹³, quienes obtienen una media de edad

para los pacientes tumorales de 41, 46, 48 y 56.8 respectivamente. Respecto a los pacientes diagnosticados antes de los 50 años, que en nuestra serie fue del 49.4%, se encuentra entre el 30% publicado por Benetti¹³ y el 70% de Mecklin y colaboradores¹¹⁴.

i) Sobre la MSI en los tumores sincrónicos y metacrónicos.

Es sabido que la mayoría de los tumores colorrectales esporádicos y la Poliposis Familiar Adenomatosa surgen de una carcinogénesis mediada por la vía supresora, que se caracteriza por la presencia de mutaciones en varios genes supresores como *APC*, *MCC*, *DCC*, *SMAD4*, *p53*; oncogenes como *k-ras*, *myc*, etc; y por estabilidad cromosómica⁴⁶. En el presente trabajo, se determinó la presencia o ausencia de pérdida de heterocigosidad en los genes *APC/MCC* y *DCC* y la mutación o no en *k-ras* de los tumores primarios y extracolónicos de una de las familia estudiadas. El resultado fue que, salvo la LOH en un microsatélite intragénico de TP53, en ninguno de los tumores analizados se encontraron datos de carcinogénesis mediada por la vía supresora lo que, junto a la presencia de inestabilidad de microsatélites en dichas muestras, nos hace concluir que la vía para el desarrollo de los tumores en dichas familias es la mutadora.

Los adenocarcinomas colorrectales con MSI-H están asociados significativamente con localización en el lado derecho, pacientes jóvenes y supervivencia prolongada^{167,181} y existen evidencias de que los tumores con MSI-H constituyen una entidad clínica diferente. Sin embargo, se han publicado

pocos informes con criterios estandarizados de MSI en tumores asociados a HNPCC y con resultados dispares.

Dado que, más de un 10% de los pacientes intervenidos de un cáncer colorrectal desarrollan tumores metacrónicos¹⁷⁹ y que los pacientes afectos de HNPCC tienen una incidencia incrementada de tumores colorrectales múltiples, de asociación con pólipos y de presentar tumores malignos extracolónicos^{5,107,131}, nos propusimos analizar la relación entre la inestabilidad de microsatélites y los tumores sincrónicos y metacrónicos relacionados con el Síndrome de Lynch.

Como era necesario un conocimiento clínico exhaustivo, se eligió para el estudio de esta variable una de las familias en la que se daban una serie de condicionantes especialmente favorables, tales como:

- gran proporción de metacrónicos y sincrónicos.
- supervivencia prolongada de los individuos a los diferentes tumores que permitió un seguimiento clínico con el estudio iniciado.
- matrimonios con familias múltiples de muchos hijos que hacían más fiables los resultados.

En la figura 53 se representa el árbol genealógico de la familia donde se realizó el estudio de MSI y se expresan los diferentes tumores diagnosticados en los diversos miembros.

Todos los tumores colorrectales y el de mama fue MSI-H, lo que apoya la idea de un mismo mecanismo de

desarrollo tumoral, por lo que consideramos que este cáncer debe formar parte del espectro tumoral del HNPCC.

Ambos tumores endometriales, tanto el primario como el metacrónico, presentaron MSI-L, con un porcentaje de inestabilidad para los microsatélites estudiados del 25 y el 20% respectivamente. En el caso del tumor de endometrio metacrónico, el tumor primario de colon y su recurrencia pudieron ser catalogados como MSI-H.

Se ha considerado hasta ahora que los tumores endometriales muestran alta frecuencia de inestabilidad en las repeticiones de mono y dinucleótidos, como ocurre en los tumores de colon, y que ambas neoplasias exhiben un fenotipo similar¹³⁵. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que las conclusiones sobre los tumores endometriales se han obtenido en base a casos esporádicos¹⁸. Por otra parte, los CCR con MSI-L y MSS se han considerado que no tienen implicaciones patológicas¹⁸. Nuestros resultados muestran que estas conclusiones no pueden ser generalizadas a los cánceres endometriales hereditarios y sugieren que éstos experimentan MSI como consecuencia de alteraciones en los genes MMR, pero de diferente forma que en los tumores colorrectales, como ocurre en otras alteraciones genéticas¹²¹.

En relación a este hecho, es de notar que, en al menos dos familias HNPCC o HNPCC-like, se han implicado mutaciones en *MSH6* y una alta proporción de pacientes con CCR y con MSI intermedia tienen una mutación germinal en *MSH6*¹²². Wu y colaboradores²⁰¹ estudiaron la relación entre MSI y mutaciones de MMR en 36 pacientes con sospecha de

HNPCC y se les distribuyó en dos grupos respecto a la frecuencia de MSI en un grupo de alta y otro de baja frecuencia. Los hallazgos revelaron que el grupo de tumores MSI-L, 4 de los 18 pacientes (22%) tenían presumiblemente una mutación en *MSH6*. Por tanto, concluyen, que la presencia de MSI-L no debe ser un criterio de exclusión para la detección de mutaciones en los genes MMR.

Los tumores de vejiga y uréter analizados mostraron MSI-H (63.7% y 45.5% de inestabilidad respectivamente). En general, estos tumores raramente exhiben MSI a pesar de que se encuentran asociados al Síndrome de Lynch, pero hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios se han realizado sobre casos esporádicos¹⁰.

Los resultados de nuestro estudio confirman que la inestabilidad de los microsatélites se encuentra presente en todos los tumores que se desarrollan en los pacientes afectos de HNPCC, no sólo en los primarios, sino también en los sincrónicos y metacrónicos y en las recurrencias, independientemente de su localización. Por otra parte, el estadio tumoral o el nivel de diferenciación en los tumores colorrectales no parece afectar al estatus de MSI.

La MSI es un factor predictivo del desarrollo de carcinomas colorrectales múltiples metacrónicos en los sujetos HNPCC, dado que los nuevos tumores se originan por el mismo mecanismo de inactivación del sistema MMR. Más aún, en el caso de los tumores de endometrio, el estatus MSI-L también determina individuos de alto riesgo para la presentación de tumores metacrónicos⁶⁷.

j) Sobre la mutación de *MSH2*

La mutación encontrada no ha sido previamente descrita en asociación con el Síndrome de Lynch. Sin embargo, se pueden aducir diferentes razones por las que considerar esta mutación como origen causal de la enfermedad.

El cambio T>G da lugar a la sustitución de un aminoácido importante, metionina por arginina, es decir, de un aminoácido hidrofóbico y no polar por otro más grande y cargado positivamente. La Met⁶⁸⁸, en esta posición, forma parte de un grupo de 12 aminoácidos conservados en la escala filogenética, desde la levadura hasta el hombre, lo que refleja la importancia de esta región en la proteína. (Figura 54).

La conservación de un aminoácido en una localización específica es un buen indicador de la importancia funcional, y la sustitución por otro aminoácido de un grupo diferente generalmente tiene consecuencias fenotípicas⁵⁴. Esta región, conservada en la escala filogenética del gen *MSH2*, se cree juega un papel en la dimerización y en la actividad ATPasa, en base a su alineamiento con *MutS*¹²⁷. *MutS* forma un dímero estable debido a las fuertes interacciones hidrofóbicas entre los dominios de la ATPasa. Parece probable que la mutación M688R aquí descrita, con la introducción de un residuo grande y cargado positivamente en el dominio, tenga consecuencias estructurales significativas.

Se han descrito otras mutaciones patogénicas en regiones cercanas, tanto en el codón 680 como en el 697, en

la que también existe la sustitución de una Guanidina por Timina que condiciona el cambio de Cisteína por Fenilalanina¹⁹³.

El análisis del *pedigrí* de las cinco familias en las que el paciente guía portaba esta mutación apoya fuertemente el papel causal de este cambio descrito. Todos menos uno de los pacientes con tumor pertenecientes a estas familias presentaron la mutación M688R en su línea germinal. La única excepción fue el paciente de 20 años de edad que desarrolló un retinoblastoma a los dos años. Con dicha excepción, todos los familiares que no eran portadores no presentaron tumores hasta el cierre del estudio.

El papel patogénético de la mutación heredada descrita se refuerza por el hecho de que no se detectó en los CCR esporádicos ni en las muestras de ADN obtenidas de donantes anónimos del banco de sangre usados como controles, demostrando que este cambio no es un polimorfismo frecuente en nuestra población, lo que refuerza la tesis del efecto fundador de una mutación deletérea que afectó, gracias a la deriva genética, a una población muy específica de la isla.

Finalmente, el análisis del haplotipo sugiere que M688R es una mutación fundadora, dado que el mismo haplotipo de enfermedad se ha identificado en las cinco familias con la mutación, pero no en las restantes ni en las del grupo control.

El descubrimiento de esta mutación M688R permite identificar sujetos que se pueden beneficiar de un programa de vigilancia según las recomendaciones del Grupo

Internacional de Colaboración, todo ello facilitado por su distribución en un área geográfica limitada, que permite localizar nuevas familias en la misma región⁷⁸.

k) Sobre los pacientes portadores de mutación sin tumor

Respecto a los 19 familiares portadores de mutación que no tenían tumores, existen varias posibilidades:

- (i) Que aún no hayan alcanzado la edad de riesgo. La media de edad de presentación de tumores en estas familias fue 57.38 años, mientras que la media de los portadores sin tumores es de 33.65 años. Refuerza este dato el que a lo largo del desarrollo del estudio aparecieron tumores en pacientes que al inicio no habían padecido ninguno.
- (ii) La penetrancia del síndrome no es del 100%, lo que hace posible que alguno de los portadores no lleguen nunca a presentar tumores.
- (iii) Desconocemos, en el momento actual, algunos de los mecanismos de regulación génica que pueden afectar a los mismatch repair de forma que, en algunos individuos, la mutación no se manifieste por algún sistema de “bloqueo” no conocido. Actualmente se piensa en el papel que los ARN de interferencia (iARN) puedan jugar en la modulación de la expresión genética.

I) Los ARN de interferencia

La introducción de ARN de doble hebra (dsARN) en una célula u organismo inicia una compleja cascada de eventos, los cuales culminan con la degradación del ARN mensajero (mARN) de secuencia homologa al dsARN originalmente introducido. La primera fase del complejo de señalización está a cargo de una ribonucleasa tipo 3 denominada Dicer, que fragmenta el dsARN en porciones de 21-25 nucleótidos de longitud, los denominados siARN o ARN de interferencia pequeños que inducen la formación de un complejo de proteínas denominado RISC, *RNA-Induced Silencing Complex* que se encarga, a su vez, de degradar el mARN complementario a la secuencia del siARN. Estos eventos se resumen en la siguiente figura⁵⁵ (Fig. 55).

El primer descubrimiento de la importancia de este mecanismo fue realizado por el grupo del Dr. Víctor Ambros en el año de 1993⁸ quienes encontraron un nematodo mutante que presentaba problemas en la expresión de varios genes y se sorprendieron al descubrir que el producto del gen responsable era un RNA de tamaño pequeño que formaba una estructura de asa imperfecta y resultaba en una secuencia de dsARN de 70 nucleótidos. Fue el primer microARN descrito (miARN); en la actualidad se han descubierto más de 350⁹. (Figura 56).

Aunque la función de los miARNs no se conoce totalmente, parecen estar implicados en procesos biológicos cruciales tales como desarrollo, diferenciación, apoptosis y proliferación, regulando la expresión de sus genes diana¹¹. Los miARNs desempeñan su función mediante el

apareamiento imperfecto con sus dianas, los ARN mensajeros transcritos de genes codificantes, regulando su expresión¹⁴⁴. Se piensa que los miARNs interactúan con los mARNs de sus genes diana en sitios específicos induciendo su corte o inhibiendo su traducción¹¹. Por tanto, puede esperarse que la sobre-expresión de los miARNs se asocie a la infra-expresión de sus dianas, lo que podría contribuir al desarrollo de enfermedades humanas.

CONCLUSIONES

- 1.** El árbol genealógico es un arma extraordinariamente eficaz para catalogar a una familia como sospechosa de padecer síndrome de Lynch, en ausencia de un test genético que permita un estudio más profundo del paciente.
- 2.** La edad media de aparición de los tumores en los miembros de las familias afectas fue de 49.2 años, cifras similares a las descritas en otros estudios, y muy por debajo de las publicadas por la Consejería de Sanidad para el conjunto de la Comunidad Autónoma, que se cifra en 63.9 años.
- 3.** En las familias objeto del estudio, el 49.4% de los tumores se diagnosticaron en pacientes menores de 50 años, frente al 14.8% en la Comunidad Autónoma de Canarias.
- 4.** En las familias estudiadas se produce un cambio en la incidencia de los tumores, siendo el carcinoma colorrectal el más frecuente seguido del cáncer de endometrio, a diferencia de la Comunidad Autónoma de Canarias donde los de diagnóstico más frecuentes son los de próstata, pulmón y mama.
- 5.** El espectro tumoral es similar al descrito en otras poblaciones afectas de síndrome de Lynch, tanto de Europa como de Estados Unidos, lo que resalta la importancia que los factores genéticos, frente a los medio-ambientales, tienen en el desarrollo de este síndrome.

- 6.** El estudio ha permitido ampliar el espectro de los tumores asociados al síndrome de Lynch al aportar un caso de leiomiomasarcoma, tumor no descrito hasta el momento en relación con la enfermedad.
- 7.** Los resultados demuestran que se trata de una población de alto riesgo que se beneficiaría de un programa intensivo de vigilancia y de estrategias de reducción de riesgo de cáncer, siguiendo las recomendaciones del Grupo Internacional de Colaboración.
- 8.** La presencia de inestabilidad de los microsatélites en todos los tumores de los pacientes afectados de síndrome de Lynch, unido a la ausencia de pérdida de heterocigosidad en *APC/MCC*, *DCC*, *p53* y *K-ras*, ratifica a la vía mutadora como causante de los tumores en el síndrome.
- 9.** El alto grado de inestabilidad de microsatélites es un factor predictivo del desarrollo de carcinomas colorrectales sincrónicos y/o metacrónicos en sujetos afectados de Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipoideo. Más aún, en los tumores de endometrio, la presencia de inestabilidad de microsatélites de bajo grado se ha mostrado también como factor de alto riesgo.
- 10.** El estudio genético realizado sobre el gen *MSH2* ha permitido el descubrimiento de una nueva mutación en el exón 13 asociada al síndrome no conocida hasta ahora.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993; 260 (5109): 812-816.
2. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res*. 1994; 54 (7): 1645-1648.
3. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med*. 1998; 338 (21): 1481-1487.
4. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, et al. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer*. 1995; 64: 430-433.
5. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer*. 1999; 81 (2): 214-218.
6. Aktan-Collan K, Mecklin JP, Järvinen HJ, et al. Predictive genetic testing for hereditary non-polyposis colorectal cancer: uptake and long-term satisfaction. *Int J Cancer*. 2000; 89: 44-50.
7. Amaldi F, Buongiorno-Nardelli M, Carnevali F, et al. Replicon origins in Chinese hamster cell DNA. II. Reproducibility. *Exp Cell Res*. 1973; 80 (1): 79-87.
8. Ambros V. MicroRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001; 107 (7): 823-826.
9. Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*. 2003; 113 (6): 673-676.

10. Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HR. Microsatellite instability in human solid tumours. *Cancer*. 1998; 82 (10): 1808-1820.
11. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116 (2): 281-297.
12. Baudhuin LM, Burgart LJ, Leontovich O, et al. Use of microsatellite instability and immunohistochemistry testing for the identification of individuals at risk for Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2005; 4: 255-265.
13. Benatti P, Sassatelli R, Roncucci L, et al. Tumor spectrum in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and in families with "suspected HNPCC". A population-based study in Northern Italy. *Int J Cancer*. 1993; 54 (3): 371-377.
14. Béroud C, Soussi T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acid Res*. 1996; 24 (1): 121-124.
15. Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S, et al. Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat*. 1994; 3 (2): 121-125.
16. Blind N, and Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res*. 1976; 3 (9): 2303-2308.
17. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, et al. Localisation of the gene for adenomatous polyposis on chromosoma 5. *Nature*. 1987; 328 (6131): 614-616.
18. Boland CR and Troncale FJ. Familial colonic cancer without antecedent poliposis. *Ann Intern Med*. 1984; 100 (5): 700-701.
19. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on microsatellite instability for

- cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58 (22): 5248-5257.
20. Boland CR. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. *Fam Cancer.* 2005; 4: 211-218.
 21. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature.* 1994; 368 (6468): 258-261.
 22. Burke W, Petersen G, Lynch P, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. *JAMA.* 1997; 11: 915-919.
 23. Calvert PM, Fruncht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 2002; 137 (7): 603-612.
 24. Cartwright C. Intestinal cell growth control: role of Src tyrosine kinases [Editorial]. *Gastroenterology.* 1998; 114 (6): 1335-1338.
 25. Caspari R, Friedl W, Mandl M, et al. Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset colon cancer. *Lancet.* 1994; 343 (8898): 629-632. Erratum in *Lancet* 1994; 343 (8901): 863.
 26. Caspari R, Olschwang S, Friedl W, et al. Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum Mol Genet.* 1995; 4 (3): 337-340.
 27. Cawkwell L, Bell SM, Lewis FA, et al. Rapid detection of allele loss in colorectal tumours using microsatellites and

- fluorescent DNA technology. *Br J Cancer*. 1993; 67 (6): 1262-1267.
28. Cawkwell L, li D, Lewis FA, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: improved assessment using fluorescent polymerase chain reaction. *Gastroenterology*. 1995; 109 (2): 465-471.
 29. de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2005; 4: 233-237.
 30. Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology*. 1995; 109 (5): 1685-1699.
 31. Chung DC, Rustgi AK. The Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Genetics and Clinical Implications. *Ann Intern Med*. 2003; 138 (7): 560-570.
 32. Cole TRP, Sleightholme HV. ABC of colorectal cancer. The role of clinical genetics in management. *BMJ*. 2000; 321: 943-946.
 33. Correa P, Haenszel W. Epidemiology of large bowel cancer. *Adv Cancer Res*. 1978; 26: 1-141.
 34. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, et al. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet*. 1992; 340 (8820): 626-630.
 35. Consorcio Sanitario de Tenerife. Memoria 2005. CD-rom
 36. Coura R, Ashton-Prolla P, Prolla JC. Hereditary non-polipomatous colorectal cancer: hereditary predisposition, diagnosis and prevention. *Arq Gastroenterol*. 2005; 42 (2): 99-106.
 37. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with

- microsatellite instability. *Cancer Res.* 1998; 58 (15): 3455-3460.
38. Debinski HS, Love S, Spigelman AD et al. Colorectal polyp counts and cancer risk in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* 1996; 110 (4): 1028-1030.
 39. DeCosse JJ. Surgical prophylaxis of familial colon cancer: Prevention of death from familial colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst. (monogr)* 1995; 17: 31-32.
 40. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, et al. Diagnostic microsatellite instability: Definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res.* 1997; 57 (21): 4749-4756.
 41. Dieumegard B, Grandjouan S, Sabourin JC, et al. Extensive molecular screening for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2000; 82 (4): 871-880.
 42. Drummond JT, Li GM, Longley MJ, et al. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science.* 1995; 268 (5219): 1909-1912.
 43. Eng C, Hampel H, de la Chapelle A. Genetic testing for cancer predisposition. *Ann Rev Med.* 2001; 52: 371-400. [Erratum, *Ann Rev Med.* 2002; 53: xi]
 44. Evans DG, Wu CL, Walsh S, et al. Re: Characterization of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from a population-based series of cases. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93 (9): 716-717.
 45. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 2001; 10 (7): 721-733.
 46. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumourgenesis. *Cell.* 1990; 61 (5): 759-767.

47. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*. 1990; 247 (4938): 49-56.
48. Fernández-Piqueras J, Fernández-Peralta AM, Santos J, et al. La tecnología del ADN recombinante (Capítulo XIX). *Genética*. Editorial Ariel. Barcelona. 2002. Página: 270.
49. Fernández-Piqueras J, Fernández-Peralta AM, Santos J, et al. Bases moleculares de las mutaciones génicas (Capítulo XXIII). *Genética*. Editorial Ariel. Barcelona. 2002. Página: 309
50. Fernández-Piqueras J, Fernández-Peralta AM, Santos J, et al. Genética de poblaciones (Capítulo XXXIII). *Genética*. Editorial Ariel. Barcelona. 2002. Páginas: 451.
51. Fernández-Piqueras J, Fernández-Peralta AM, Santos J, et al. Fuentes de variación 2 (Capítulo XXXV). *Genética*. Editorial Ariel. Barcelona. 2002. Página: 464.
52. Fernández-Suárez A, Cordero C, García R, et al. Implicaciones clínicas y éticas del consejo genético en la poliposis adenomatosa familiar. *Rev Esp Enferm Dig*. 2005; 97 (9): 654-665.
53. Fishel R. The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. *Cancer Res*. 2001; 61: 7369-7374.
54. Fleming MA, Potter JD, Ramirez CJ, et al. Understanding missense mutations in the BRCA1 gene: an evolutionary approach. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 10: 1151-1156.
55. Flores O, Riveros H, Sosa A, et al. RNA interferente: Una herramienta y un novedoso mecanismo de regulación génica. *Mensaje Bioquímico*. 2004; 28: 45-59.

56. Fontino M, Merson EJ, Allen FH Jr. Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. *Ann Clin Lab Sci.* 1971; 1(2): 131-133.
57. Ford D, and Easton DF. The genetics of breast and ovarian cancer. *Br J Cancer.* 1995; 72 (4): 805-812.
58. Gail MH, Pee D, Benichou J, et al. Designing studies to estimate the penetrance of an identified autosomal dominant mutation: cohort, case-control, and genotype-proband designs. *Genet Epidemiol.* 1999; 16: 15-39.
59. Gal R, Sadikov E, Sulkes J, et al. Deleted in colorectal cancer protein expression as possible predictor of response to adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients. *Dis Colon Rectum.* 2004; 47: 1216-1224.
60. Georgiades IB, Curtis LJ, Morris RM, et al. Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene.* 1999; 18 (56): 7933–7940.
61. Giardiello FM, Krush AJ, Petersen GM, et al. Phenotypic variability of familial adenomatous polyposis in 11 unrelated families with identical APC gene mutation . *Gastroenterology.* 1994;106 (6):1542-1547.
62. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM, et al. The use and interpretation of commercial APC gene testing for familial adenomatous poliposis. *N Engl J Med.* 1997; 336: 823-827.
63. Gill S, Stratton MR, Patterson H, et al. Detection of transforming genes by transfection of DNA from primary soft tissue tumours. *Oncogene.* 1991; 6:1651-1656.

64. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.* 2003; 63: 1608-1614.
65. Goldgar D, Easton D, Cannon-Albright L, et al. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86 (21): 1600-1608. .
66. González-Aguilera JJ, Herrero MP, Maillo C, et al. Loss of heterozygosity of TP53 is not correlated with clinicopathological variables in sporadic colorectal carcinomas. *Anticancer Res.* 1999; 19 (2A): 1325-1329.
67. González-Aguilera JJ, Zárata R, Fernández FJ, et al. Genetic alterations and MSI status in primary, synchronous, and metachronous tumours in an HNPCC family. *Am J Clin Oncol.* 2003; 26 (4): 386-391.
68. Goodfellow PJ, Buttin BM, Herzog TJ, et al. Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series on endometrial cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100 (10): 5908-5913.
69. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous poliposis coli gene. *Cell.* 1991; 66: 589-600.
70. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med.* 2005; 352 (18): 1851-1860.
71. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science.* 1908; 28: 49-50.
72. Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, et al. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression

- analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol.* 2003; 162 (2): 469-477.
73. Hendriks Y, Wagner A, Morreau H, et al. Cancer risk in hereditary non poliposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counselling and surveillance. *Gastroenterology.* 2004; 127 (1): 17-25.
 74. Heutink P, Oostra BE. Gene finding in genetically isolated populations. *Hum Mol Genet.* 2002; 11: 2507-2515.
 75. Huang J, Kuismanen SA, Liu T, et al. MSH6 and MSH3 are rarely involved in genetic predisposition to nonpolypotic colon cancer. *Cancer Res.* 2001; 61 (4): 1619-1623.
 76. ICG-HNPCC. Guidelines for management recommended by ICG-HNPCC. 2004. www.nfdht.nl.
 77. Iino H, Simms L, Young J, et al. DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut.* 2000; 47: 37-42.
 78. Järvinen HT, Aarnio M, Mustonen H, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2000; 118: 829-834.
 79. Jass JR. What's New in Hereditary Colorectal Cancer?. *Arch Pathol Lab Med.* 2005; 129: 1380-1384.
 80. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56: 106-130.
 81. de Jong AE, Morreau H, van Puijenbrock M, et al. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HPNCC. *Gastroenterology.* 2004; 126: 42-48.

82. de Jong AE, van Puijenbrock M, Hendriks Y, et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 satining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (3): 972-980.
83. de Jong AE, Hendriks YM, Kleibeuker JH, et al. Decrease in mortality in Lynch syndrome families because of surveillance. *Gastroenterology.* 2006; 130 (3): 665-671.
84. Joseph-Reinette C, Viguer J, Regimbeau C, de Muret A, de Calan L, Dorval E. Tumeur stromale gastrique à cellules géantes multinucléées de type ostéoclastique au cours d'un syndrome de Lynch II. *Gastroenterol Clin Biol.* 2000; 24:675-678.
85. Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, et al. Rapid and sensitive nonradiative detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogen.* 1991; 6: 1079-1083.
86. Kee F, Collins BJ. How prevalent is cancer family syndrome? *Gut.* 1991; 32 (5): 509-512.
87. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, et al. Identification of FAP locus genes from chromosoma 5q21. *Science.* 1991; 253 (5020): 661-665.
88. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-supressor *p53*: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol.* 1998; 16 (9): 3158-3168.
89. Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res.* 1985; 45 (4): 1437-1443.
90. Kornberg A. DNA replication *Biochim Biophys Acta.* 1988; 951 (2-3): 235-239.

91. Kressner U, Inganäs M, Byding S, et al. Prognostic value of *p53* genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 1999; 17 (2): 593-599.
92. Kune GA, Kune S, Watson LF. The role of hereditary in the etiology of large bowel cancer: Data from the Melbourne colorectal cancer study. *World J Surg*. 1989; 13 (1): 124-131.
93. Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, et al. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's "two hits" hypothesis. *Nature Med*. 1999; 5: 1071-1075.
94. Leach FS, Tokino T, Meltzer P, et al. *p53* mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res*. 1993; 53 (10 Suppl): 2231-2234.
95. Lemon SJ, Tinley ST, Fusaro RM, et al. Cancer risk assessment in a hereditary cancer prevention clinic and its first year's experience. *Cancer (Suppl)*. 1997; 80 (3): 606-613.
96. Lerman C, Hughes C, Trock BJ, et al. Genetic testing in families with hereditary nonpolyposis colon cancer. *JAMA*. 1999; 281 (17): 1618-1622.
97. Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, et al. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet*. 1993; 5 (3): 279-282.
98. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovitch O, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol*. 2002; 20 (4): 1043-1048.

99. Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, et al. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet.* 2000; 24 (1): 27-35.
100. Lockhard-Mummery A. Cancer and Hereditary. *Lancet.* 1925; 1: 427-429.
101. Lotfi AM, Dozois RR, Gordon H, et al. Mesenteric fibromatosis complicating familial adenomatous polyposis: predisposing factors and results of treatment. *Int J Colorectal Dis.* 1989; 4: 30-36.
102. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, et al. Hereditary factors in cancer: Study of two large Midwestern kindreds. *Arch Intern Med.* 1966; 117: 206-212.
103. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer.* 1971; 27: 1505-1511.
104. Lynch HT, Drouhard TJ, Shuelke GS, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet.* 1985; 15 (3-4): 209-213.
105. Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer.* 1995; 76: 2427-2433
106. Lynch HT, Smyrk T, Jass JR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and colonic adenomas: Aggressive adenomas? *Semin Surg Oncol.* 1995; 11 (6): 406-410.
107. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet.* 1999; 36: 801-818.
108. Lynch HT, Lynch J. Lynch Syndrome: Genetics, Natural History, Genetic Counseling and prevention. *J Clin Oncol.* 2000; 18 (21s): 19s-31s.

109. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348 (10): 919-932.
110. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science.* 1995; 268 (5215): 1336-1338.
111. Markowitz S. DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancer. *J Clin Oncol.* 2000; 18 (21s): 75s-80s.
112. Mecklin JP. Frequency of hereditary colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 1987; 93 (5): 1021-1025.
113. Mecklin JP, Järvinen HJ. Tumor spectrum in cancer family syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer). *Cancer.* 1991; 68: 1109-1112.
114. Mecklin JP, Jarvinen HJ, Hakiluoto A, et al. Frequency of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. A prospective multicenter study in Finland. *Dis Colon Rectum.* 1995; 38 (6): 588-593.
115. Mecklin JP, Järvinen HJ. Surveillance in Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2005; 4: 267-271.
116. Medina V, Barrios Y, García-Castro C, et al. F. Highly aggressive leiomyosarcoma associated with Lynch II syndrome: increasing the range of extracolonic cancers related with hereditary non-polyposis colonic cancer. *Ann Oncol.* 2002; 13: 807-808.
117. Medina-Arana V, Barrios Y, González-Aguilera JJ, et al. Tumor spectrum of non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) on the Island of Tenerife and influence of insularity on the clinical manifestations. *Eur J Cancer Prev.* 2004; 13: 27-32

118. Medina-Arana V, Barrios Y, Fernández-Peralta A, et al. Genealogical study as screening method in the lynch syndrome without genetic test. 2006. Pendiente de publicación.
119. Menko FH, te Meerman GJ, Sampson JR. Variable age of onset in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Clinical implications. *Gastroenterology*. 1993; 104 (3): 946-947.
120. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994; 266 (5182): 66-71.
121. Mironov N, Jansen LA, Zhu WB, et al. A novel sensitive method to detect frameshift mutations in exonic repeat sequences of cancer-related genes. *Carcinogenesis*. 1999; 20 (11): 2189-2192.
122. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*. 1997; 17: 271-272.
123. Mulvihill JJ. Clinical ecogenetics: cancer in families. *N Engl J Med*. 1985; 312 (24): 1569-1570.
124. Muñoz A. Importancia de los genes del cáncer en el desarrollo de tumores humanos. Los cánceres hereditarios (Capítulo IX). *Cáncer, Genes y Nuevas Terapias*. Editorial Hélice. Madrid. 1997. Páginas: 246-249.
125. Nagase H, et al. Correlation between the location of germline mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res*. 1992; 52: 4055-4057.
126. Nugent KP, Phillips RK, Hodgdon SV, et al. Phenotypic expression in familial adenomatous polyposis: partial

- prediction by mutation analysis. *Gut*. 1994; 35 (11): 1622-1623.
127. Obmolova G, Ban C, Hsieh P, et al. Crystal structures of mismatch repair protein *MutS* and its complex with a substrate DNA. *Nature*. 2000; 407: 703-710.
 128. Offerhaus GJ, Giardiello FM, Krush AJ, et al. The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. 1992; 102 (6): 1980-1982.
 129. Parc Y, Boisson C, Thomas G, et al. Cancer risk in 348 French MSH2 or MLH1 gene carriers. *J Med Genet*. 2003; 40: 208-213.
 130. Park JG, Park YJ, Wijnen JT, et al. Gene-environment interaction in hereditary nonpolyposis colorectal cancer with implications for diagnosis and genetic testing. *Int J Cancer*. 1999; 82 (4): 516-519.
 131. Park YJ, Shin K-H, Park J-G. Risk of gastric cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Korea. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 2994-2998.
 132. Passarge E. Secuenciación del DNA. *Genética Texto y Atlas*. Editorial Panamericana. 2001. Páginas 52-53.
 133. Patterson H, Gill S, Fischer C, et al. Abnormalities of the p53, MDM2 and DCC genes in human leiomyosarcomas. *Br J Cancer*. 1994; 69 (6): 1052-1058.
 134. Peel DJ, Ziogas A, Fox EA, et al. Characterization of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from a population-based series of cases. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92 (18): 1517-1522.

135. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*. 1993; 260 (5109): 810-812.
136. Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 1997; 113 (4): 1146-1158.
137. Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition – Update of ICG-HNPCC/INSIGHT mutation database. *Dis Markers*. 2004; 20 (4-5): 269-276.
138. Peltomäki P. Lynch síndrome genes. *Fam Cancer*. 2005; 4: 227-232.
139. Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem*. 1996; 377 (11): 675-684.
140. Philips RK, Wallace MH, Lynch PM, et al. A randomized, double blind, placebo-controlled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal poliposis in familial adenomatous poliposis. *Gut*. 2002; 50: 857-860.
141. Pläschke J, Kruppa C, Tischler R, et al. Senquence analysis of the mismatch repair gene hMSH6 in the germline of patients with familial and sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2000; 85 (5): 606-613.
142. Pläschke J, Krüger S, Jeske B, et al. Loss of MSH3 protein expression is frequent in MLH1-deficient colorectal cancer and is associated with disease progression. *Cancer Res*. 2004; 64: 864-870.
143. Ponz de Leon M, Sassatelli R, Benatti P, et al. Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general

- population. The 6-year experience of a population-based registry. *Cancer*. 1993; 71 (11): 3493-3501.
144. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*. 2006; 38 (Suppl.): S8-S13.
 145. Ramsey SD, Clarke L, Etzioni R, et al. Cost-effectiveness of microsatellite instability screening as a method for detecting hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2001; 135 (8): 577-588.
 146. Räschle M, Marra G, Nyström-Lahti M, et al. Identification of hMutL[•], a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J Biol Chem*. 1999; 274 (45): 32368-32375.
 147. Renkonen-Sinisalo L, Aarnio M, Mecklin JP, et al. Surveillance improves survival of colorectal cancer in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Detect Prev*. 2000; 24 (2): 137-142.
 148. Risinger JI, Barret JC, Watson P, et al. Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Cancer*. 1996; 77 (9): 1836-1843.
 149. Rodríguez-Bigas MA, Vasen HFA, Pekka-Mecklin JP, et al. Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. International Collaborative Group on HNPCC. *Ann Surg*. 1997; 225: 202-207.
 150. Rodríguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89 (23): 1758-1762.

151. Salovaara R, Loukola A, Kristo P, et al. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000; 18 (11): 2193-2200.
152. Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed. CSH laboratory press, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
153. Schmeler KM, Lynch HT, Chen LM, et al. Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch síndrome. *N Engl J Med*. 2006; 354 (3): 293-295.
154. Scott RJ, McPhillips M, Meldrum CJ, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families: Differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds. *Am J Hum Genet*. 2001; 68: 118-127.
155. Sistema Canario de Salud. Registro poblacional de cáncer de Canarias 1997.
156. Solomon CH, Pho LN, and Burt RW. Current status of genetic testing for colorectal cancer susceptibility. *Oncology*. 2002; 16 (2): 161-171.
157. Soravia C, Berk T, Madlensky L, et al. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 1290-1301.
158. Soravia C, van der Klift H, Brundler MA, et al. Prostate cancer is part of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) tumor spectrum. *Am J Genet*. 2003; 121 (2): 159-162.
159. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, et al. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*. 1993; 365 (6443): 274-276.

160. Stratton MR, Williams S, Fisher C, et al. Structural alterations of the RB1 gene in human soft tissue tumours. *Br J Cancer*. 1989; 60: 202-205.
161. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*. 1993; 262 (5140): 1734-1737.
162. Suh O, Mettlin C, Petrelli N. Aspirine use, cancer and polyps of the large bowel. *Cancer*. 1993; 72(4): 1171-1177.
163. Sun XF, Rütten S, Zhang H, et al. Expression of the deleted in colorectal cancer gene is related to prognosis in DNA diploid and low proliferative colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 1999; 17 (6): 1745-1750.
164. Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 2002; 123 (6): 1804-1811.
165. Taylor CF, Charlton RS, Burn J, et al. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: Identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat*. 2003; 22 (6): 428-433.
166. Terdiman JP. HNPCC: an uncommon but important diagnosis. *Gastroenterology*. 2001; 121 (4): 1005-1008.
167. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993; 260 (5109): 816-819.
168. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: Different mutator

- phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res.* 1998; 58 (8): 1713-1718.
169. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96: 261-268.
170. van Duijvendijk P, Slors JF, Taat CW, et al. Quality of life after total colectomy with ileorectal anastomosis or proctocolectomy and ileal pouch-anal anastomosis for familial adenomatous polyposis. *Br J Surg.* 2000; 87: 590-596.
171. Vasconcelos R, Garicochea B, Cotti G, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer identification and surveillance of high-risk families. *Clinics.* 2005; 60 (3): 251-256.
172. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, et al. The International Collaborative Group on Hereditary non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum.* 1991; 34: 424-425.
173. Vasen HF, Nagengast FM, Khan PM, et al. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet.* 1995; 345: 1183-1184
174. Vasen HFA, van der Luijt RB, Slors JFM, et al. Molecular genetic test as a guide to surgical management of familial adenomatous polyposis. *Lancet.* 1996; 348: 433-435.
175. Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology.* 1996; 110 (4): 1020-1027. Erratum in *Gastroenterology.* 1996; 111(5): 1402.
176. Vasen HF, van Ballegooijen M, Buskens E, et al. A cost-effectiveness analysis of colorectal screening of hereditary

- nonpolyposis colorectal carcinoma gene carriers. *Cancer*. 1998; 82 (9): 1632-1637.
177. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, et al. New Clinical Criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999; 116: 1453-1456.
178. Vasen HF, Morreau H, and Nortier JW. Is breast cancer part of tumor spectrum of hereditary nonpolyposis colorectal cancer?. *Am J Hum Genet*. 2001; 68: 1533-1534.
179. Vasen HFA. Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. *Fam Cancer*. 2005; 4: 219-225.
180. Villa E, Dugani A, Rebecchi AM, et al. Identification of subjects at risk for colorectal carcinoma through a test based on K-ras determination in the stool. *Gastroenterology*. 1996; 110 (5): 1346-1353.
181. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988; 319 (9): 525-532.
182. de Vos tot Nederveen WH, Nagengast FM, Griffioen G, et al. Surveillance for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a long-term study on 114 families. *Dis Colon Rectum*. 2002; 45: 1588-1594.
183. de Vos tot Nederveen WH, Buskens E, van Duijvendijk P, et al. Decision analysis in the surgical treatment of colorectal cancer due to a mismatch repair gene defect. *Gut*. 2003; 52: 1752-1755.

184. de Vos M, Hayward BE, Picton S, et al. Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004; 74: 954-964.
185. Voskuil DW, Vasen HF, Kampman E, et al. Colorectal cancer risk in HNPCC families: Development during lifetime and in successive generations. National Collaborative Group on HNPCC. *Int J Cancer.* 1997; 72 (2): 205-209.
186. Warthin AS: Hereditary with reference to carcinoma. *Arch Intern Med.* 1913; 12: 546-555.
187. Warthin AS. The further study of a cancer family. *J Cancer Res.* 1925; 9: 279-286.
188. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer.* 1993; 71 (3): 677-685.
189. Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, et al. The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med.* 1994; 96 (6): 516-520.
190. Watson P, Lin KM, Rodríguez-Bigas MA, et al. Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. *Cancer.* 1998; 83: 259-266.
191. Watson P, Lynch HT. Cancer risk in mismatch repair gene mutation carriers. *Fam Cancer.* 2001; 1: 57-60.
192. Watson and Riley B. The tumor spectrum in the Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2005; 4: 245-248.
193. Wehner M, Buschhausen L, Lamberti C, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): eight novel germline mutations in hMSH2 or hMLH1 genes. *Hum Mutat.* 1997; 10 (3): 241-244.

194. Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin.* 1994; 44: 160-170.
195. Westlake PJ, Bryant HE, Huchcroft SA, et al. Frequency of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in southern Alberta. *Dig Dis Sci.* 1991; 36 (10): 1441-1447.
196. de Wind N, Dekker M, Berns A, et al. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell.* 1995; 82 (2):321-330.
197. Wolf B, Gruber S, Henglmüller S, et al. Efficiency of the revised Bethesda guidelines (2003) for the detection of mutations in mismatch repair genes in Austrian HNPCC patients. *Int J Cancer.* 2006; 118: 1465-1470.
198. Wong N, Lasko D, Rabelo R, et al. Genetic counseling and interpretation of genetic tests in familial adenomatous poliposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2001; 44 (2): 271-279.
199. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 1995; 378 (6559): 789-792.
200. Wright CM, Dent OF, Barker M, et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg.* 2000; 87: 1197-1202.
201. Wu Y, Berends MJW, Mensink RGJ, et al. Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 1291-1298.

FIGURAS

FIGURA 1

Frecuencia de los distintos tipos de CCR según su patrón de presentación

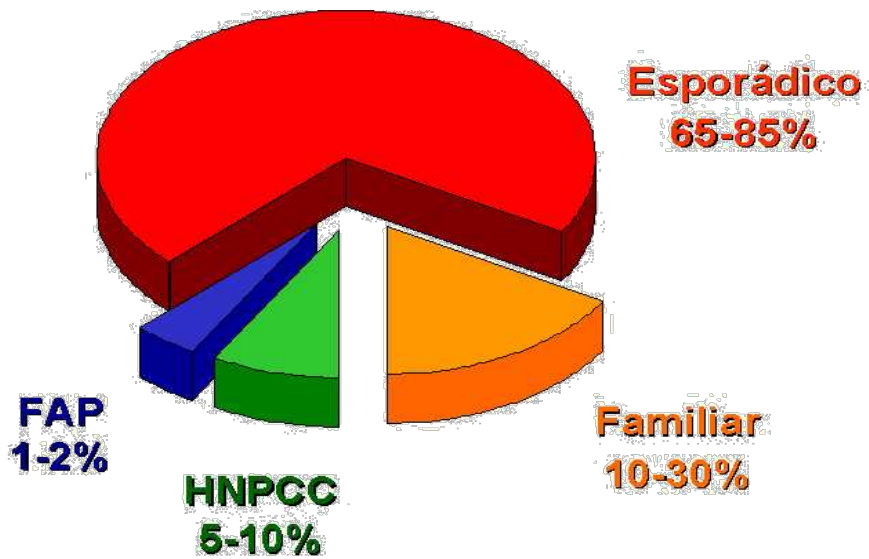


FIGURA 2

Esquema representativo de la replicación del ADN

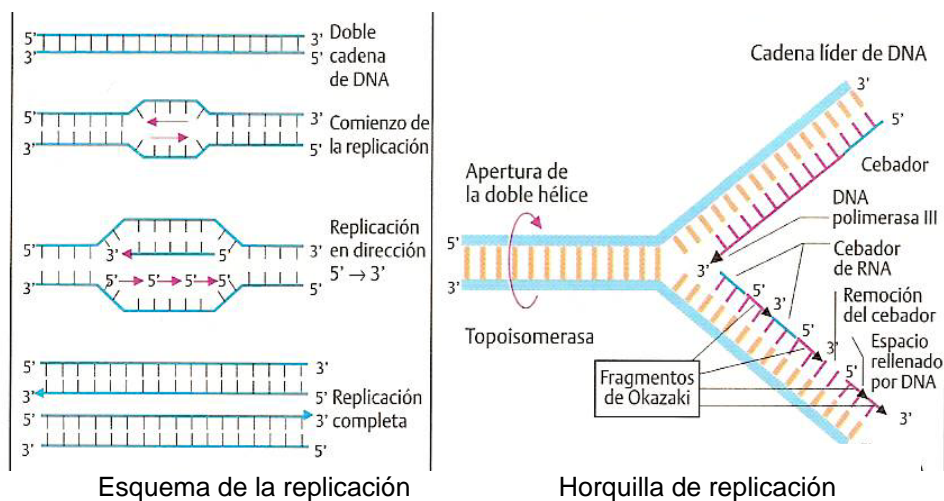


FIGURA 5

Teoría de Fearon y Vogelstein

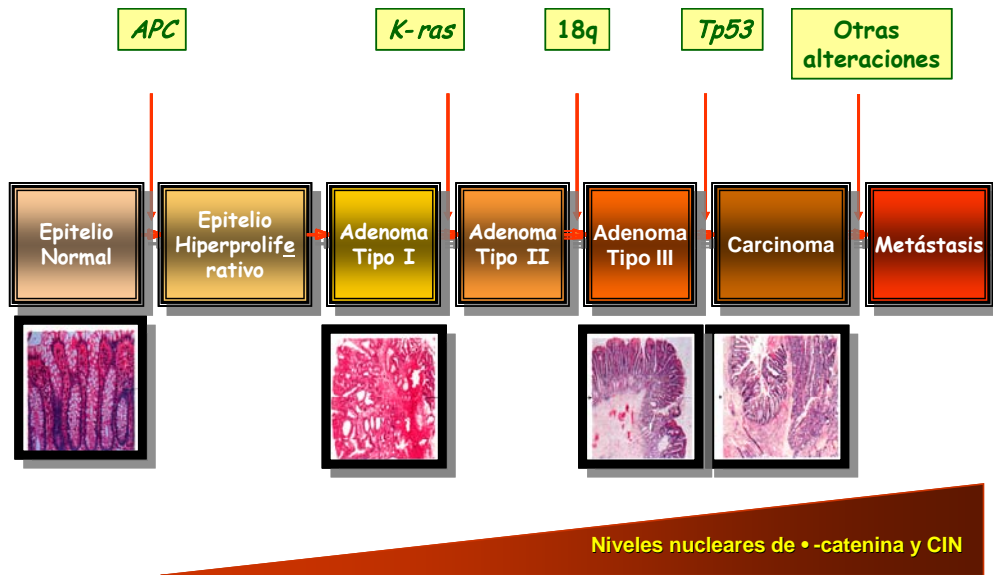


FIGURA 6

El gen APC. Mecanismo de acción y clínica

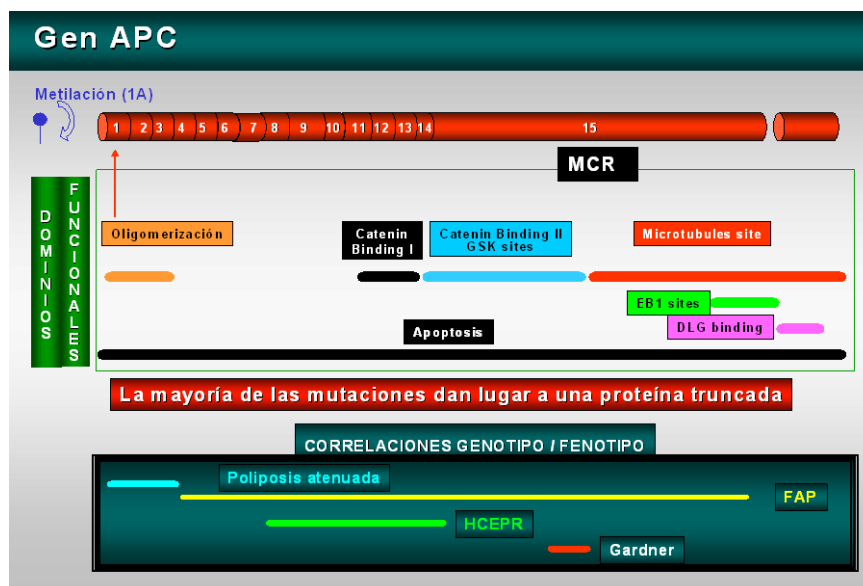


FIGURA 7

Localización del gen *APC* en el cromosoma 5

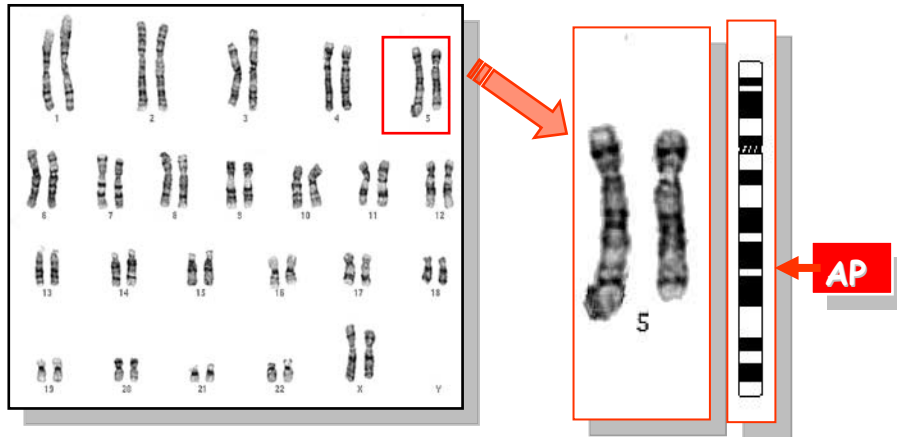
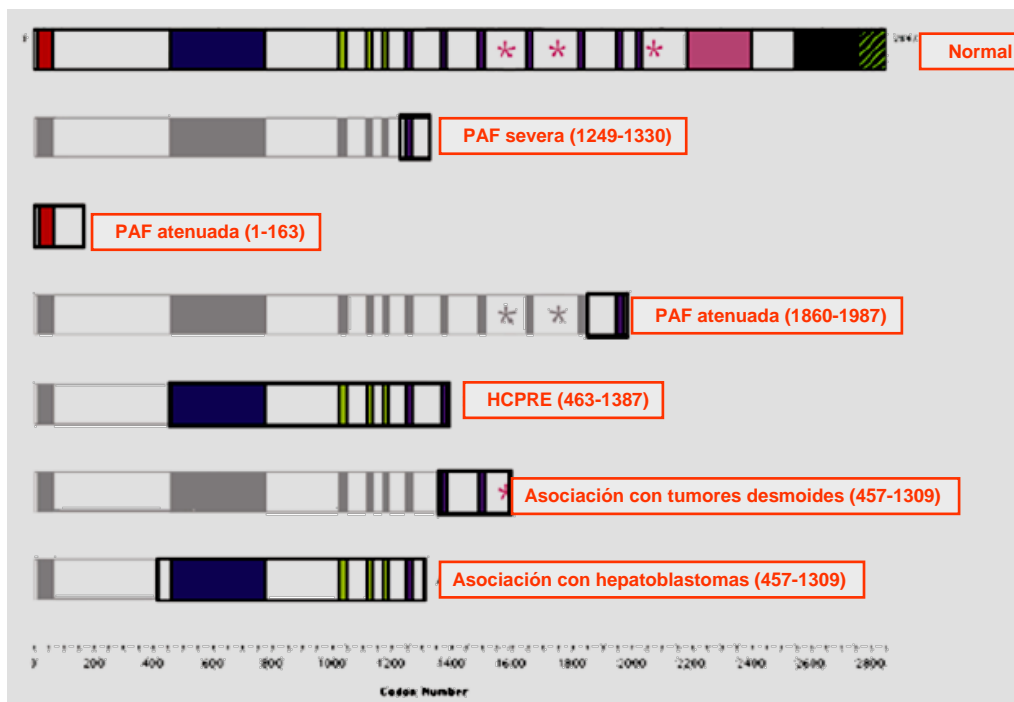


FIGURA 8

Relación entre mutaciones de *APC* y expresión clínica



Fearnhead NS et al. Hum. Mo. Gen, 7: 721 (2001)

FIGURA 9

Localización cromosómica de los MMR

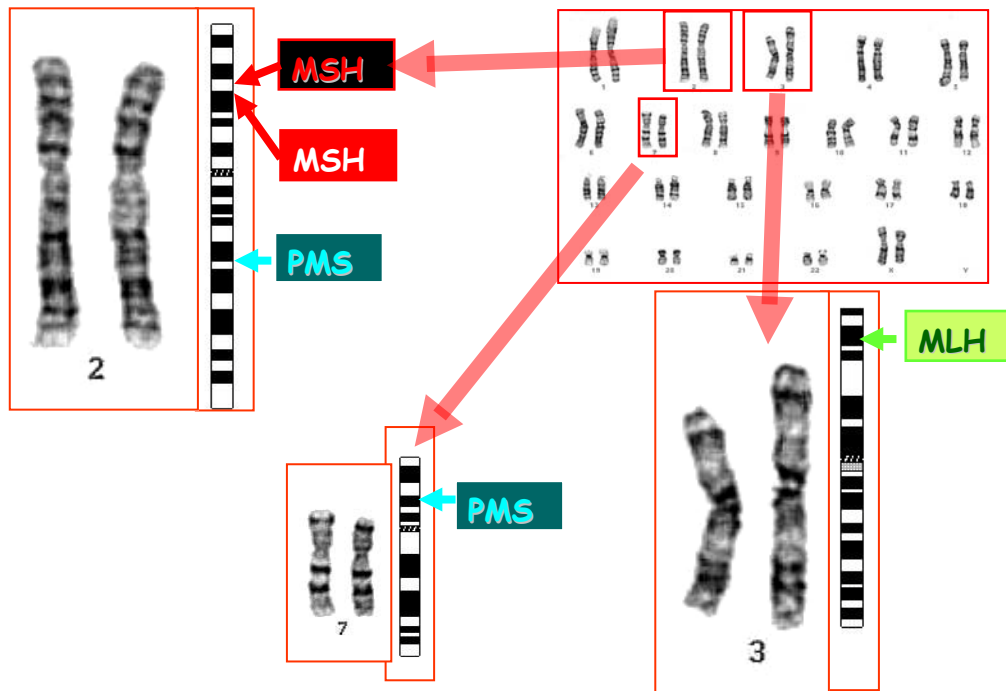


FIGURA 10

Electroforesis de MSI

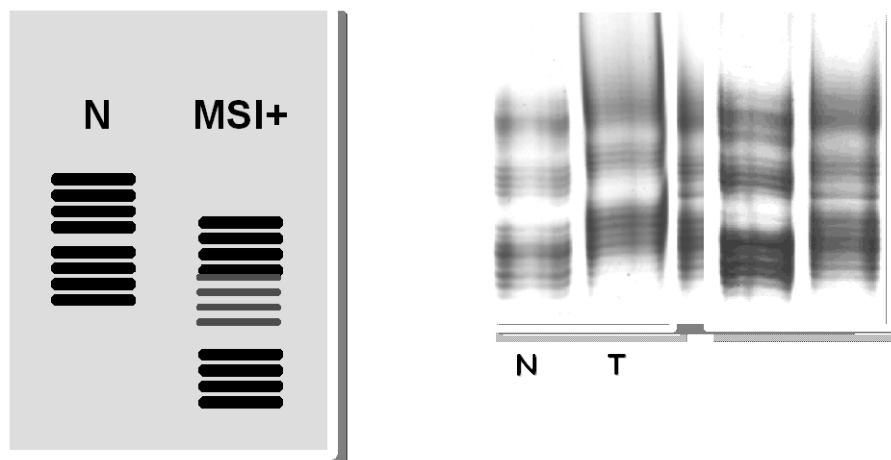


FIGURA 11

Vía mutadora de la carcinogénesis

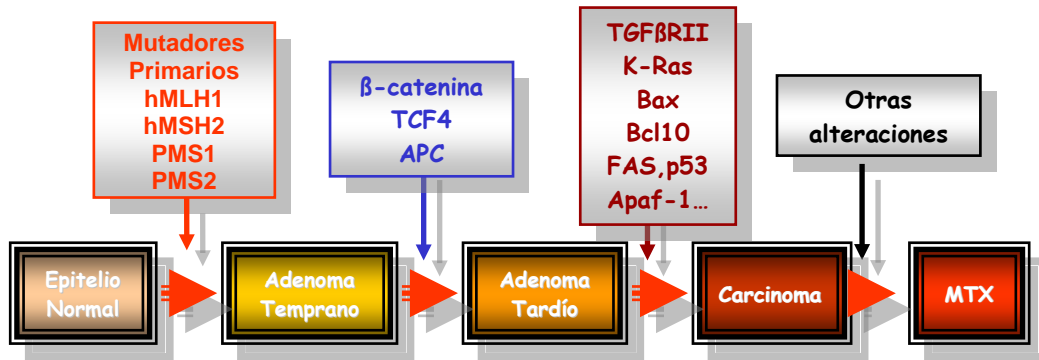
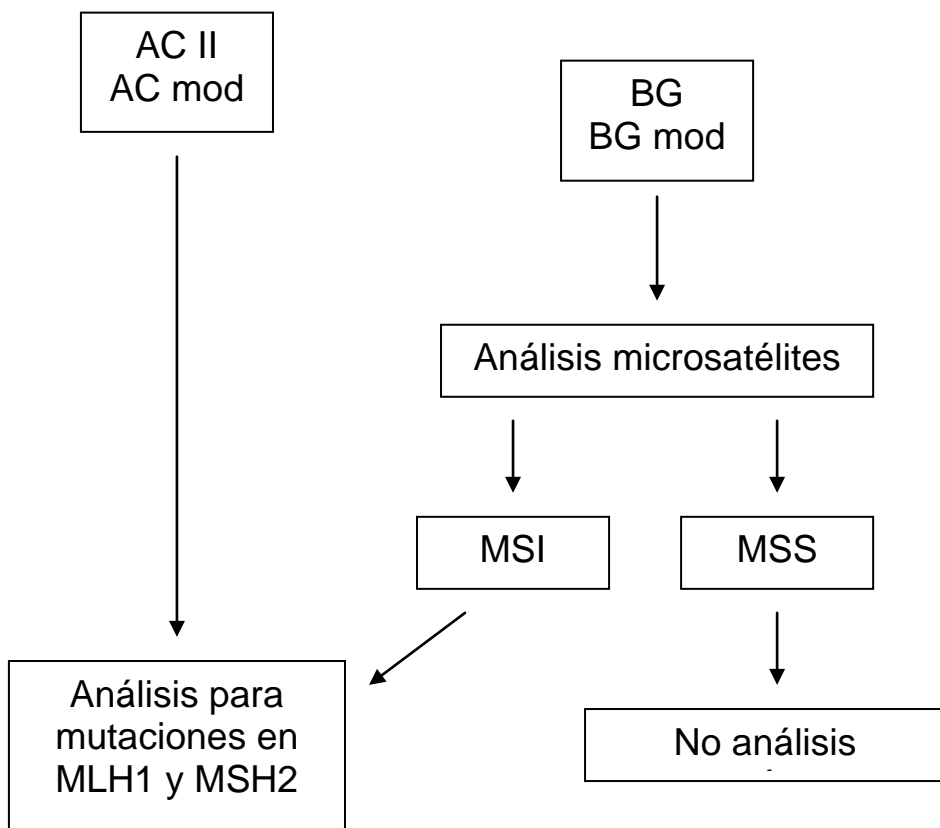


FIGURA 12

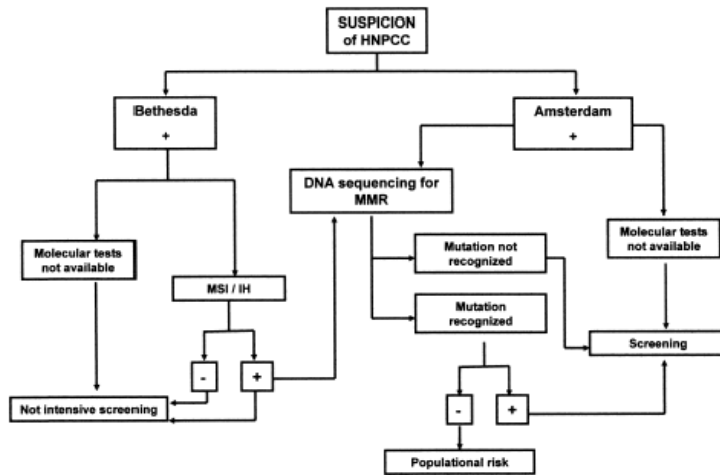
Algoritmo de diagnóstico



AC: Criterios de Ámsterdam, BG: Guías clínicas de Bethesda, AC mod: Criterios de Ámsterdam modificados, BG mod: Guías clínicas de Bethesda modificados

FIGURA 13

Algoritmo de diagnóstico par HNPCC



Vasconcelos R. Clinics. 2005; 60: 254.

FIGURA 14

Ampliación del árbol genealógico de una familia con alta probabilidad de padecer Síndrome de Lynch (rectángulo rojo). Obsérvese como al ampliar el árbol se aprecian más tumores que refuerzan el diagnóstico.

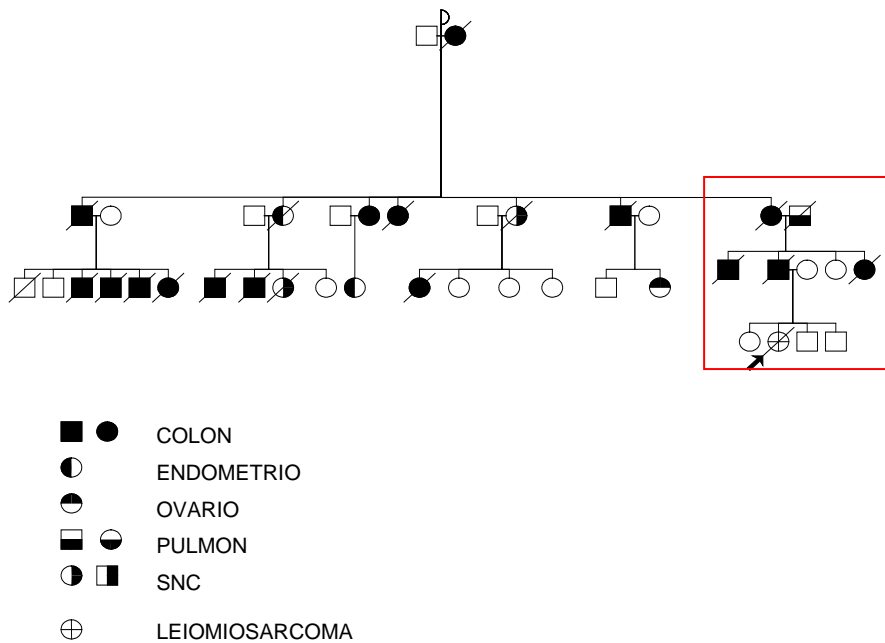


FIGURA 15

Productos de la PCR con los alelos para Arginina y Metionina

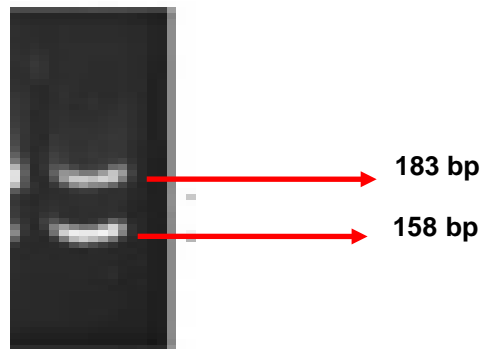


FIGURA 16

Antecedentes familiares

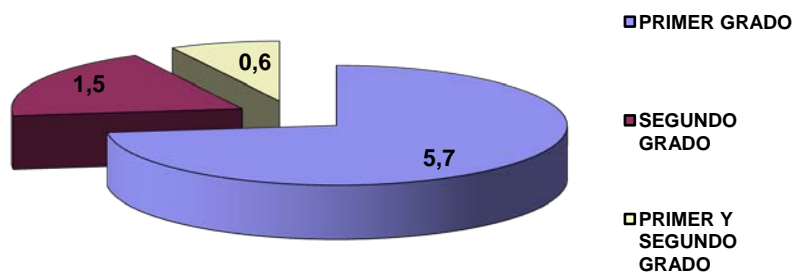
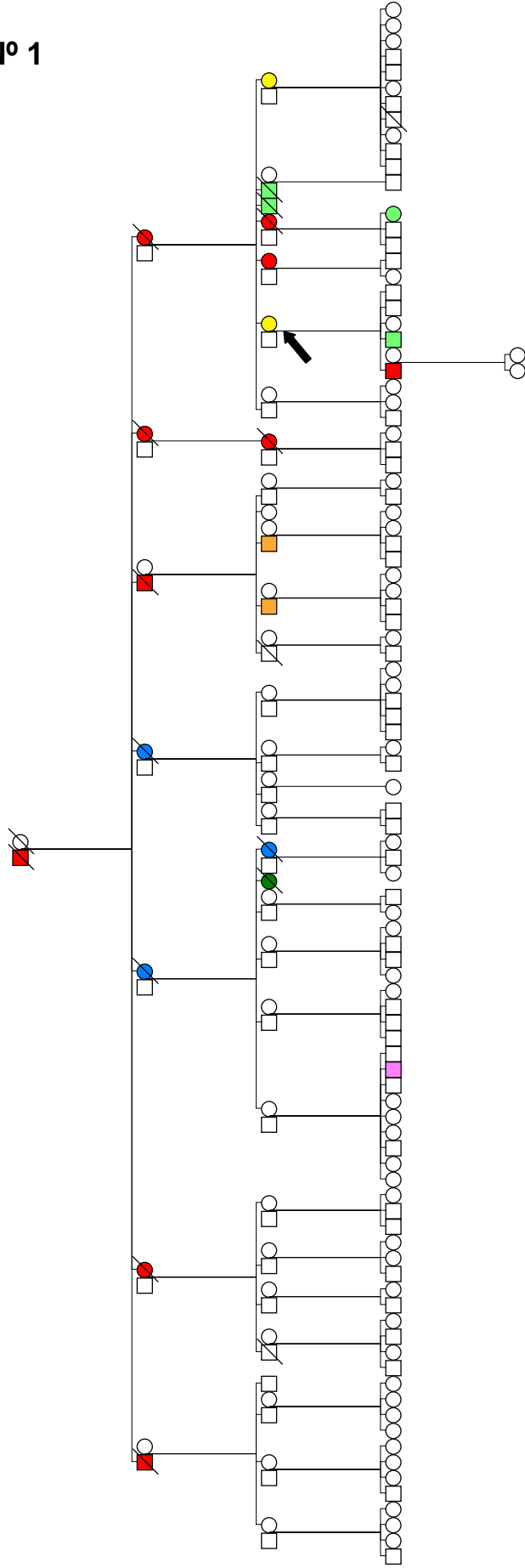
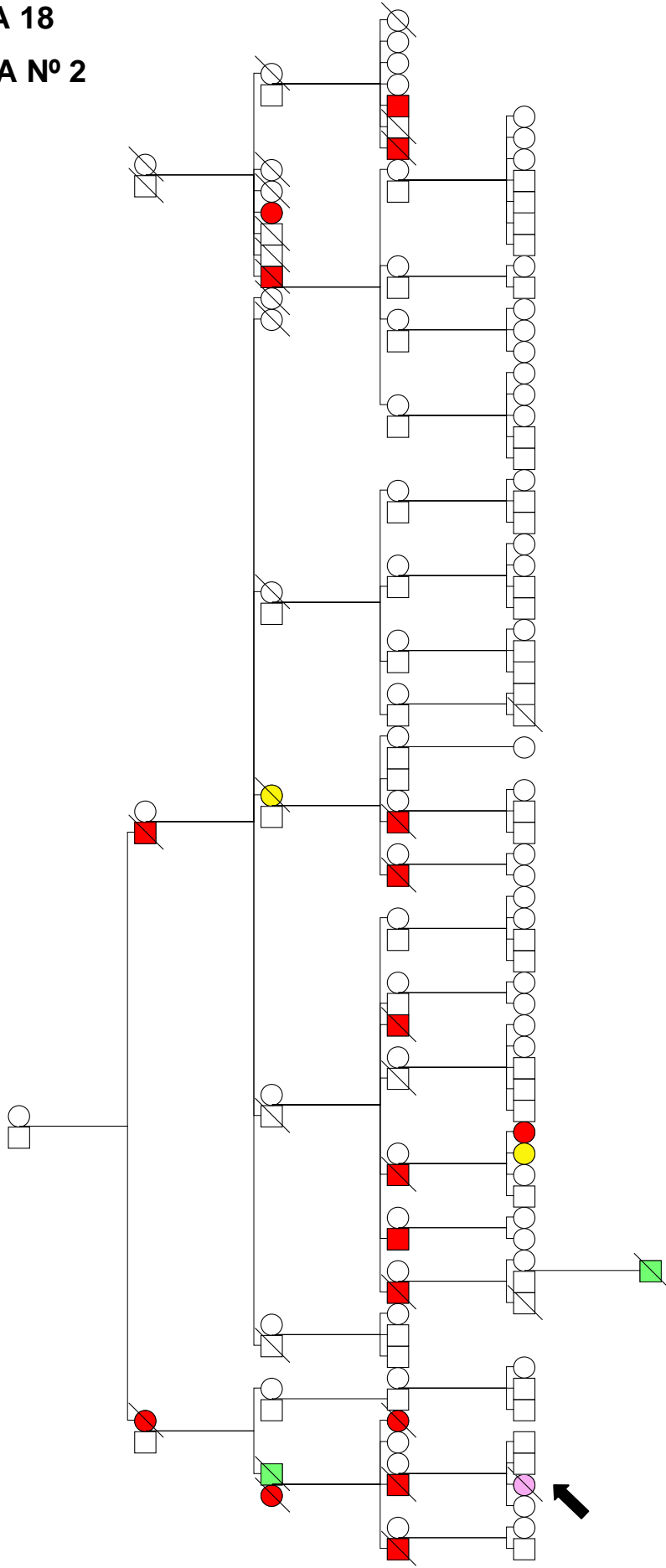


FIGURA 17
FAMILIA N° 1



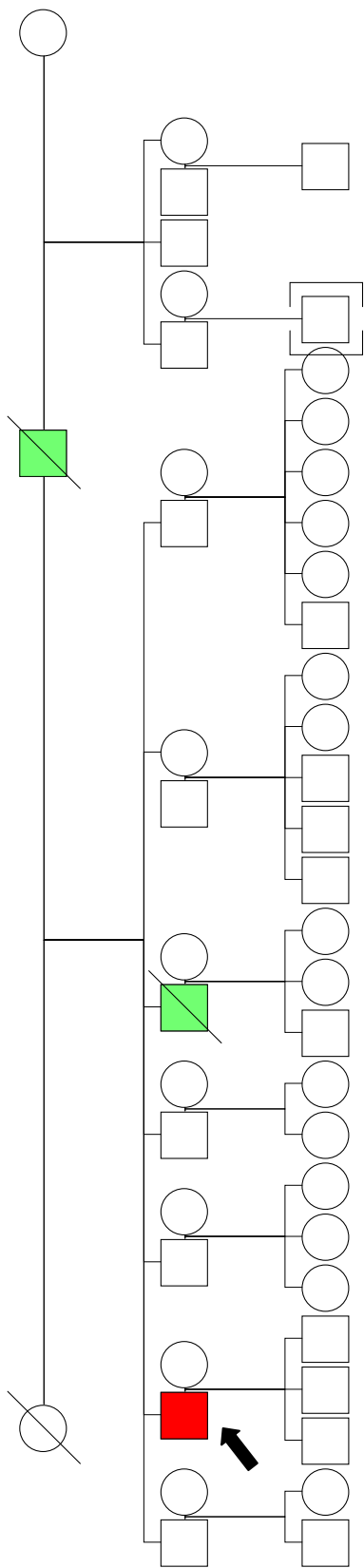
- Hombre, • Mujer, /Fallecido, ↑ Paciente guía
- CCR, Mama, Endometriosis y ovario, Vejiga y próstata, Retinoblastoma, Otros

FIGURA 18
FAMILIA Nº 2



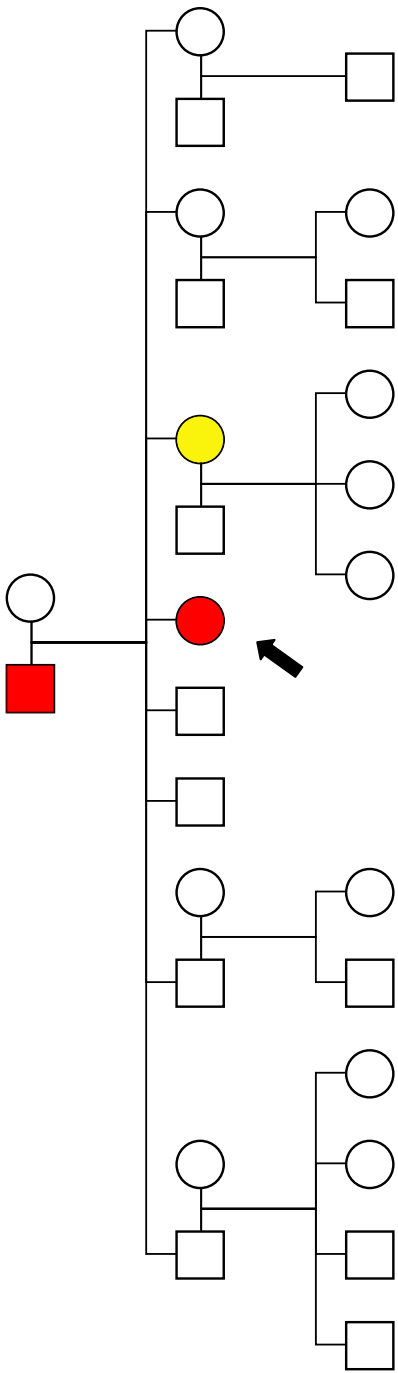
- **Hombre**, • **Mujer**, / **Fallecido**, ↑ **Paciente guía**
CCR, **Endometrio y ovario**, **Leiomiosarcoma**, **Otros**

FIGURA 20
FAMILIA N° 4



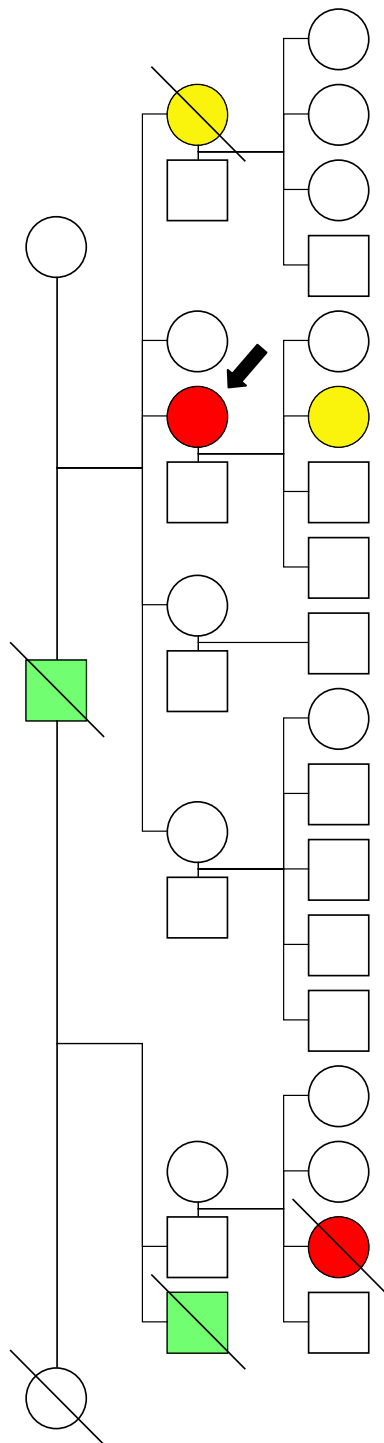
• Hombre, • Mujer, /Fallecido, ↑ Paciente guía
CCR, Otros

FIGURA 21
FAMILIA Nº 5



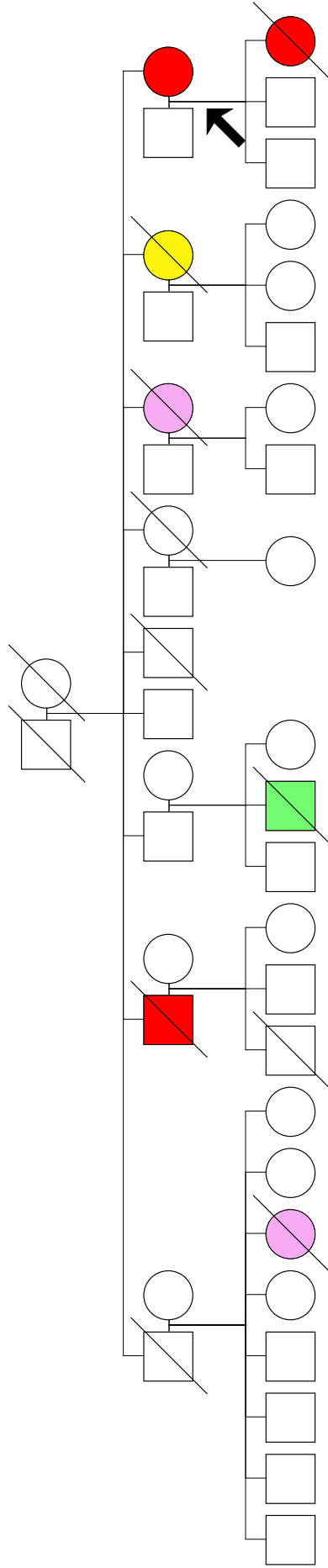
- **Hombre,** **Fallecido,** **↑ Paciente guía**
CCR, **Endometriosis y ovario**

FIGURA 23
FAMILIA N° 7



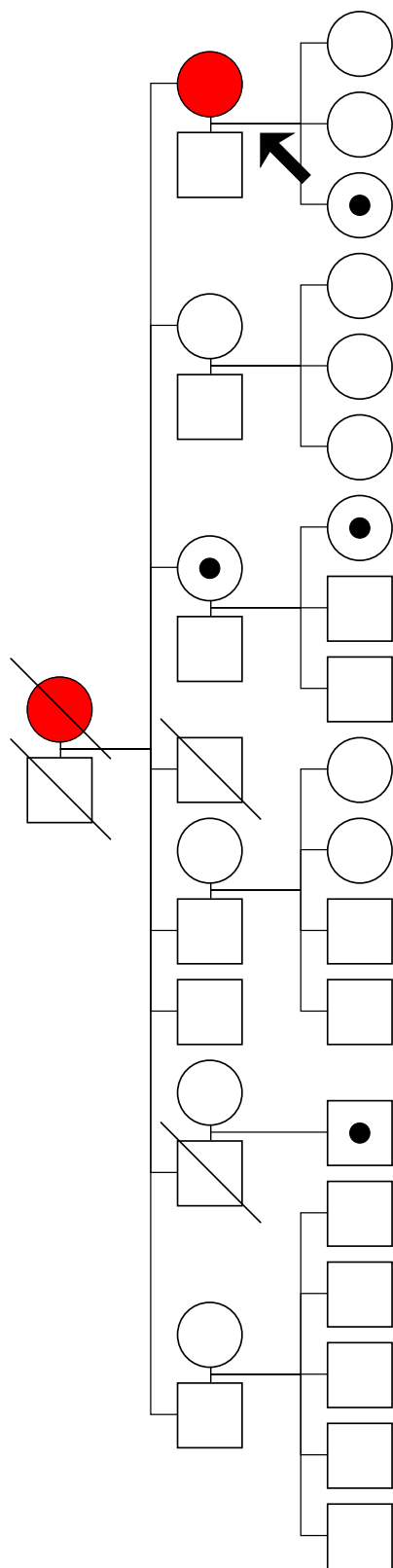
- Hombre, • Mujer, /Fallecido, ↑ Paciente guía
CCR, Endometriosis y ovario, Otros

FIGURA 24
FAMILIA Nº 8



- Hombre, • Mujer, /Fallecido, ↑ Paciente guía
CCR, Endometrio y ovario, Desconocido, SNC

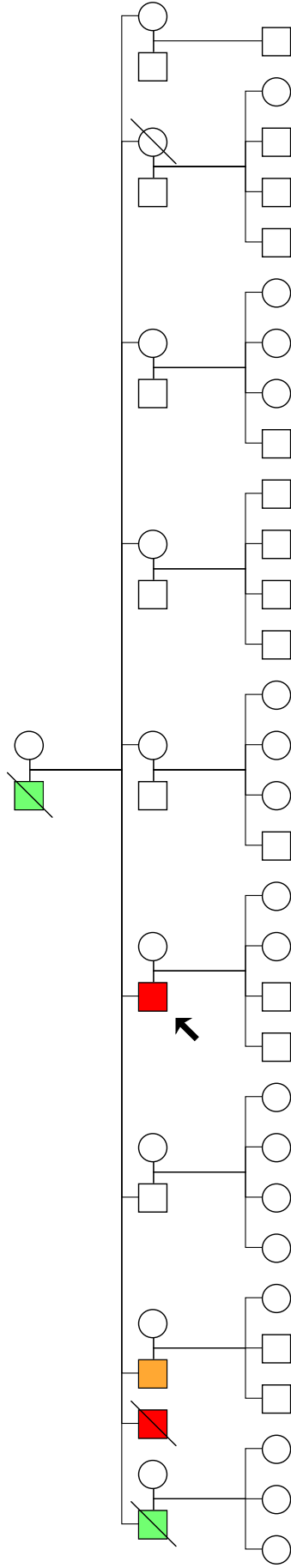
FIGURA 25
FAMILIA Nº 9



• Hombre, • Mujer, / Fallecido, ↑ Paciente guía, □ Portador
CCR

FIGURA 26

FAMILIA Nº 10



- Hombre, • Mujer, /Fallecido, ↑ Paciente guía
CCR, Próstata, Otros

FIGURA 27

Distribución por sexos de la muestra

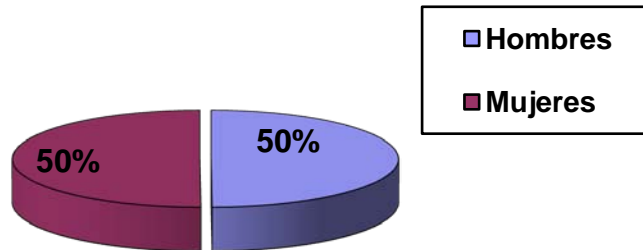
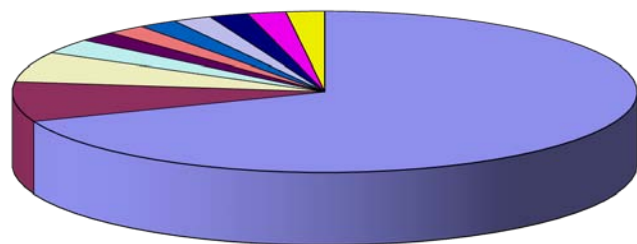


FIGURA 28

Tumores en hombres



- | | |
|-------------------|--------------|
| ■ CCR | ■ VEJIGA |
| ■ PULMÓN | ■ PRÓSTATA |
| ■ ESTÓMAGO | ■ PÁNCREAS |
| ■ ESÓFAGO | ■ MELONOMA |
| ■ RETINOBLASTOMA | ■ EPITELIOMA |
| ■ QUERATOACANTOMA | |

FIGURA 29

Tumores en mujeres

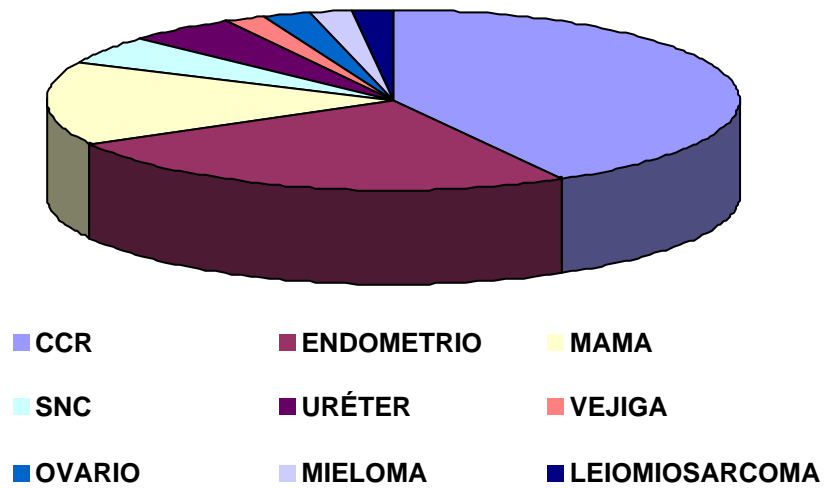


FIGURA 30

Porcentaje de población con tumores

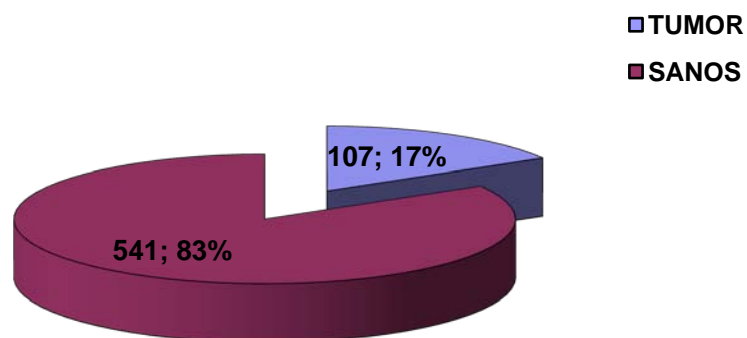


FIGURA 31

Proporción de afección tumoral

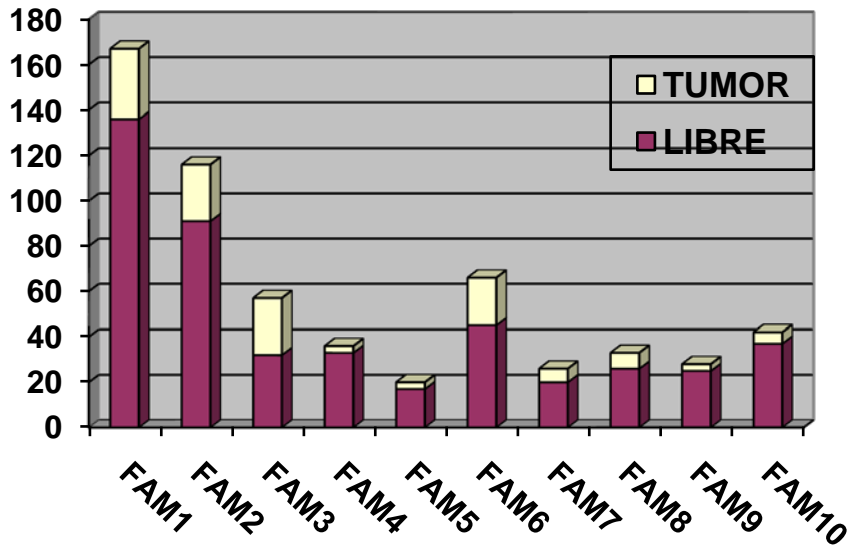


FIGURA 32

Distribución de tumores por grupo de edad

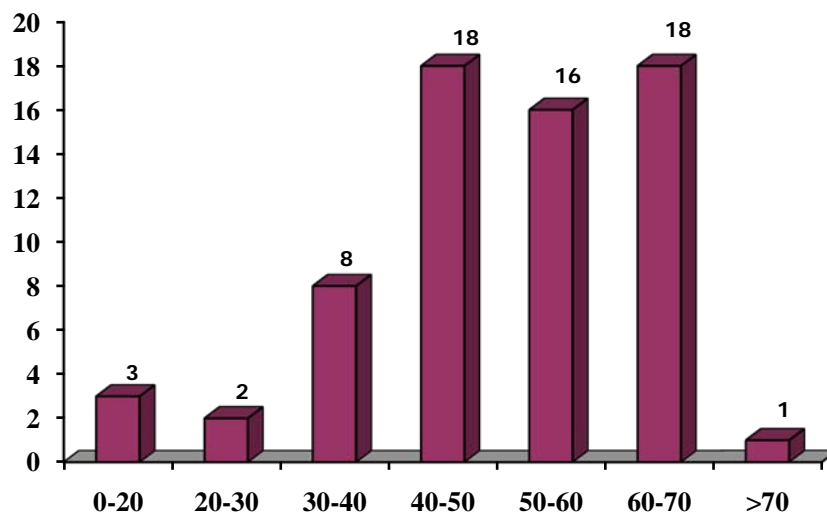


FIGURA 33

Efecto de la edad sobre la aparición de los tumores (%)

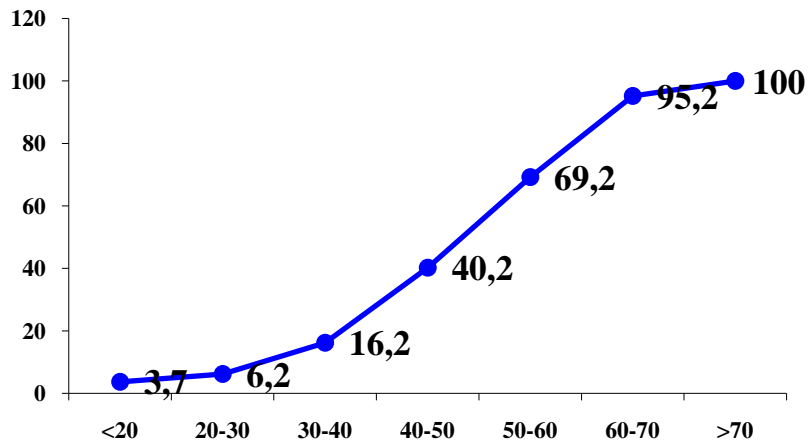


FIGURA 34

Representación de las frecuencias de los tumores

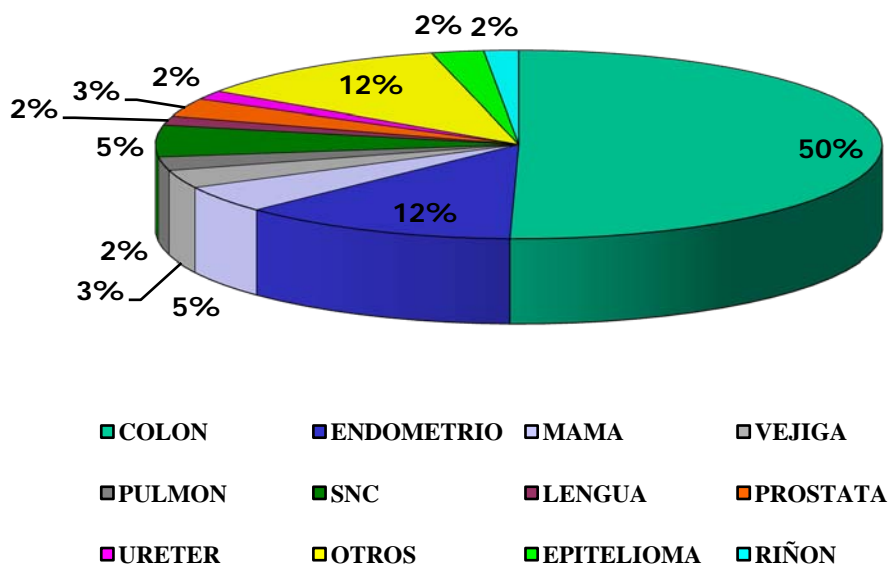


FIGURA 35

Representación del grupo OTROS

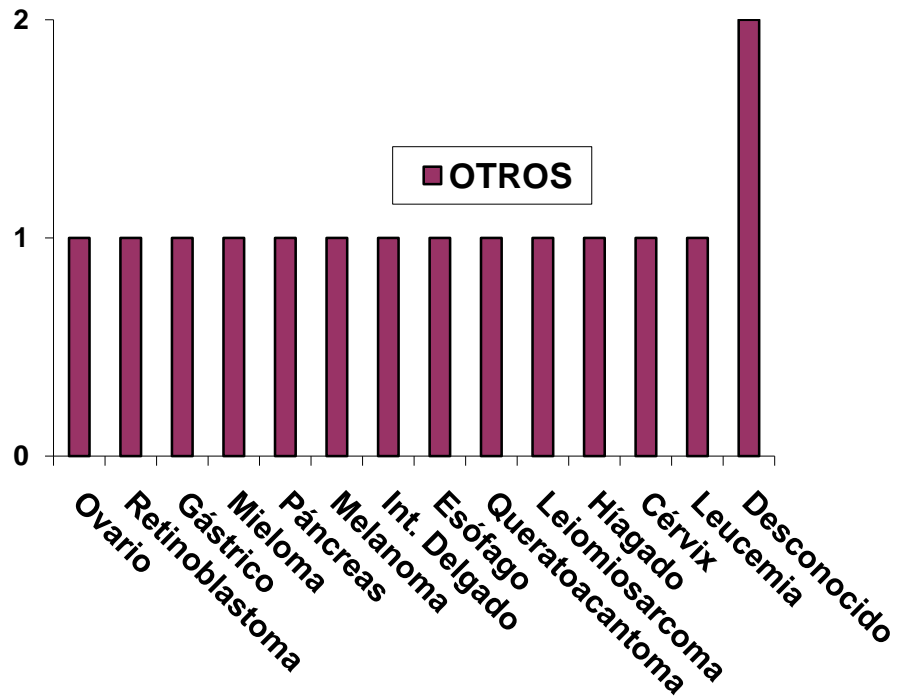


FIGURA 36

Relación por sexos de pacientes con tumores múltiples

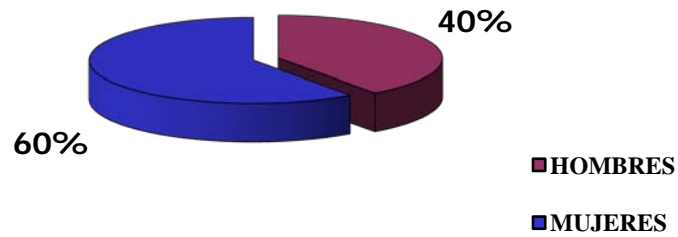


FIGURA 37

Proporción de pacientes con tumores múltiples

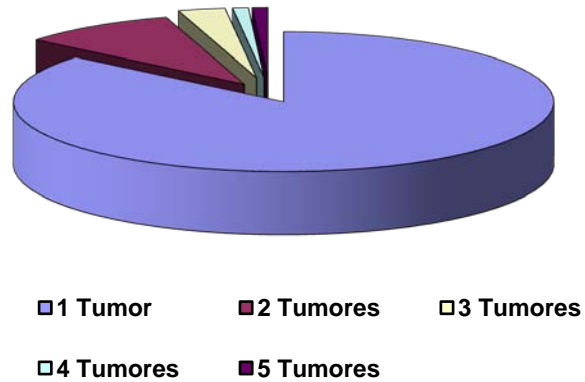
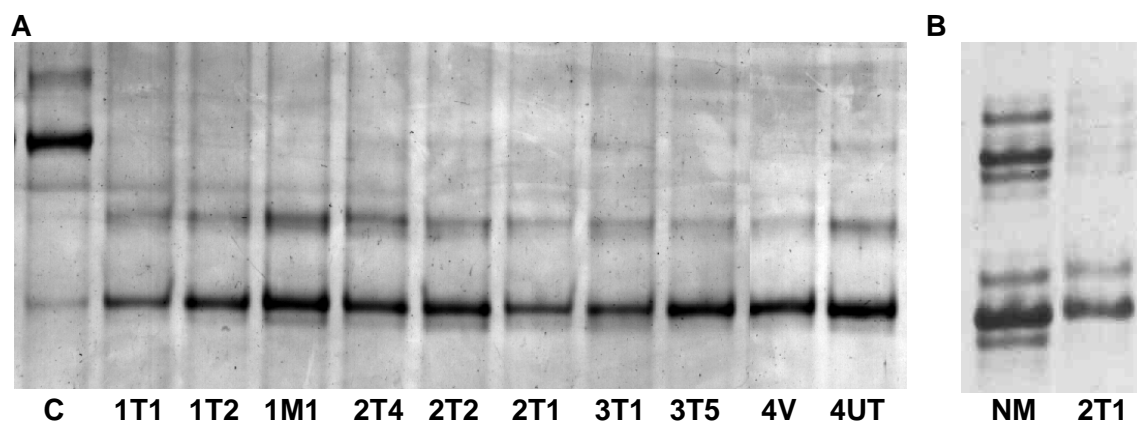


FIGURA 38

Resultados de k-ras y LOH



A.- Falta de mutación en el codón 12 de *k-ras* en todos los tumores analizados. C: Control positivo para la mutación.

B. LOH en TP53 en el cáncer de colon izquierdo del paciente n°2. NM-mucosa normal. 2T1-Tumor

FIGURA 39

Representación del espectro tumoral en familias con mutación

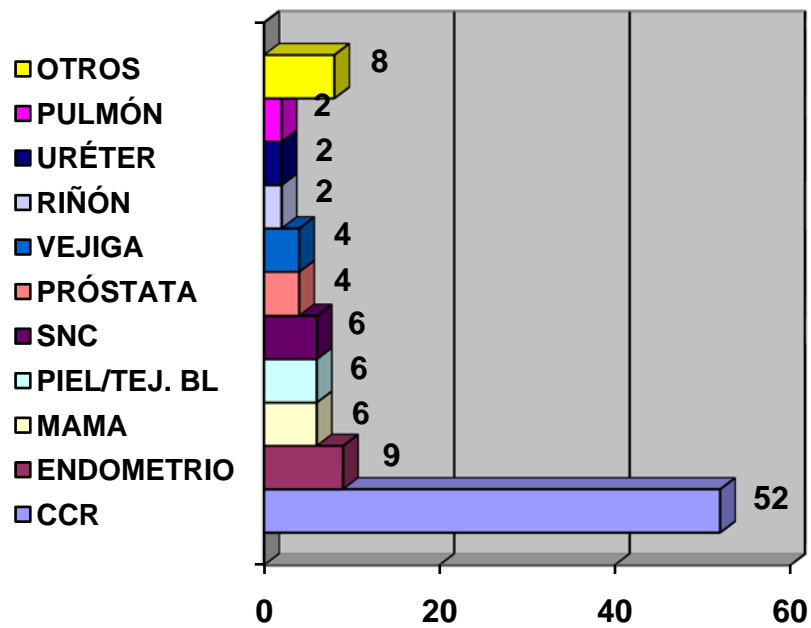
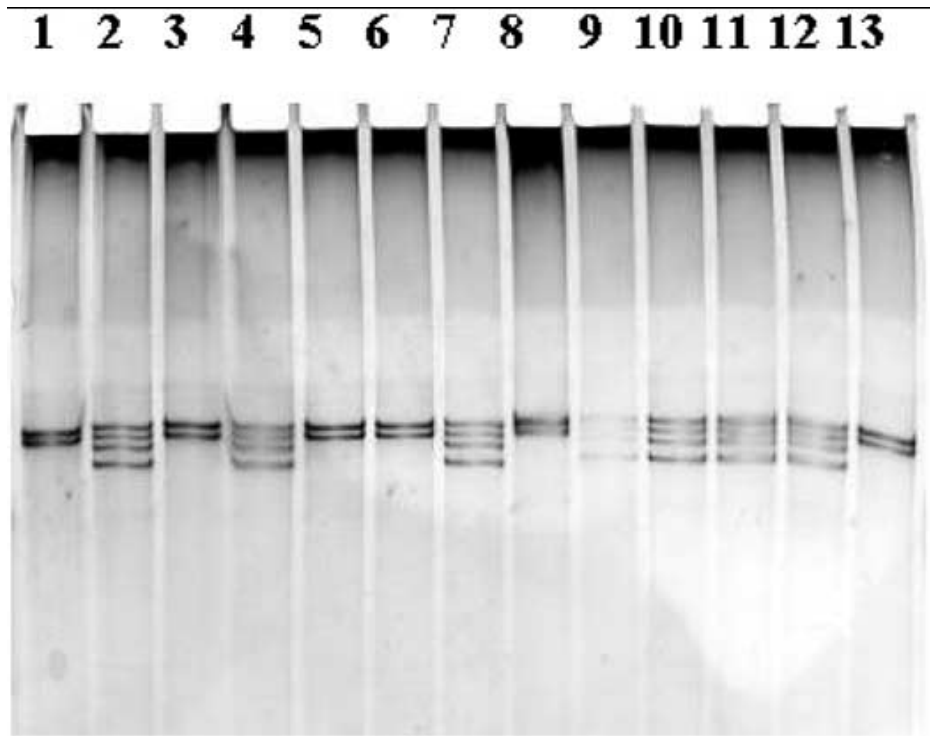


FIGURA 40

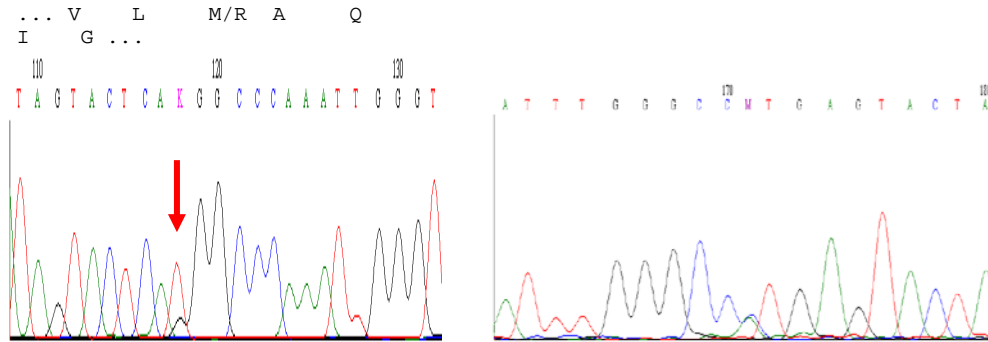
Gel con banda aberrante



Los patrones de migración aberrantes se pueden observar en las líneas
1, 3, 5, 6, 8 y 13

FIGURA 41

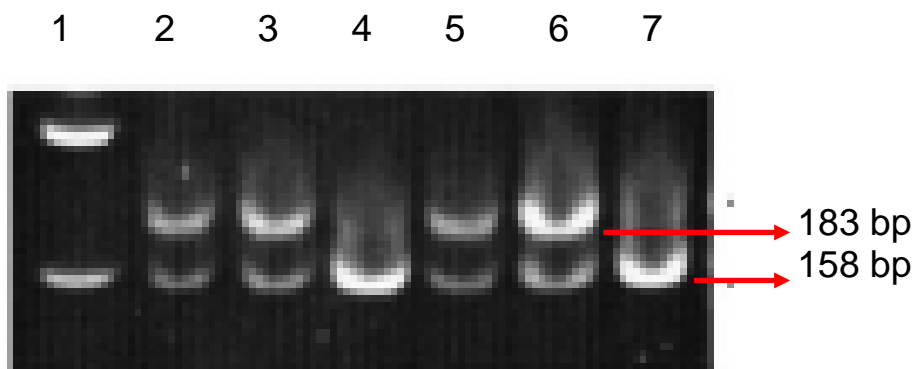
Productos de la PCR exón 13 *MSH2*



Secuenciación directa de los productos de la PCR del exón 13 del gen *MSH2* en un paciente guía heterocigoto para la mutación M688R. El panel de la izquierda muestra la ventana del trazado anterógrado, centrado en el doble pico (K=T/G) que codifica la mutación no conservadora M668R. El panel de la derecha corresponde al trazado retrógrado.

FIGURA 42

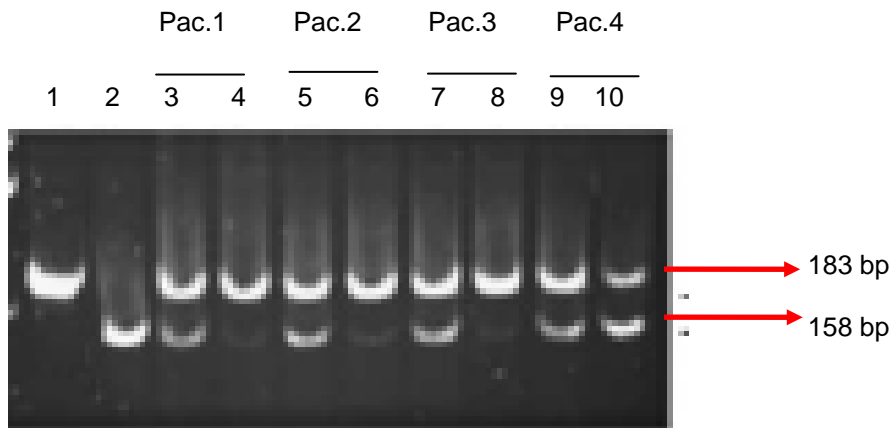
Comparación individuos MR / MM



Los productos de la amplificación de parte del exón 13, flanqueando la mutación c.2063T>G (M688R) se digirieron con *Hsp92II*. La línea 1 muestra el marcador *pUC19/HaeIII*; las líneas 2, 3, 5 y 6 corresponden a los individuos heterocigotos MR portadores de mutación, mientras que las líneas 4 y 7 son homocigotos MM

FIGURA 43

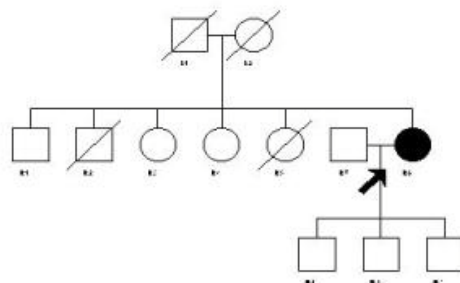
Pacientes con LOH



A partir de muestras de sangre periférica (líneas 3, 5, 7 y 9) y de los tumores (líneas 4, 6, 7 y 10) se obtuvo DNA mediante PCR. Parte de la región del exón 13 se amplificó y digirió con Hsp92II. Los fragmentos de 158 bp representan el alelo wild-type (línea 2) y los de 183 bp corresponden a la mutación (c.2063T>G, M688R) en la línea 1. Los pacientes 1, 2 y 3 muestran pérdida de heterocigosidad en el tumor, mientras que el paciente 4 conserva ambos alelos.

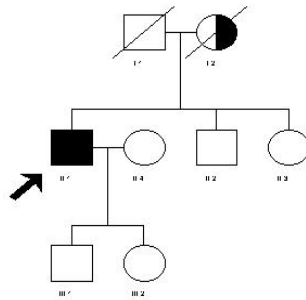
FIGURA 44

Árbol genealógico de CCR esporádico



Árbol genealógico típico de cáncer de colon esporádico. Nótese la ausencia de otros antecedentes tumorales en la familia.

FIGURA 45
Árbol genealógico dudoso



Árbol genealógico de una familia que no cumple los Criterios de Ámsterdam pero sí los de Bethesda para seleccionar familias con cierta agregación familiar

FIGURA 46
Árbol genealógico típico de HNPCC

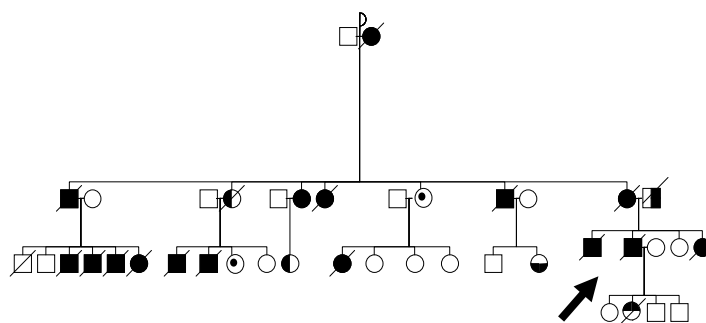


FIGURA 47

Comparativa de los tumores más frecuentes

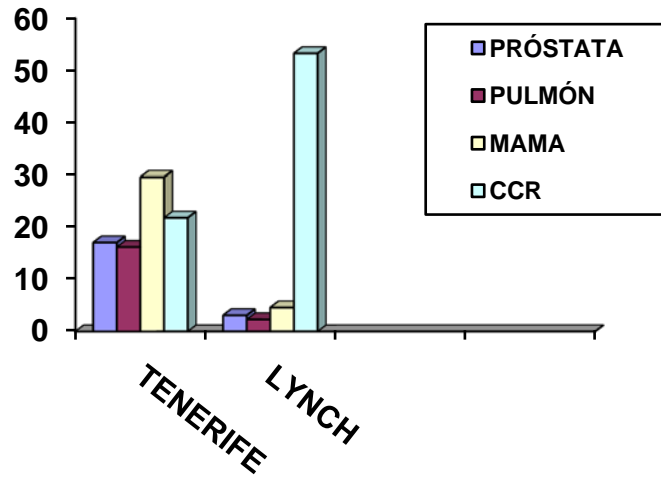


FIGURA 48

Comparativa de los tumores CCR, endometrio y mama

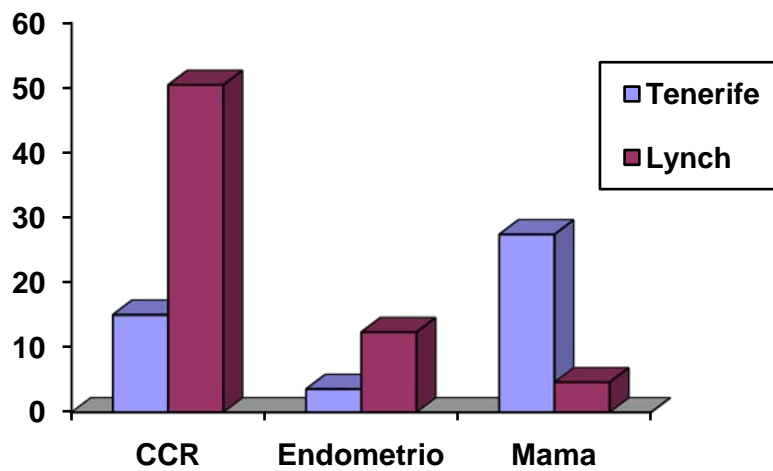


FIGURA 49
Familia abuela paterna

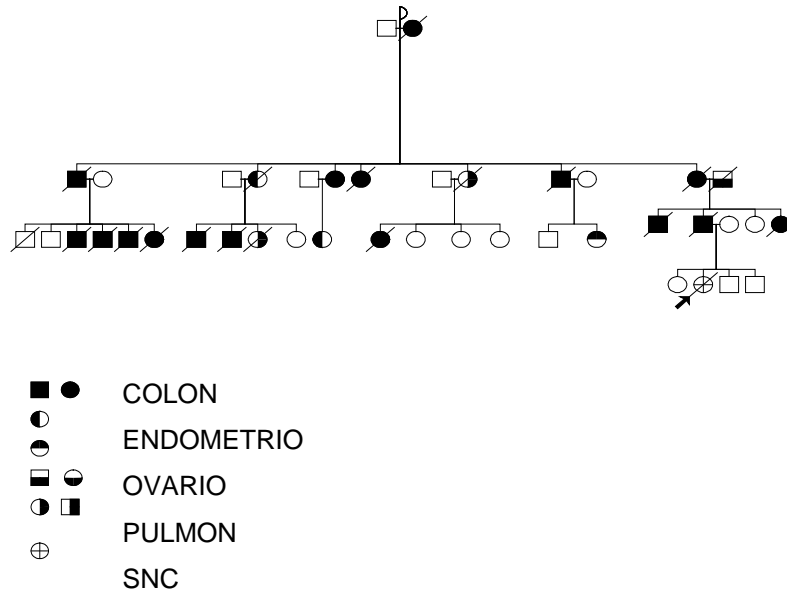


FIGURA 50
Familia abuelo paterno

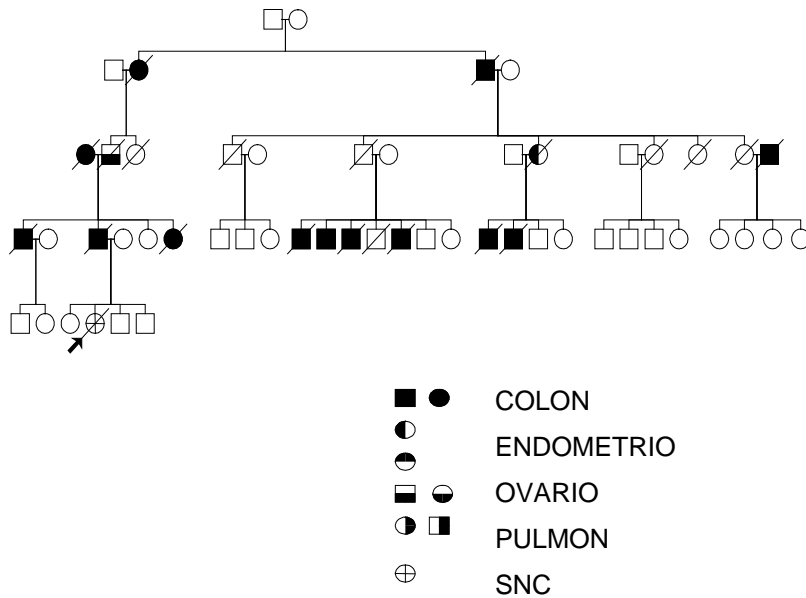


FIGURA 51
Positividad para desmina (Peroxidasa X200)

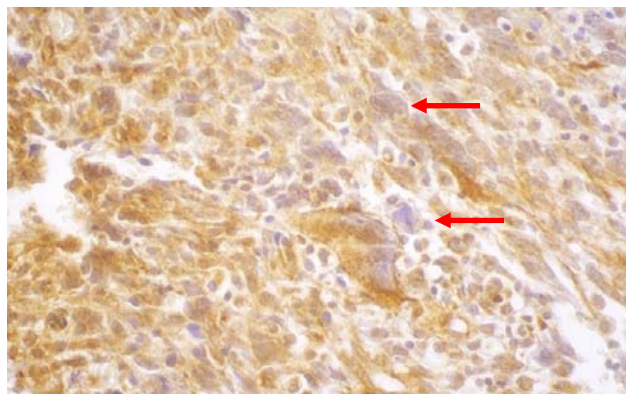


FIGURA 52
Metástasis pulmonares (Hematoxilina-Eosina x100).

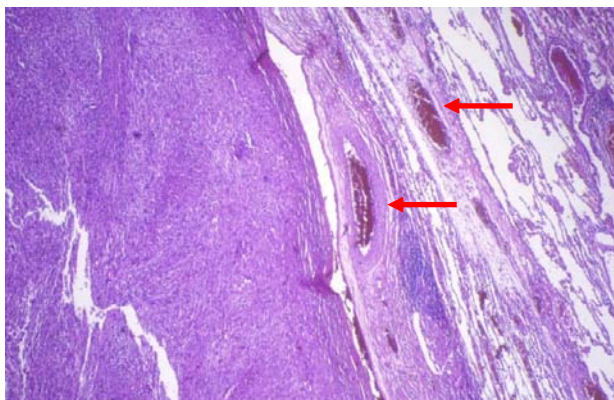


FIGURA 53

Árbol genealógico de la familia donde se estudió la relación MSI-tumores sincrónicos y metacrónicos

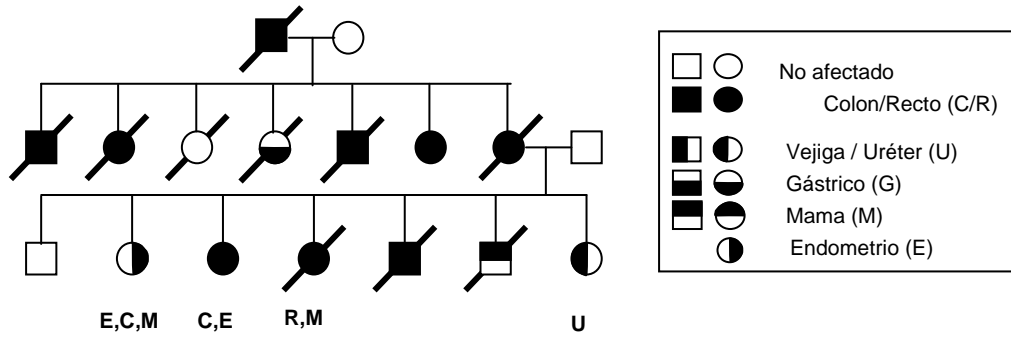


FIGURA 54

Secuenciación de *MSH2* en la escala filogenética

```

MSH2 HUMAN P43246( 666) IITGPNMGGKSTYIRQTGVIVLMAQIGCFVPCESAEVSIVDCI 32
MSH2 MOUSE P43247( 666) IITGPNMGGKSTYIRQTGVIVLMAQIGCFVPCESAEVSIVDCI 32
MSH2 RAT P54275 ( 666) IITGPNMGGKSTYIRQTGVIVLMAQIGCFVPCESAEVSIVDCI 32
MSH2 YEAST P25847 ( 685) IITGPNMGGKSTYIRQVGVISLMAQIGCFVPCEEAEIIVDAI 37
    
```

FIGURA 55
Mecanismo de acción de los ARN de interferencia

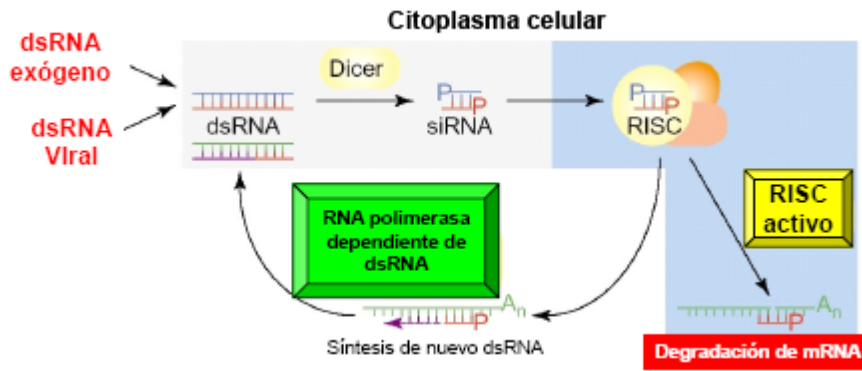
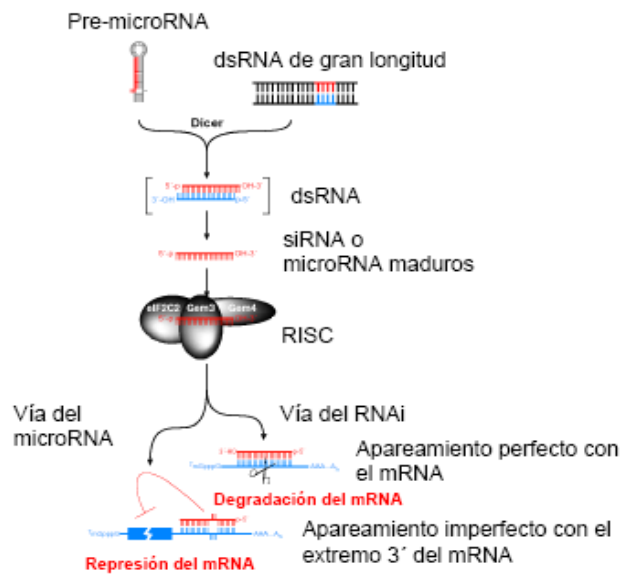


FIGURA 56
Convergencias y divergencias en miARN e iARN



TABLAS

TABLA 1**Recomendaciones seguimiento para HNPCC**

Órgano	Examen	Comienzo	Frecuencia
Colon y recto	Colonoscopia	20-25	Cada 2 años
Endometrio	Examen ginecológico y eco transvaginal	30-35	1-2 años
Ovario	Ecografía de pelvis y CA 125	30-35	1-2 años
Tracto urinario	Ecografía y citología de orina	30-35	2-3 años
Estómago	Endoscopia alta	30-35	1-2 años

TABLA 2

Riesgo relativo según antecedentes

Riesgo general	3-6
<i>Pólipos:</i>	
1. <i>Historia familiar</i>	4-7
2. <i>Historia personal:</i>	
• < 1 cm Φ	3-6
• • 1cm Φ	9-18
<i>Historia familiar de CCR:</i>	
1. <i>1 familiar de 1º grado</i>	
• < 45 años	15-30
• 45-55 años	6-25
• 70 años	3-6
2. <i>Familiar de 1º grado y otro</i>	10
a. <i>de 2º grado</i>	
3. <i>Dos familiares de 2º grado</i>	15-30
4. <i>HNPCC: Estado de</i>	35-45
a. <i>mutación desconocido</i>	
5. <i>Portador de mutación de un</i>	70-90
a. <i>gen asociado a HNPCC</i>	
6. <i>PAF (sin comprobación clínica</i>	40-45
a. <i>y mutación desconocida)</i>	
7. <i>Portador de mutación APC</i>	0-90

TABLA 3**Secuencias de los cebadores de los microsatélites utilizados**

Microsatélite	Locus	Cebadores (5' → 3')
Panel estandarizado		
BAT25	4q12-4q12	F: TCGCCTCCAAGAATGTAAGT R: TCTGCATTTTAACTATGGCTC
BAT26	<i>hMSH2</i>	F: TGACTACTTTTGACTTCAGCC R: AACCATTC AACATTTTAAACCC
D2S123	<i>hMSH2</i>	F: AAACAGGATGCCTGGCCTTT R: AGGACTTTCCACCTATGGGAC
D5S346	<i>APC</i>	F: ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG R: AGCAGATAAGACAGTATTACTAGT
D17S250	<i>P53</i>	F: GGAAGAATCAAATAGACAAT R: GCTGGCCATATATATATTTAAACC
Panel adicional		
D2S391	<i>hMSH2</i>	F: ATGGAGCCAGTAGGTTACAGC R: GGTGAGAGGGTATGATGGAA
2S288	<i>hMSH2</i>	F: AGGGCCTTGCTCTGGATT R: GGCCAGTGATTGTTCCCC
D2S378	<i>hMSH2</i>	F: TGTGGGCTGGTCAGATATTC R: CGCTAGGATCACTATGTTTTGC
D2S136	<i>hMSH2</i>	F: AGCTTGAGACCTCTGTGTCC R: ATTCAGAAGAAACAGTGATGGT
D3S1029	<i>hMLH1</i>	F: ATACTCTGGACCCAGATTGATTAC R: TAATTCCCAAATGGTTTAGGGGAG
D3S1611	<i>hMLH1</i>	F: CCCCAAGGCTGCACTT R: AGCTGAGACTACAGGCATTTG
D3S1298	<i>hMLH1</i>	F: AGCTCTCAGTGCCACCCC R: GAAAAATCCCCTGTGAAGCG
D3S1561	<i>hMLH1</i>	F: TAAGTCCCAGAGGCAAAGG R: CGCTAAACTATCCACAGGACAC
AC1	<i>APC/MCC</i>	F: CTATGTAGTGGCCGTTCTTTTG R: CAGCCCCACAGGTCTTTTGT
MBC	<i>APC/MCC</i>	F: ACCACTGGACTCCAGCCTGG R: GTGTTGGCAATGCAGTAGTG
D5S107	<i>APC</i>	F: GGCATCAACTTGAACAGCAT R: GATCCACTTTAACCCTAAATA

D17S1176	<i>TP53</i>	F: ACTGCCATCCCTTGCCCAATTC R:AGGGATACTATTCAGCCCGAGGTG
D17S578	<i>TP53</i>	F: CTGGAGTTGAGACTAGCCT R: CTATCAATAAGCATTGGCCT
D18S74E	<i>DCC</i>	F: AGTAATGGTCCAGGCCCTGG R: GACCGGAATATCTGATTATC

TABLA 4

Composición de los geles de acrilamida al 5%

	Fino 0.75 mm
% ACRILAMIDA	5
TBE 5X (ml)	4.5
ACRILAMIDA 30% (ml)	3.75
H ₂ O HASTA (ml)	22.5
APS (μl) A 250 mg/ml	50
TEMED (μl)	10

TABLA 5**Índice de participación en las familias**

<i>Nº Familia</i>	<i>Miembros</i>	<i>Fallecidos</i>	<i>Participantes</i>	<i>%</i>
1	137	18	106	89.07
2	116	32	54	64.28
3	57	16	36	87.8
4	36	2	29	85.29
5	20	0	13	65
6	46	12	17	50
7	26	4	13	59.09
8	33	11	12	54.54
9	28	3	20	80
10	42	4	21	55.26
TOTAL	541	102	321	73.12

TABLA 6**Número de tumores y edad media de cada familia**

<i>Nº familia</i>	<i>Nº miembros</i>	<i>Nº tumores</i>	<i>Edad 1º tumor</i>
1	137	31	51.4
2	116	25	46.6
3	57	25	52.1
4	36	3	44
5	20	3	44
6	46	21	49.2
7	26	6	48.7
8	33	7	57.1
9	28	3	57.5
10	42	5	38.1
TOTAL	541	129	48.9

TABLA 7**Localizaciones de los tumores en las familias**

Localización	Familia										TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Colon	11	18	13	1	2	11	2	3	2	2	65
Endometrio	3	2	4	0	1	3	1	1	1	0	16
Mama	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Vejiga	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Pulmón	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	3
Cerebro	0	1	2	0	0	2	0	1	0	1	7
Uréter	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Ovario	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Próstata	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1	4
Retinoblastoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Gástrico	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Mieloma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Páncreas	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Melanoma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Esófago	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hígado	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Cérvix	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Lengua	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
Queratoacantoma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Riñón	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Leucemia	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Epitelioma	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3
Leiomiocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Intestino delgado	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Desconocido	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
TOTAL	31	25	25	3	3	21	6	7	3	5	129

TABLA 8

Relación de pacientes con tumores múltiples

PACIENTE	ASOCIACIÓN
1	COLON + MAMA
2	VEJIGA + VEJIGA
3	ENDOMETRIO + COLON + MAMA
4	COLON + ENDOMETRIO
5	COLON + MAMA
6	ENDOMETRIO + VEJIGA + URÉTER
7	COLON + COLON + COLON + VEJIGA + EPITELIOMA
8	COLON + PRÓSTATA
9	ENDOMETRIO + URÉTER
10	MELANOMA + EPITELIOMA + PRÓSTATA
11	ENDOMETRIO + RIÑÓN + PIEL + COLON
12	COLON + ENDOMETRIO
13	COLON + ENDOMETRIO
14	COLON + PULMÓN
15	COLON + ENDOMETRIO

TABLA 9
Estatus MSI en los tumores estudiados

Paciente	Localización	Tipo tumor	Edad	% de marcadores con inestabilidad	MSI
1	Endometrio	Primario	52	25 (3/12)	L
	Colon drcho	Metacrónico		44.4 (4/9)	H
	Mama	Metacrónico		41.7 (5/12)	H
2	Colon Izdo	Primario	44	50 (6/12)	H
	Colon Izdo	Recurrencia		40 (4/10)	H
	Endometrio	Metacrónico		20 (1/5)	L
3	Recto	Primario	58	100 (5/5)	H
	Mama	Sincrónico		-	-
	Recto	Recurrencia		60 (3/5)	H
4	Vejiga	Sincrónico	69	63.7 (7/11)	H
	Uréter	Sincrónico		45,4 (5/11)	H

TABLA 10**Distribución de los tumores y su localización en las 5 familias con la mutación M688R de *MSH2***

<i>Localización</i>	<i>Familias</i>					<i>Total</i>
	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	
Colon	11	18	13	9	2	52
Endometrio	3	2	4	1	0	9
Mama	6	0	0	0	0	6
Piel / Partes blandas	1	2	2	1	0	6
Cerebro	0	1	2	2	1	6
Próstata	1	0	2	0	1	4
Vejiga	3	1	0	0	0	4
Riñón	0	0	2	1	0	2
Uréter	1	0	1	0	0	2
Pulmón	0	1	0	1	0	2
Lengua	0	0	0	0	1	1
Esófago	1	0	0	0	0	1
Estómago	1	0	0	0	0	1
Intestino delgado	1	0	0	0	0	1
Ovario	0	0	1	0	0	1
Mieloma	1	0	0	0	0	1
Leucemia	0	0	0	1	0	1
Ojo	1	0	0	0	0	1
Total	31	23	26	16	5	101

TABLA 11**Distribución de la mutación M688R en los familiares con y sin tumores**

	<i>Presencia de tumor</i>	<i>Ausencia de tumor</i>
Presencia de mutación	18 (94.7%)	19 11.2%
Ausencia de mutación	1 5.3%	150 88.08%
TOTAL	19	169
p	<0.001	