

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina**



**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN CLINICO- BIOLÓGICA DE  
PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL. CRIBADO  
POBLACIONAL DE SÍNDROME DE LYNCH**

M<sup>a</sup> del Rosario Vidal Tocino

2016



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina**

**EL DR. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ Y EL DR. ROGELIO GONZÁLEZ  
SARMIENTO, CATEDRÁTICOS DE MEDICINA DEL DEPARTAMENTO DE  
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo titulado “Caracterización clínico-biológica de pacientes con cáncer colorrectal. Cribado poblacional de síndrome de Lynch”, que presenta la Licenciada en Medicina y Especialista en Oncología Médica, Dña. M<sup>a</sup> del Rosario Vidal Tocino, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Medicina, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y pueda optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca a 12 de Julio de 2016.

Prof. Dr. Juan Jesús Cruz Hernández

Prof. Dr. Rogelio González Sarmiento



Trabajo parcialmente financiado por el Proyecto de Investigación del Instituto de Salud Carlos III FIS: PI10/00219. 2010-2013. “Caracterización de alteraciones genéticas y epigenéticas comunes a tumores asociados al Síndrome de Lynch”.



## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis doctoral, el **Prof. Dr. D. Juan Jesús Cruz Hernández** y al **Prof. Dr. D. Rogelio González Sarmiento**. Son muchas las palabras de agradecimiento que podría dedicarles a cada uno de ellos y, probablemente, no serían suficientes. Gracias por confiar en mí desde el principio, gracias por las palabras de aliento en los momentos difíciles, gracias por la paciencia para conmigo, gracias por todo lo que me enseñáis y gracias por el incansable trabajo que realizáis día tras día que, sin duda, son la mejor motivación para los jóvenes investigadores como yo. Gracias!

Al equipo del **laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer y del laboratorio de biología molecular de la facultad de Medicina**, por su ayuda y por su apoyo. Muy especialmente a **Jessica Pérez García**, por su paciencia, por su inestimable ayuda y, sobre todo, por su cercanía y por su amistad. Gracias por facilitarme tanto las cosas, sabes que este trabajo sin ti no hubiera sido lo mismo, quizás no hubiera sido posible.

Al **Servicio de Oncología Médica** del C. A. Universitario de Salamanca, a mis compañeros. Cuando este proyecto empezó, yo era una recién llegada y, desde el principio me sentí arropada, con el paso de los años me siento muy orgullosa de formar parte de esta gran familia que es el Servicio de Oncología Médica del CAUSA. Trabajar con la complicidad y el saber hacer profesional y personal de todos vosotros no sólo es una suerte, es un privilegio, y me siento afortunada por ello. Gracias también por aguantar mi insistencia con “el reclutamiento de pacientes”. Gracias por vuestra ayuda. Por fin doy por terminada mi tesis!

Al **Servicio de Anatomía Patológica** del C. A. Universitario de Salamanca, especialmente, a los Drs. Magdalena Sancho de Salas y Ángel Santos-Briz, así como a su equipo de técnicos de laboratorio, por su colaboración con el proyecto.

Al **Departamento de Estadística** de la Universidad de Salamanca, especialmente a las Profs. **M<sup>a</sup> José Fernández** e **Inmaculada Barrera**, por su cercanía y su ayuda desinteresada.

A los **pacientes y a sus familias**, porque son el motivo de nuestros desvelos, el motivo de nuestro trabajo, y sin ellos nada de esto sería posible y nada tendría sentido.

A **mi familia**, sin duda, el motor y el aliento de mi vida. Gracias por estar siempre a mi lado, gracias por confiar siempre en mí, gracias porque hoy soy lo que soy porque vosotros lo hicisteis posible. Este trabajo es vuestro!

A **Nacho**, un día me dijiste “no te digo nada porque lo sabes todo”, hoy soy yo la que te devuelve esas palabras. Te Quiero Más.

A **Rodrigo**, perdón por el tiempo que te he robado.



*A mis papás, a mis bebés*



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
1- Epidemiología del cáncer colorrectal.....	19
2- Etiología del cáncer colorrectal.....	30
i. Edad.....	30
ii. Factores ambientales.....	30
1. Dieta.....	31
2. Estilo de vida.....	34
iii. Patología colónica previa.....	35
iv. Otras enfermedades y fármacos.....	36
v. Factores genéticos.....	38
1. Polimorfismos.....	38
2. Síndromes hereditarios.....	38
3- Bases clínicas de cáncer colorrectal.....	40
4- Bases moleculares del cáncer colorrectal.....	49
5- Síndromes hereditarios de predisposición al cáncer colorrectal.....	56
6- Síndrome de Lynch.....	59
7- Poliposis asociada a MYH.....	68
8- Implicaciones clínicas del desarrollo molecular del cáncer colorrectal.....	71
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>73</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
1- Pacientes y muestras.....	79
2- Estudio de IHQ de MLH1, MSH2 y MSH6.....	81
3- Análisis de mutaciones germinales de genes del sistema MMR y del gen MYH.....	82
4- Estudio de polimorfismos de la región promotora de MLH1: discriminación alélica mediante sondas TaqMan (Genotipado).....	93
5- Estudio de mutación somática V600E de BRAF: test Cobas®.....	94
6- Análisis estadístico de los resultados.....	95

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
1- Descripción general de la muestra .....	100
2- Análisis de las características clínico-biológicas en base a la expresión IHQ de MMR .....	106
3- Análisis de las características clínico-biológicas en base a los criterios clínicos de Síndrome de Lynch .....	115
4- Estudio molecular en pacientes con alteración en la expresión IHQ de genes MMR .....	124
i. Determinación de mutación germinal en genes del sistema MMR .....	124
ii. Determinación de mutación V600E de BRAF .....	127
iii. Estudio de pacientes con expresión IHQ no valorable de alguna de las proteínas reparadoras del DNA .....	130
5- Estudio molecular en pacientes con criterios clínicos de CCR hereditario y expresión IHQ de MMR normal.....	131
6- Estudio del polimorfismo c.-93G>A de la región promotora de MLH1.....	132
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>135</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>145</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>161</b>
Anexo 1: Consentimiento informado de la Unidad de Consejo Genético.....	163
Anexo 2: Consentimiento informado para Investigación .....	165
Anexo 3: Glosario.....	167
Anexo 4: Comunicaciones en congresos .....	169

# **INTRODUCCIÓN**

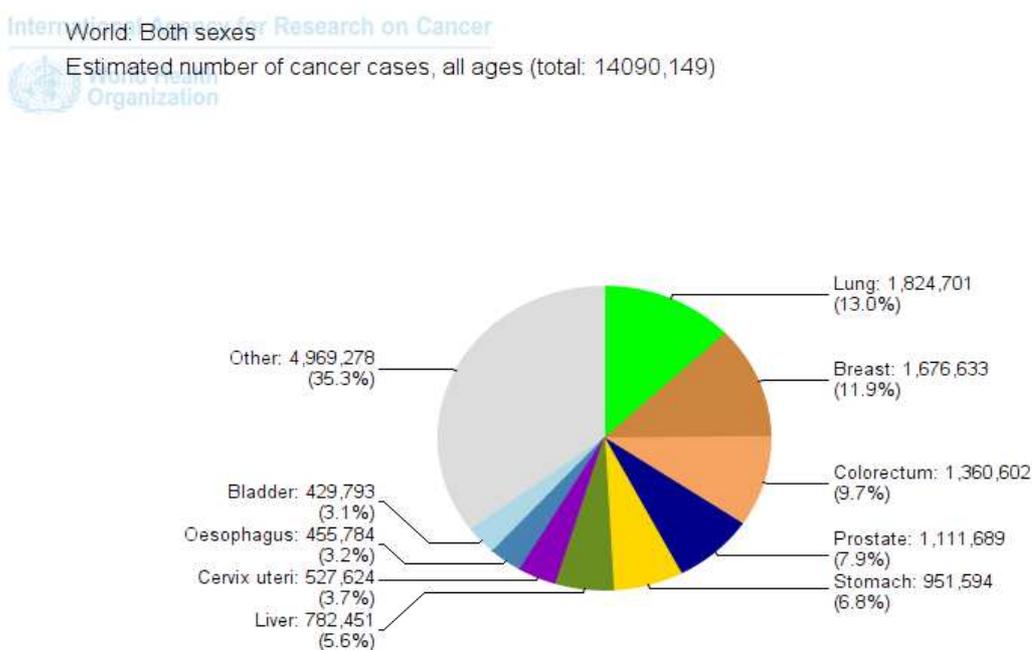


## INTRODUCCIÓN<sup>1</sup>:

El cáncer es un importante problema de salud pública. Esta enfermedad la padecen más de 14 millones de personas en todo el mundo, siendo causa de mortalidad en más de 8 millones de personas según los últimos datos de Globocan 2012 (IARC, 2014).

En función de la localización, la incidencia mundial de cáncer la encabeza el cáncer de pulmón, seguido de cáncer de mama y, en tercer lugar, se sitúa el cáncer colorrectal (Figura 1).

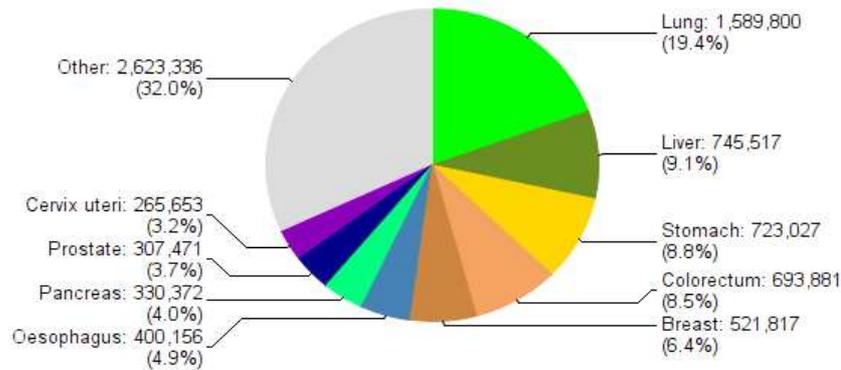
Atendiendo a la mortalidad, el cáncer de pulmón sigue ocupando el primer lugar, sin embargo, el cáncer de mama desciende en ese listado y el cáncer de colorrectal ocupa el cuarto puesto (Figura 2).



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 29.4.2014

Figura 1. Incidencia mundial de cáncer

World: Both sexes  
Estimated number of cancer deaths, all ages (total: 8201,030)  
World Health Organization



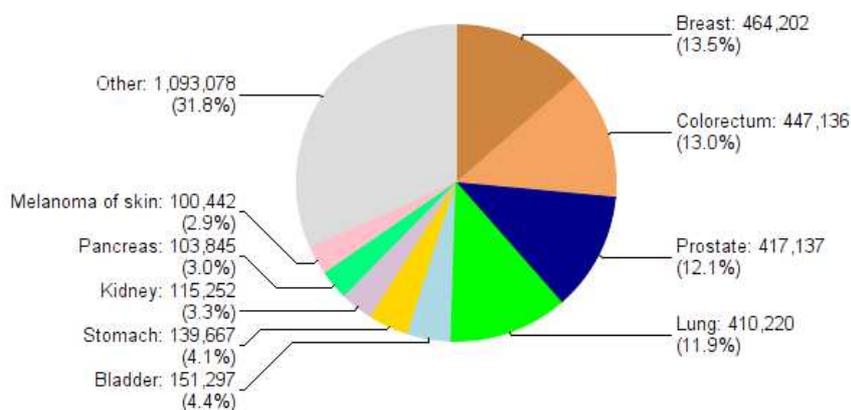
GLOBOCAN 2012 (IARC) - 29.4.2014

Figura 2. Mortalidad por cáncer en el mundo

Según esta misma fuente de datos, en Europa casi 3.5 millones de personas son diagnosticadas de cáncer y 1.7 millones de personas fallecen por el mismo.

Según el asiento tumoral, el cáncer de mama es la principal localización, seguido del cáncer colorrectal y el cáncer de próstata (Figura 3). Sin embargo, atendiendo a la mortalidad, el cáncer colorrectal sigue ocupando la segunda posición, pero por detrás del cáncer de pulmón (Figura 4).

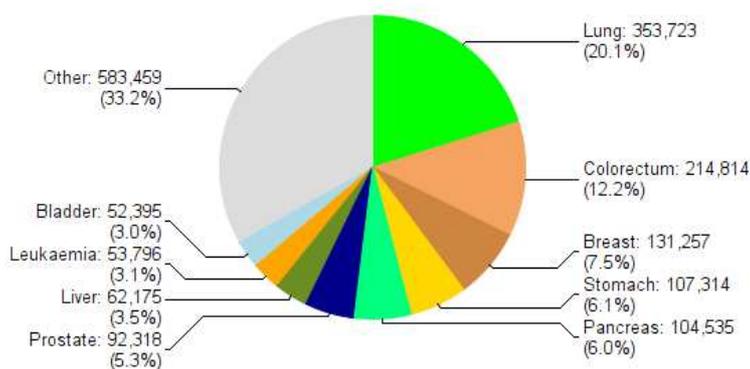
Europe: Both sexes  
 Estimated number of cancer cases, all ages (total: 3442,276)



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 24.8.2014

Figura 3. Incidencia por cáncer en Europa

Europe: Both sexes  
 Estimated number of cancer deaths, all ages (total: 1755,786)



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 24.8.2014

Figura 4. Mortalidad por cáncer en Europa

En nuestro país, los tumores son la principal causa de muerte en ambos sexos, con una Tasa Estandarizada (TE) de 2.07 por mil habitantes. Es la primera causa de mortalidad en varones (TE 2.55/mil) y la segunda en mujeres (TE 1.56/mil) tras las enfermedades cardiovasculares (Tabla1)<sup>2</sup>.

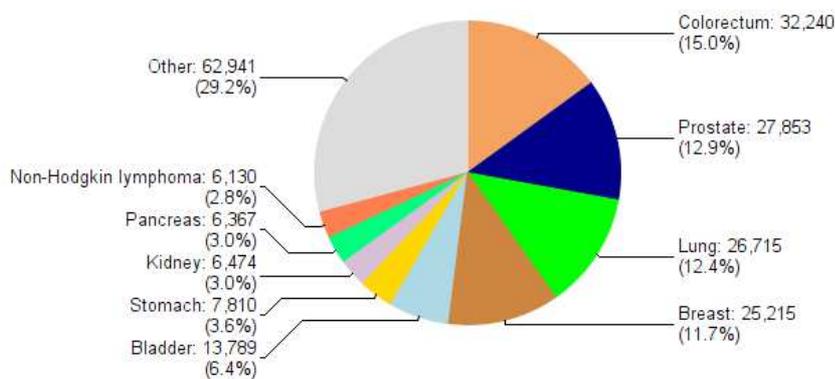
Tabla1. Causas de mortalidad en España, 2012

CAUSAS DE MORTALIDAD EN ESPAÑA, 2012	Ambos	Hombres	Mujeres
	TE (/mil)	TE (/mil)	TE (/mil)
Todas las causas	6,87	7,25	6,39
Enfermedades infecciosas y parasitarias (1)	0,11	0,12	0,11
<b>Tumores</b>	<b>2,07</b>	<b>2,55</b>	<b>1,56</b>
Enfermedades de sangre y de órganos hematopoyéticos, y ciertos trastornos que afectan al mecanismo de la inmunidad	0,03	0,02	0,03
Enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas	0,21	0,18	0,24
Trastornos mentales y del comportamiento	0,26	0,18	0,33
Enfermedades del sistema nervioso y de los órganos de los sentidos	0,36	0,28	0,44
Enfermedades del sistema circulatorio	1,99	1,88	2,08
Enfermedades del sistema respiratorio	0,76	0,88	0,63
Enfermedades del sistema digestivo	0,34	0,38	0,30
Enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo	0,02	0,01	0,03
Enfermedades del sistema osteomuscular y del tejido conjuntivo	0,06	0,04	0,08
Enfermedades del sistema genitourinario	0,19	0,17	0,2
Embarazo, parto y puerperio	0	..	0
Afecciones originadas en el periodo perinatal	0,02	0,02	0,01
Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	0,02	0,02	0,02
Sintomas, signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio, no clasificados en otra parte (2)	0,17	0,18	0,16
Causas externas de mortalidad	0,26	0,35	0,17

Fuente: INE ([www.ine.es](http://www.ine.es)).

Según datos de Globocan 2012, en España se producen 215.000 casos de cáncer (Figura 5) y fallecen por esta causa 100.000 personas (Figura 6).

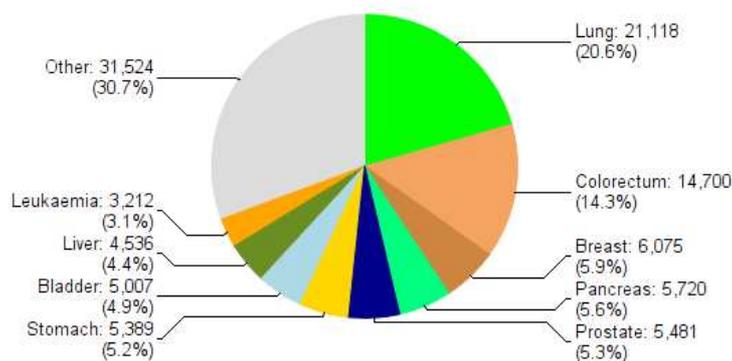
Spain: Both sexes  
 Estimated number of cancer cases, all ages (total: 215,534)  
 World Health Organization



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 24.8.2014

Figura 5. Incidencia por cáncer en España

Spain: Both sexes  
 Estimated number of cancer deaths, all ages (total: 102,762)  
 World Health Organization



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 24.8.2014

Figura 6. Mortalidad por cáncer en España

## 1- EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores malignos más frecuentes en los países occidentales. La gran mayoría son adenocarcinomas y parece que su incidencia está en aumento en los últimos años, debido en gran medida a la influencia de factores ambientales, así como al progresivo envejecimiento de la población<sup>3</sup>.

### **Incidencia**

Se estima que se producen en el mundo más de 14 millones de casos nuevos de cáncer, ocupando la localización colorrectal el tercer puesto (>1,6 millones casos) (Figura 1).

La incidencia de cáncer colorrectal es ligeramente superior en varones; sin embargo, en el grupo de los hombres ocupa la tercera posición en incidencia y, en mujeres, la segunda. Los tumores más frecuentes entre los hombres son el cáncer de pulmón y de próstata, seguidos del cáncer colorrectal. Por su parte, entre las mujeres el cáncer más incidente es el de mama, seguido del cáncer colorrectal (Figura 7)<sup>1</sup>.

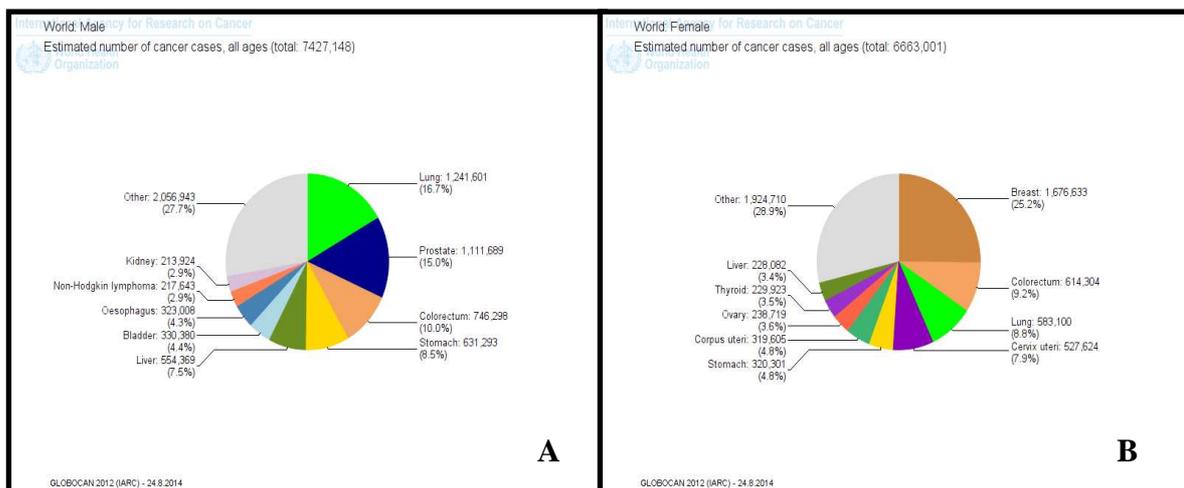


Figura 7. A, incidencia mundial por cáncer en hombres. B, en mujeres.

Su incidencia tiene clara variación en relación con áreas geográficas. De modo que zonas con un nivel mayor de desarrollo, como es el caso de Norteamérica o Europa occidental, tienen tasas de incidencia más elevadas; mientras que zonas de bajo desarrollo, como Asia y África, las tasas de incidencia son menores<sup>4</sup>.

Algunos estudios demuestran que individuos procedentes de zonas de baja incidencia, cuando emigran a zonas de incidencia más elevada, adquieren el riesgo del país de destino, lo que sugiere que estas diferencias están motivadas por factores ambientales<sup>5</sup>.

En Europa, la incidencia de cáncer colorrectal ocupa el segundo puesto tras el cáncer de mama. Se estima que se producen 447.136 casos de cáncer colorrectal, representando el 13% de todos los casos de cáncer en Europa (Figura 3).

Afecta a 241.813 varones, ocupando en estos el tercer puesto, tras el cáncer de próstata y el cáncer de pulmón. Por el contrario, en mujeres ocupa el segundo puesto, tras el cáncer de mama; sin embargo afecta a un número menor de mujeres que de varones, 205.323 mujeres (Figura 8)<sup>1</sup>.

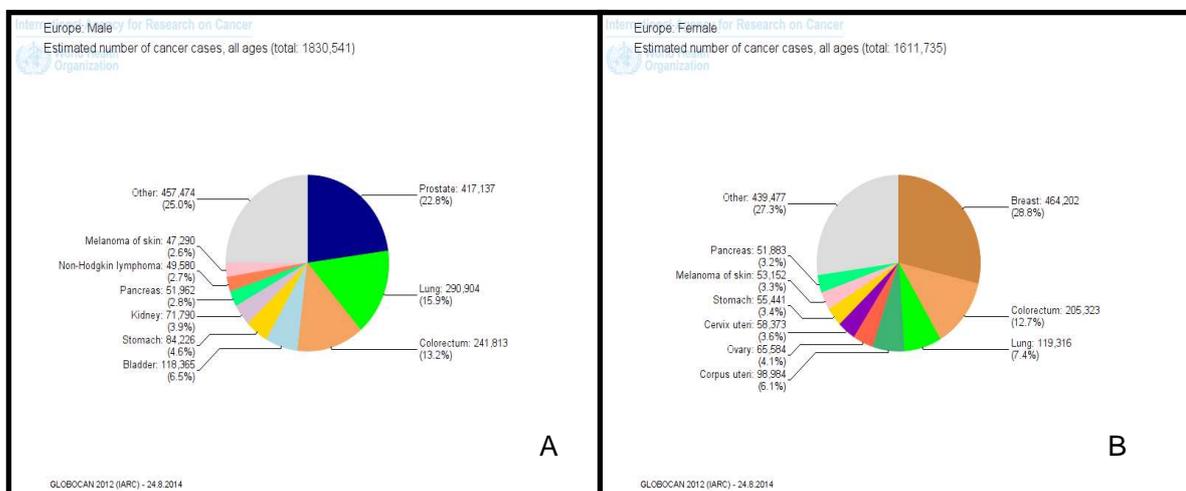


Figura 8. A, incidencia por cáncer en Europa, en hombres. B, en mujeres.

En España se diagnostican unos 215.000 casos de cáncer al año, siendo el cáncer colorrectal el más frecuente de todos los tumores en términos absolutos. Le siguen en frecuencia el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama (Figura 5).

Atendiendo al sexo, el cáncer colorrectal es el tercer tumor más frecuente entre los varones, tras el cáncer de próstata y el cáncer de pulmón, representando un 15% de todos los tumores en los hombres (19.261 casos). En mujeres, es el segundo tumor más frecuente, tras el cáncer de mama, representa el 14.9% de todos los tumores en féminas, afectando a 12.979 mujeres (Figura 9)<sup>1</sup>.

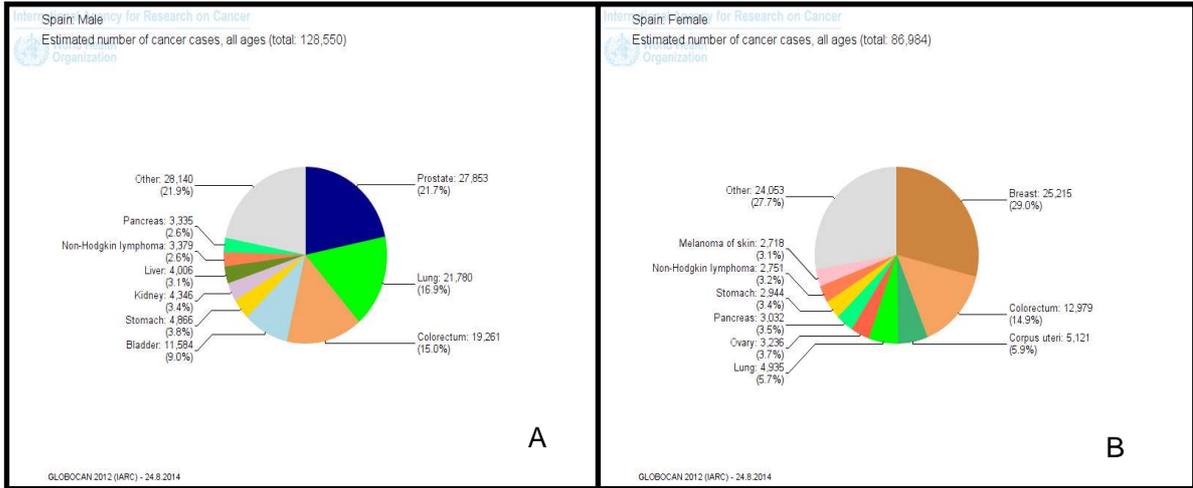


Figura 9. A, incidencia por cáncer en España, en hombres. B, en mujeres.

### Mortalidad

La mortalidad por cáncer colorrectal se sitúa en el cuarto puesto en el mundo, tras el cáncer de pulmón, el cáncer de hígado y el cáncer de estómago. Representa el 8.5% de las muertes por cáncer, cobrándose la vida de más de 690.000 personas en el mundo (Figura 2).

En varones produce más de 370.000 muertes, mientras que en mujeres es causa de 320.000 fallecimientos. Aunque en números absolutos la mortalidad por cáncer colorrectal en el mundo es mayor en varones, representa la cuarta causa de muerte por cáncer; mientras que en mujeres, representa la tercera causa de muerte tras el cáncer de mama y el cáncer de pulmón (Figura 10)<sup>1</sup>.

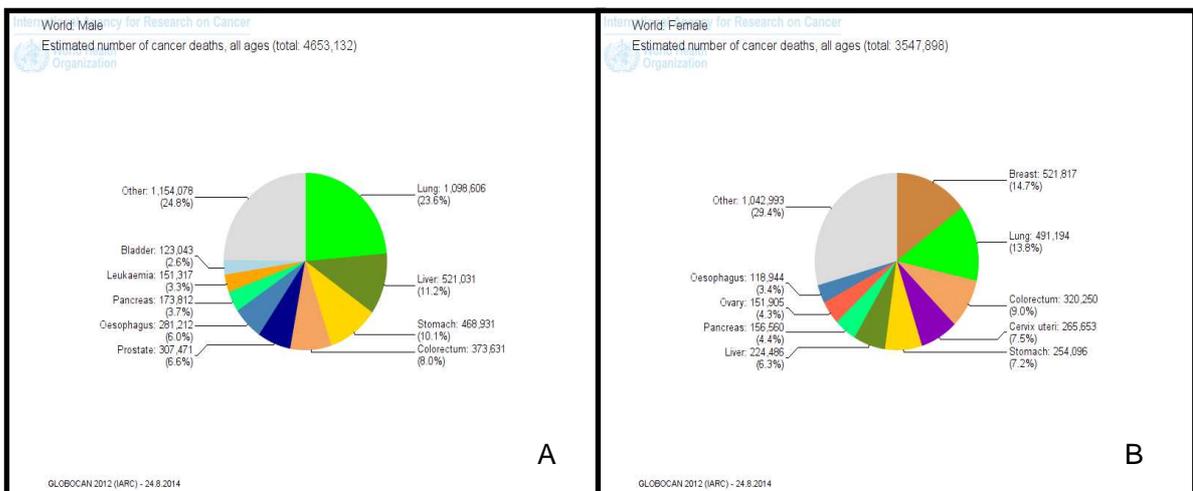


Figura 10. A, mortalidad por cáncer en el mundo, en hombres. B, en mujeres.

En Europa, el cáncer colorrectal es la principal causa de muerte por cáncer tras el cáncer de pulmón. Representa el 12.2% de todos los fallecimientos por cáncer; cerca de 215.000 las personas fallecen por cáncer colorrectal en Europa (Figura 4).

Es la segunda causa de muerte por cáncer tanto en varones, tras el cáncer de pulmón, como en las mujeres, tras el cáncer de mama. Representa el 11,6% de todos los fallecimientos por cáncer en varones y el 13% en mujeres (Figura 11)<sup>1</sup>.

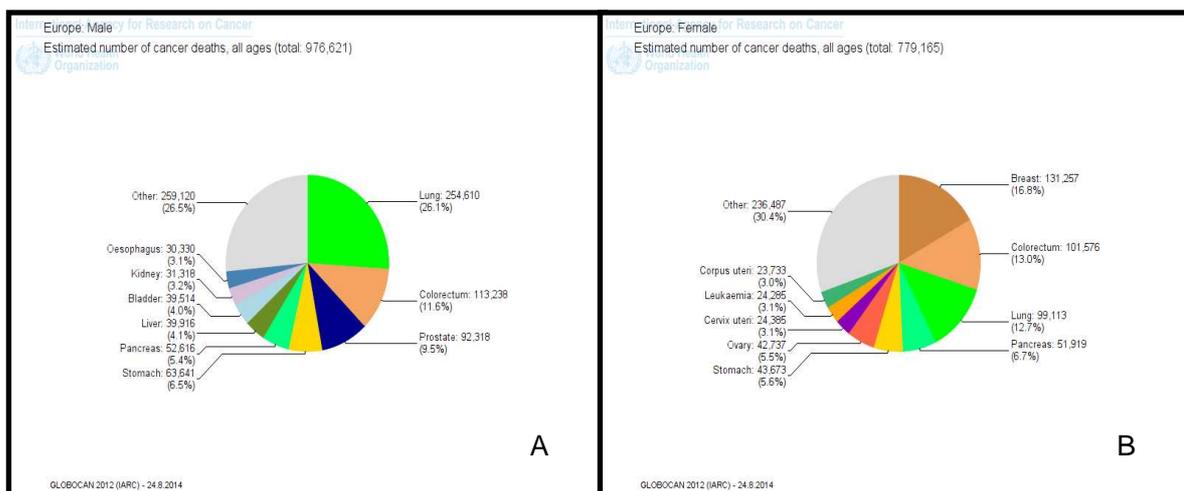


Figura 11. A, mortalidad por cáncer en Europa, en hombres. B, en mujeres.

En los últimos años, la mortalidad por cáncer muestra un patrón favorable en los países desarrollados, concretamente, en la Unión Europea este descenso en mortalidad por cáncer se observa a partir del año 1988 en varones, siendo anterior en mujeres (1970).

El cáncer colorrectal sigue esa misma tendencia, de manera que en hombres la tendencia descendente se observa a partir de los años 90, mientras que en las mujeres esta tendencia es favorable en todo el periodo estudiado por este grupo de autores (1970-2003), aunque es a partir de los años 90 cuando el impacto es mayor<sup>6</sup>.

En la figura 12 se representa la tendencia de mortalidad por cáncer colorrectal en hombres y en mujeres; la curva inferior representa esta tendencia en todas las edades y, la superior, sólo para las edades comprendidas entre 35-64 años.

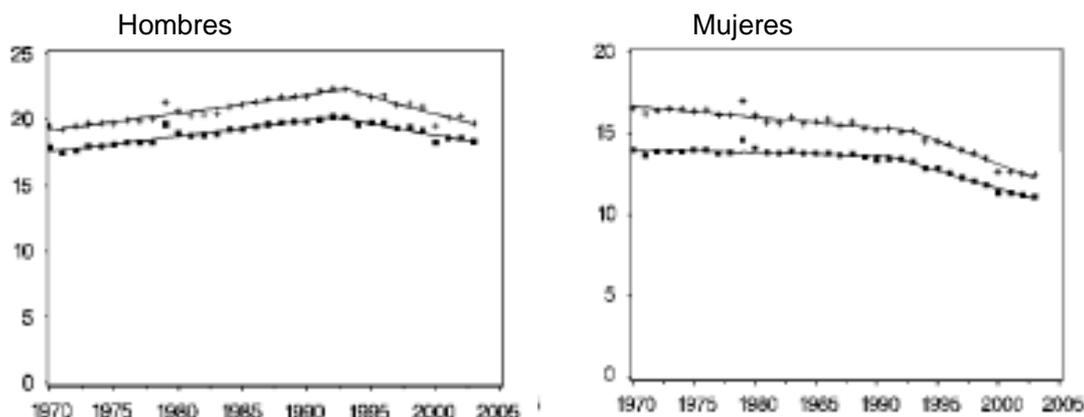


Figura 12. Tendencia de mortalidad por cáncer colorrectal en Europa, 1970-2003<sup>6</sup>.

La incidencia del cáncer colorrectal se ha visto incrementada en los últimos años como demuestran las publicaciones al respecto. En este sentido, la mortalidad en números absolutos, también ha sufrido un aumento; sin embargo, la tendencia es descendente, como demuestran los análisis publicados por Ferlay o por Bosetti<sup>6-8</sup>. Estos autores explican esta tendencia descendente de mortalidad por modificaciones de los factores de riesgo, aunque el diagnóstico precoz y las innovaciones terapéuticas tendrían efecto sobre estas tendencias.

En España, la mortalidad por cáncer colorrectal ocupa la segunda posición tras el cáncer de pulmón. Representa el 14.3% de las muertes por cáncer, falleciendo por esta causa 14.700 personas (Figura 6).

Atendiendo al sexo, el cáncer colorrectal es la segunda causa de muerte por cáncer en varones, tras el cáncer de pulmón y, en mujeres, tras el cáncer de mama. En términos absolutos, fallecen por cáncer colorrectal, 8.742 hombres (13.7% de todos los fallecimientos por cáncer en varones) y 5.958 mujeres (15.2% de las muertes por cáncer en mujeres) (Figura 13)<sup>1</sup>.

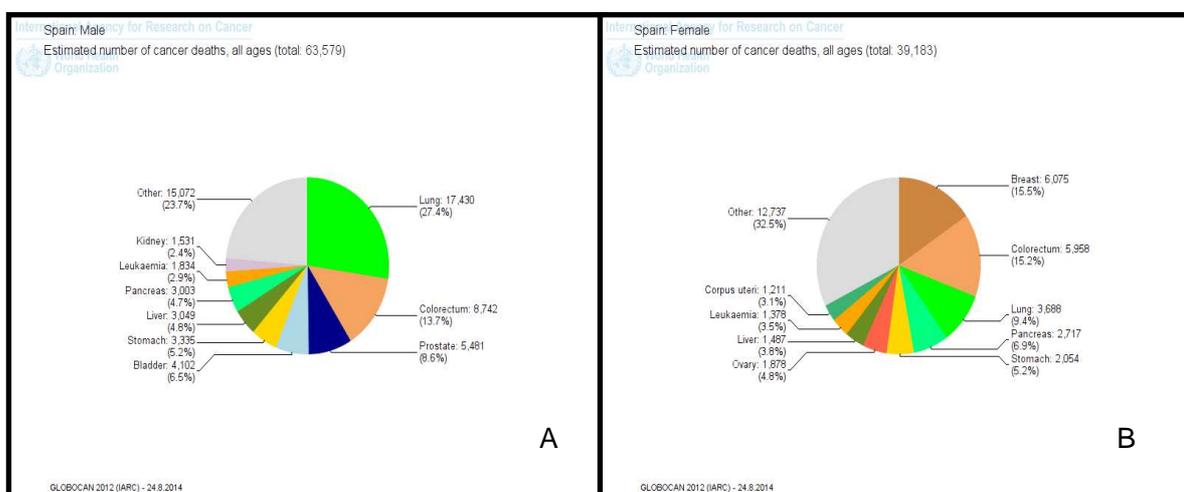


Figura 13. A, mortalidad por cáncer en España, en hombres. B, en mujeres.

La mortalidad por cáncer en España ha sufrido un descenso en ambos sexos de 1980 a 2007, debido fundamentalmente a la caída en número de muertes desde la mitad de los años 90 en adelante.

Las principales contribuciones a este descenso en mortalidad por cáncer en varones corresponden a la caída mayor al 3% anual en los últimos 10 años del cáncer de próstata y del cáncer de estómago. En mujeres, este descenso es, principalmente, debido a la caída de la mortalidad por cáncer de mama y por cáncer colorrectal.

Respecto al cáncer colorrectal en España, la tendencia de mortalidad en varones es ligeramente descendente a partir del año 1998; hasta entonces la tendencia era ascendente (tasa de 3% anual). Por el contrario, en mujeres, la tendencia es descendente desde el año 1996, con una tasa anual de descenso de 1.4%; previamente a este periodo, la tasa anual de ascenso era del 1.3% (Figura 14)<sup>9</sup>.

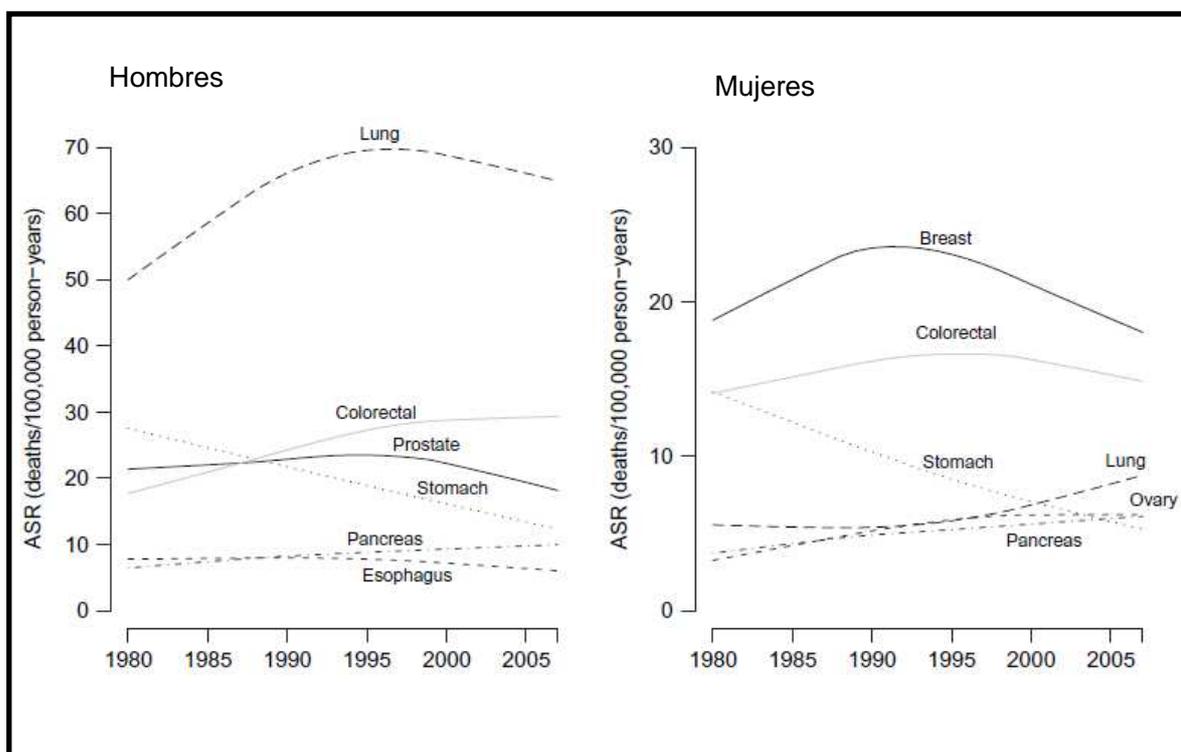


Figura 14. Tendencia de mortalidad por cáncer en España, 1980-2007.

## Supervivencia

La supervivencia de los pacientes con cáncer, medida como la proporción de casos que logran sobrevivir un tiempo preestablecido (generalmente 5 años), es el indicador más importante de la eficacia del sistema asistencial en la lucha contra el cáncer. Este indicador refleja en qué medida los casos son diagnosticados en un estadio potencialmente curable y el grado de eficacia de los procedimientos terapéuticos.

En Europa el proyecto EUROCORE (European Cancer Registry Based Study on Survival and Care of Cancer Patients), cuya última actualización corresponde a la

versión 5, proporciona información sobre la supervivencia global de los pacientes diagnosticados de cáncer.

Ante la dificultad en muchos casos de determinar si la muerte de un paciente con diagnóstico de cáncer esta relacionada con el proceso tumoral, EUROCARE establece comparaciones en términos de supervivencia relativa. Se trata, por tanto, de un estimador ajustado por otras posibles causas de muerte, lo que permite establecer comparaciones entre regiones y periodos de tiempo<sup>10</sup>.

Los resultados del EUROCARE-5 muestran datos de supervivencia hasta 2007, analiza datos de 107 registros de más de 10 millones de casos de 29 países europeos, entre 1999 y 2007, con seguimiento hasta diciembre de 2008. Asimismo, muestra la tendencia de supervivencia por edad y periodos de tiempo por regiones europeas para los 10 tipos de cáncer más común, entre los que se encuentra el cáncer colorrectal.

La supervivencia media a 5 años para el cáncer de colon se sitúa en 57% (IC 95% 56.8-57.3), sin diferencias significativas entre sexos. Esta supervivencia fue similar en todas las regiones europeas, excepto en los países del Este y Reino Unido, donde fue ligeramente inferior (Figura 15). La tendencia de supervivencia ha aumentado en los últimos años, pasando de 54.2% (53.9-54.6) en el periodo 1999-2001, a 58.1% (57.7-58.4) en 2005-07 (Figura 16).

En España, los datos son superponibles a lo que ocurre de media en Europa, aunque la cobertura de los registros incluidos en el estudio es, solamente del 17% de la población española. Teniendo en cuenta esta limitación, los datos de supervivencia relativa media estandarizada por edad en España para cáncer de colon se sitúa en 57.1% (56.1-58.1).

En el proyecto EUROCARE se incluyen 46 localizaciones tumorales, atendiendo a la Clasificación Internacional de Enfermedades; por este motivo, los datos relativos al cáncer de recto aparecen separados del cáncer colorrectal. La supervivencia en cáncer de recto es ligeramente inferior que en cáncer de colon (Figura 15). En este sentido la supervivencia relativa media estandarizada por edad a 5 años es de 55.8% (IC 95% 55.5-56.1) en Europa. En España, los datos son similares, estimándose una supervivencia de 56.4% (55.0-57.7)<sup>11</sup>.

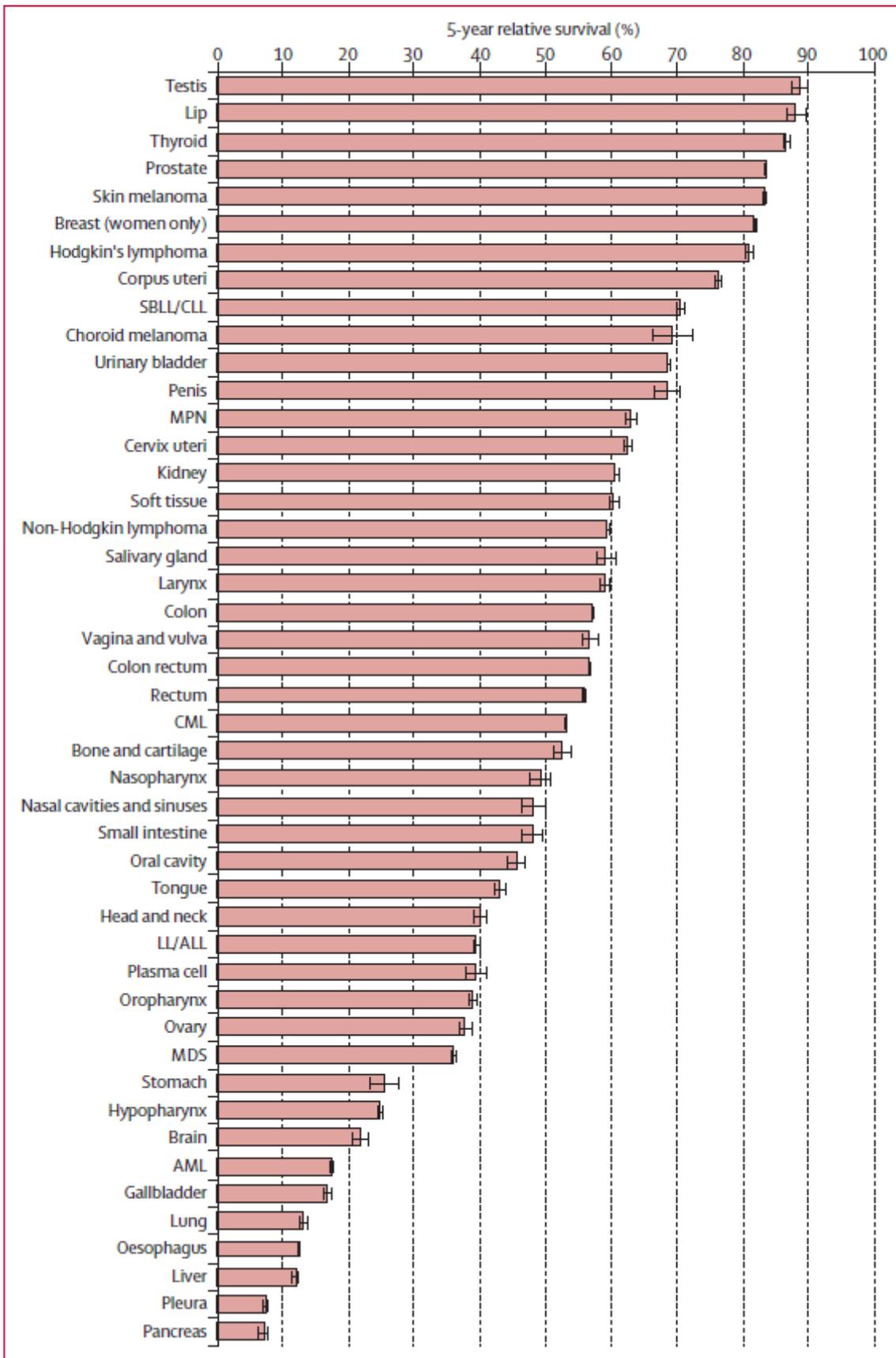


Figura 15. Supervivencia relativa a 5 años estandarizada por edad para pacientes adultos con cáncer diagnosticados en 2000-2007. Fuente: De Angelis R, Sant M, Coleman MP et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5 – a population-based study. *Lancet Oncol* 2014; 15:23-34.

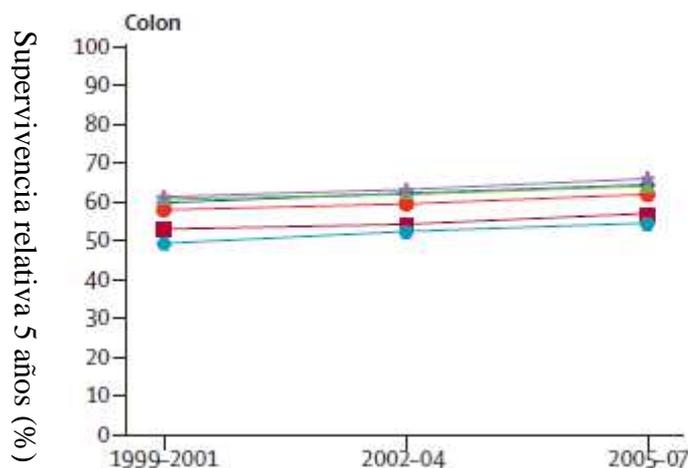


Figura 16. Supervivencia relativa a 5 años estandarizada por edad para pacientes adultos con cáncer en los periodos de tiempo 1999-2001, 2002-04 y 2005-07. Fuente: De Angelis R, Sant M, Coleman MP et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5 – a population-based study. *Lancet Oncol* 2014; 15:23-34.

## Prevalencia

La prevalencia hace referencia al número de pacientes con cáncer en una determinada población, independientemente del momento en el que fueron diagnosticados. Depende de la frecuencia de aparición de la enfermedad (incidencia) y de la letalidad de la misma (mortalidad).

La prevalencia de cáncer en el mundo a 5 años, en el año 2012, era de más de 32 millones de personas, de las cuales más de 3 millones y medio correspondían a pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal. Atendiendo al sexo, la prevalencia de cáncer en mujeres es superior a la de hombres (17 millones de mujeres y 15 millones de hombres). Respecto al cáncer colorrectal, la prevalencia se invierte, siendo mayor el número de hombres con cáncer colorrectal (casi 2 millones) que de mujeres (1.6 millones)<sup>1</sup>.

En Europa, la prevalencia de cáncer a 5 años en 2012 era de 9 millones de personas, estando 1.2 millones personas afectadas de cáncer colorrectal. La prevalencia de personas con cáncer en Europa atendiendo al sexo era similar (4.5 millones); sin embargo, cuando analizamos el cáncer colorrectal, al igual que ocurre a nivel mundial, la prevalencia de hombres (650.000) es mayor que la de mujeres (550.000)<sup>1</sup>.

En España, la prevalencia de cáncer a 5 años en 2012 era de 581.688 casos, correspondiendo 89.705 a personas con cáncer colorrectal. Por sexos, la distribución es similar a lo que ocurre a nivel mundial, con cifras de prevalencia por cáncer de 326.493 hombres y 255.195 mujeres. La prevalencia a 5 años de cáncer colorrectal en 2012 fue de 53.691 hombres y 36.014 mujeres<sup>1</sup>. Tabla 2.

Tabla 2. Prevalencia a 5 años de cáncer y, específico para cáncer colorrectal, en función de sexo para el mundo, Europa y España. Datos: Globocan 2012.

	<b>Mundo</b>	<b>Europa</b>	<b>España</b>
<b>Cáncer global</b>			
Ambos sexos	32.455.179	9.078.918	581.688
Hombres	15.296.119	4.570.958	326.493
Mujeres	17.159.060	4.507.960	255.195
<b>Cáncer colorrectal</b>			
Ambos sexos	3.543.582	1.203.943	89.705
Hombres	1.953.431	656.384	53.691
Mujeres	1.590.151	547.559	36.014

## 2- ETIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL

La etiología del cáncer colorrectal es compleja, estando implicados factores ambientales y genéticos. Estos factores interaccionan de modo que producen una transformación de la mucosa colónica normal a lesiones premalignas (pólipos adenomatosos) y, finalmente, a cáncer colorrectal, en el transcurso de los años<sup>5</sup>.

### **i) Edad**

La incidencia del cáncer colorrectal está marcada en gran medida por la edad, siendo este el factor que más influye por encima de cualquier otro factor demográfico.

El 90% de los diagnósticos ocurren en mayores de 50 años, siendo el riesgo de desarrollar CCR en la población general (sin riesgos sobreañadidos) a lo largo de la vida del 5%, según datos de EEUU.

Recientemente se está observando un aumento de incidencia entre los menores de 50 años y un ligero descenso entre los mayores, probablemente debido a los programas de cribado; aunque la magnitud sigue siendo mucho mayor en mayores de 50 años<sup>5,12</sup>.

### **ii) Factores Ambientales**

Diversos estudios han demostrado que sujetos pertenecientes a zonas de baja incidencia de cáncer colorrectal al emigrar a zonas con alta incidencia asumen la incidencia del país de destino. Este hecho pone de manifiesto la gran importancia que tienen los factores ambientales a la hora de desarrollar el CCR.

Desde hace muchos años, los estudios epidemiológicos sobre los hábitos nutricionales y las pautas de emigración, así como estudios experimentales realizados en animales, han puesto de manifiesto que el CCR es causado o promovido por factores medioambientales, especialmente por factores dietéticos que afectan al microambiente intestinal.

Uno de los estudios poblacionales que recientemente ha evaluado factores de riesgo para CCR, el Women's Health Initiative, que recoge datos prospectivos de casi 160.000 mujeres postmenopáusicas, de las que 1.210 desarrollan cáncer de colon y 282 son diagnosticadas de cáncer de recto, ha descrito 11 factores de riesgo asociados de forma significativa con la aparición de cáncer de colon y sólo 3 de ellos tuvieron asociación independiente con el cáncer de recto. De forma que, aunque se consideran como una misma entidad, el cáncer de colon y el cáncer de recto, pueden ser consideradas dos entidades diferentes con etiopatogenia distinta<sup>5,13</sup>.

A continuación se describen los factores de riesgo, más evidenciados en la literatura, como implicados en el desarrollo de CCR.

## 1- Dieta

Existen numerosos estudios que intentan constatar la influencia del consumo de determinados nutrientes en el desarrollo del cáncer colorrectal; sin embargo, aún no ha sido posible determinar de manera precisa cuáles son los principales causantes, dado que es difícil aislar los diferentes componentes de la dieta.

### a) Grasas

Diversos estudios epidemiológicos muestran que la ingesta de grasa se relaciona con aumento del riesgo de CCR.

En 1990 Willet y colaboradores publicaron los resultados de un estudio sobre la salud de las enfermeras de EEUU, realizando el seguimiento de 88.751 mujeres de edades comprendidas entre los 34 y 59 años, sin cáncer ni enfermedad inflamatoria intestinal al reclutamiento. Tras ajustar la ingesta total de energía, el consumo de grasas animales se asoció con un aumento del riesgo de cáncer de colon. La tendencia fue altamente significativa ( $p < 0.01$ ), con un riesgo relativo de 1.89 (IC95%, 1.13-1.15). No se encontró asociación con las grasas de origen vegetal.

Sin embargo, el estudio Women's Health Initiative, que incluye casi 50.000 mujeres, fue incapaz de demostrar reducción en el riesgo de CCR al disminuir la ingesta grasa de la dieta, incluyendo grasa animal, tras 8 años de seguimiento<sup>14</sup>.

### b) Carne Roja

El consumo de carne roja o carne procesada durante periodos prolongados de tiempo se han asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal.

En 2015, la IARC (International Agency for Research on Cancer) ha clasificado a la carne roja como posible carcinógeno (grupo 2A) y a la carne procesada como carcinógeno (grupo 1) para humanos en base a la evidencia científica disponible en la literatura<sup>15, 16</sup>.

Estas conclusiones están basadas en estudios observacionales y los datos de algunos estudios no son consistentes al relacionar el consumo de carne roja o procesada y el CCR.

Además, la abstinencia total de consumo de carne roja no está claro que disminuya el cáncer colorrectal, existiendo resultados contradictorios en este sentido<sup>5</sup>. Es posible que el exceso de riesgo asociado al consumo de carne roja se vea balanceado por una variedad de potenciales beneficios como la reposición de hierro y vitamina B12.

Por otro lado, se ha señalado que algunas formas de cocinar la carne pueden estar implicadas en el proceso de carcinogénesis, tales como la cocción a alta temperatura o en contacto directo con el fuego (ej. barbacoa). Cuando la carne es cocinada de esta manera se generan productos de la pirólisis (aminas heterocíclicas, hidratos de carbono aromáticos policíclicos y compuestos nitrosos) que pueden incrementar el riesgo de cáncer colorrectal; especialmente en personas genéticamente predispuestas a transformar estos componentes en productos intermedios más activos. Esta

predisposición genética también podría influir en el riesgo asociado con la ingesta de carne roja o procesada.

**c) Fibra, fruta y vegetales**

Algunos datos epidemiológicos sugieren que ciertos tipos de *fibra* de la dieta pueden reducir el riesgo de este tipo de cáncer al disminuir la exposición de la mucosa a los carcinógenos<sup>17</sup>; sin embargo, el grado de protección no está claro y los estudios prospectivos al respecto concluyen que el aporte de fibra a la dieta no supone un efecto protector significativo<sup>18</sup>.

Lo mismo ocurre con la ingesta de frutas y verduras, varios estudios epidemiológicos muestran asociación entre el consumo de estos alimentos y la protección frente al CCR; no obstante, los datos publicados también son discordantes.

El resultado de un metanálisis en el que se incluyeron 14 estudios prospectivos con un seguimiento entre 6 y 20 años muestra que el consumo de frutas y verduras se asocia con una reducción, aunque no significativa, del riesgo de CCR, siendo más importante la reducción de cáncer de colon distal<sup>19</sup>.

Recientemente se ha evaluado el papel de la dieta mediterránea (rica en fruta y verdura entre otros componentes), encontrando un efecto protector de la misma (disminución de riesgo de CCR 8-11% entre los que presentan gran adherencia a esta dieta frente a quienes no la siguen)<sup>20</sup>.

En este mismo sentido, en 2015 se publicó un estudio que evaluaba los distintos patrones de dieta vegetariana, concluyendo que los practicantes de dieta vegetariana tienen menor riesgo de CCR que los no vegetarianos<sup>21</sup>.

**d) Leche, productos lácteos**

Los estudios epidemiológicos referentes al consumo de leche y productos lácteos y el riesgo de CCR, muestran resultados contradictorios.

Un metanálisis que incluye 19 estudios de cohortes concluye que una dieta rica en leche y productos derivados tiene una asociación significativa con la reducción del riesgo de CCR; aunque este beneficio no se observa con el queso y otros productos y, sólo sobre el cáncer de colon y no de recto<sup>22</sup>.

**e) Micronutrientes**

Son muchos los micronutrientes que se han relacionado con el riesgo de CCR; sin embargo, los datos epidemiológicos son poco concluyentes, como se ocurre con los productos de la dieta.

Los principales componentes se detallan a continuación:

- *Calcio:*

Un metanálisis que incluyó 3 ensayos clínicos con suplementos de calcio en la prevención de recurrencia de adenomas colorrectales (n:1485), concluyó con un riesgo significativamente más bajo de recurrencia de adenoma en aquellos sujetos a los que se les pautó suplementos de calcio<sup>23</sup>. A pesar de estos resultados, aún no se ha probado dicha eficacia en la prevención de CCR. El único ensayo clínico que randomizaba mujeres postmenopáusicas a recibir un suplemento de calcio y vitamina D o placebo, no mostró diferencias significativas en la detección de CCR durante un seguimiento de 7 años<sup>24</sup>.

- *Vitamina D:*

La vitamina D ha mostrado capacidad para inhibir la proliferación celular y aumentar la apoptosis in vitro y su déficit se considera un importante factor de riesgo para algunos tipos de cáncer.

En un metanálisis de 18 estudios prospectivos, la ingesta de vitamina D y los niveles plasmáticos de 25-OH colecalciferol se relacionaron inversamente con el riesgo de CCR<sup>5</sup>. Sin embargo, estudios con suplementos de vitamina D no han mostrado descenso en la incidencia de CCR<sup>24</sup> y, recientemente, se ha publicado un estudio clínico que evalúa la eficacia en el contexto de la prevención de adenomas colorrectales con suplementos de calcio y/o vitamina D con resultados similares. Los autores concluyen que los suplementos no reducen la recurrencia de adenomas colorrectales durante el tiempo de seguimiento del estudio (3-5 años)<sup>25</sup>.

- *Folato:*

El papel del folato en el desarrollo del CCR es incierto; mientras que algunos datos con animales han demostrado que el folato inhibe la patogénesis del cáncer en algunos tejidos, incluido el colon, estudios epidemiológicos han evaluado el papel protector de los suplementos de folato en el desarrollo de CCR o en la prevención de adenomas colorrectales, sin encontrar beneficio, incluso, parece que incrementa el riesgo de CCR y de recurrencia de adenomas<sup>26-28</sup>.

- *Magnesio:*

Un metanálisis evalúa la influencia de los suplementos de magnesio demostrando una reducción modesta del riesgo de desarrollar CCR, siendo mayor el beneficio en cáncer de colon que en cáncer de recto. Esta asociación persiste incluso ajustando los datos por la ingesta de calcio<sup>29</sup>.

**f) Otros componentes de la dieta**

- *Café:*

Existen datos ambiguos respecto al factor protector del café en el CCR. Recientemente se ha reportado un beneficio en supervivencia y riesgo de recurrencia en pacientes con CCR estadio III que consumían grandes cantidades de café respecto a aquellos que no tomaban café<sup>30</sup>.

Asimismo, un estudio prospectivo de cohortes americano que incluyó 489.706 sujetos, con una mediana de seguimiento de 10.5 años, demostró que aquellos bebedores de 4 o más tazas de café tuvieron una reducción de riesgo en el desarrollo de CCR, especialmente de tumores proximales, frente a aquellos que no tomaban café<sup>31</sup>.

- *Pescado y Ajo:*

El consumo de ácidos grasos omega 3, presente en los *pescados*, se ha relacionado con una reducción en la incidencia de CCR en estudios observacionales<sup>32</sup>.

Igualmente, el *ajo* parece reducir el riesgo de adenomas colónicos en algunos estudios observacionales; sin embargo, la evidencia aún es muy limitada y estudios epidemiológicos no prueban su factor protector<sup>33,34</sup>.

## 2- Estilo de vida

### a) Actividad Física

La inactividad física se ha asociado con el riesgo de CCR, más con el cáncer de colon que con el de recto. Un estilo de vida sedentario podría explicar un aumento del riesgo de CCR, aunque el mecanismo no está claro.

Datos más recientes sugieren que la actividad física después del diagnóstico de CCR en estadios iniciales podría disminuir el riesgo de cáncer relacionado y de mortalidad global y que la cantidad de ejercicio aeróbico se correlaciona con un descenso en el riesgo de recurrencia tras la resección del CCR en estadio III<sup>5</sup>.

En un metanálisis de 21 estudios, se observó una reducción del riesgo de cáncer de colon proximal del 27%, cuando se comparan los sujetos más y menos activos (RR 0.73, IC95% 0.66-0.81) y resultados similares se obtuvieron para el cáncer de colon distal (RR 0.74, IC 95% 0.68-0.80)<sup>35</sup>.

### b) Obesidad

La obesidad y el consumo total de calorías son factores de riesgo independientes para el cáncer colorrectal, observado tanto en estudios de cohortes como en estudios de casos y controles<sup>5</sup>.

Una revisión sistemática de la literatura y datos de un metanálisis publicado en 2015 muestra que la ganancia de peso se asocia con un incremento modesto del riesgo de CCR<sup>36</sup>.

Asimismo, la distribución de la grasa también tiene relación con el riesgo de CCR, entre otros tumores. El estudio European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) muestra que el perímetro abdominal y el índice cintura-cadera, como indicadores de obesidad abdominal, se asocian con el riesgo de CCR en ambos sexos<sup>37</sup>.

### c) Tabaco

El consumo de tabaco se ha asociado al incremento en la incidencia y mortalidad de CCR. Un metanálisis de 106 estudios observacionales estiman un incremento en el riesgo de desarrollo de CCR de 1.18 (IC 95% 1.11-1.25) entre los fumadores respecto a los no fumadores. Se encontró un aumento en relación con la dosis (número de paquetes-año y cigarrillos por día), pero las diferencias estadísticamente significativas aparecen después de 30 años de hábito. El riesgo de muerte también fue mayor en el grupo de fumadores (RR: 1.25, IC95% 1.14-1.37). Tanto incidencia como mortalidad fue mayor para cáncer de recto que de colon<sup>38</sup>.

El tabaco también se ha postulado como un factor de riesgo del desarrollo de pólipos colónicos de cualquier histología, así como del riesgo de adenomas avanzados.

### d) Alcohol

La asociación entre el consumo de alcohol y el riesgo de CCR ha sido demostrada en varios estudios. Un metanálisis publicado en 2011 que incluye 27 estudios de cohortes y 34 caso-control concluye que, comparado con no bebedores, la ingesta de alcohol se asocia a un incremento en el riesgo de CCR, incluso en los poco bebedores (>1 bebida al día). El incremento en el riesgo tiene una relación dosis respuesta, de modo que en bebedores moderados (2-3 bebidas/día) el riesgo es de 1.21 (IC95% 1.13-1.28) y en grandes bebedores (>4 bebidas/día), es de 1.52 (IC95% 1.27-1.81)<sup>39</sup>.

El efecto del alcohol en la carcinogénesis no es bien conocido, pero se postula como un déficit en la ingesta y absorción de folato y su metabolismo.

### iii) Patología Colónica previa

Se han descrito algunas patologías que afectan al tracto gastrointestinal inferior que presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal<sup>3</sup>.

#### 1- Enfermedad Inflamatoria Intestinal:

- *Colitis ulcerosa*: el riesgo aumenta con el tiempo de evolución y la severidad de la enfermedad. Después de los 10 años de evolución el riesgo es del 10-20%.
- *Enfermedad de Crohn*: el aumento del riesgo es mínimo, pero en pacientes con inicio precoz de la enfermedad (<21 años) puede alcanzar hasta 20 veces el riesgo poblacional.

- #### 2- Pólipos:
- el riesgo depende del tamaño y del tipo de pólipo. Los pólipos hiperplásicos que son los más frecuentes, tienen menor potencial de malignización. El adenoma vellosos o el adenoma vellosos-tubular son los que más potencial maligno presentan (20 y 10%, respectivamente). Los pólipos mayores de 2 cm se asocian también con un alto potencial maligno; así como los pólipos múltiples, que tienen un potencial de malignización 2 veces mayor que un pólipo aislado.

- 3- Cáncer colorrectal: en pacientes con una historia personal de CCR, el desarrollo de cáncer colorrectal metacrónico en los primeros 5 años de seguimiento es del 1.5-3%.
- 4- RT abdominal: se ha observado un aumento del riesgo de CCR en adultos supervivientes a tumores infantiles que precisaron radioterapia abdominal<sup>40,41</sup>. Asimismo, el tratamiento con RT sobre la próstata se ha asociado con un incremento en el riesgo de cáncer de recto<sup>42</sup>.
- 5- Ureterosigmoidostomía: tiempo de latencia de 15 a 30 años, sobre todo si es distal.

#### iv) Otras Enfermedades y Fármacos

##### - Diabetes Mellitus:

La diabetes mellitus se postula como un factor de riesgo para el desarrollo de CCR. Numerosos estudios relacionan estas dos entidades. Un metanálisis publicado en 2013 concluye que la DM es un factor de riesgo de CCR y de mortalidad cáncer específica<sup>43</sup>. Recientemente se ha publicado un metanálisis de 8 estudios que muestra una relación positiva entre la DM tipo 2 y el riesgo de CCR (RR 1.21, IC 95% 1.02-.142)<sup>44</sup>.

Algunos datos sugieren que el uso de insulina (como parte del tratamiento de la DM tipo 2) tiene un efecto nocivo sobre el riesgo de CCR, aunque estos datos deben de explorarse en estudios más consistentes<sup>45,46</sup>; sin embargo, el uso de metformina (antidiabético oral-ADO), se postula como protector frente al desarrollo de CCR, lo que no se observa con otros ADO<sup>47</sup>.

##### - Transplante de órganos sólidos:

Se ha relacionado con un incremento en CCR, asociado al tiempo prolongado de inmunosupresión. Algunos autores recomiendan cribado de CCR en pacientes trasplantados renales, empezando a los 40 años o 5 años después del transplante<sup>48,49</sup>.

##### - Acromegalia:

Algunos estudios sugieren el aumento de adenomas y cáncer colorrectal en pacientes con acromegalia, especialmente cuando la enfermedad no está controlada<sup>50</sup>.

##### - Fármacos:

Algunos fármacos se han relacionado con el cáncer colorrectal, algunos de ellos como factores de riesgo y otros como factores protectores, incluso como posibles agentes quimiopreventivos en determinadas circunstancias.

a) Aspirina y otros anti-inflamatorios:

En el CCR la aspirina al igual que otros agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) han mostrado su papel en la prevención de los pólipos adenomatosos esporádicos, en la prevención del CCR hereditario y en la prevención del CCR esporádico; aunque siguen existiendo interrogantes, como la dosis o el tiempo de tratamiento, para lo que existen estudios en marcha<sup>51-52</sup>.

Por otro lado, diversos estudios randomizados, diseñados para evaluar el beneficio vascular de la aspirina, han puesto de manifiesto que las dosis bajas reducen la incidencia del CCR en un 50%, lo que también ha sido señalado para otros tipos de cáncer. Todo lo anterior sugiere un efecto anticancerígeno de la aspirina. Su acción sería aún más compleja ya que incluso podría reducir el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis<sup>53-57</sup>.

Tal es así, que, recientemente, el grupo de trabajo para la prevención de EEUU (US Preventive Services Task Force) recomienda el uso de aspirina para la prevención cardiovascular y de cáncer colorrectal en dosis bajas para la población entre 50 y 59 años con un riesgo cardiovascular de mayor al 10% en los siguientes 10 años. En otros grupos de edad, la recomendación deberá ser individualizada atendiendo al balance riesgo-beneficio<sup>58</sup>.

b) Terapia de privación androgénica:

Una revisión de la base de datos americana SEER, de más de 100.000 pacientes con cáncer de próstata, sugiere que el tratamiento prolongado con terapia de privación androgénica podría elevar el riesgo de CCR. Los pacientes tratados con análogos de la gonadotropina o con orquiectomía tuvieron mayor riesgo de CCR. El mecanismo por el cual se produce no está claro, aunque se postula la resistencia a la insulina producida por el tratamiento hormonal como posible contribuyente<sup>59,60</sup>.

c) Terapia hormonal sustitutiva (THS):

Se ha evaluado el papel de la terapia hormonal sustitutiva en mujeres postmenopáusicas y el riesgo de cáncer colorrectal, y los hallazgos no son concluyentes. La terapia hormonal basada sólo en estrógenos no parece tener asociación con la incidencia y mortalidad de CCR<sup>61</sup>. Sin embargo, cuando se evalúa la combinación de estrógenos y progesterona, la incidencia de CCR disminuye, pero no tiene impacto en la mortalidad, ya que los tumores diagnosticados cuando se utilizó la THS eran más avanzados<sup>62,63</sup>.

d) Estatinas:

Algunos estudios sugieren que el uso de estatinas se asocia con un efecto protector del CCR. El estudio caso-control Molecular Epidemiology of Colorectal Cancer (MECC) demuestra una asociación estadísticamente significativa entre el uso de estatinas de forma prolongada y la reducción del riesgo de CCR<sup>64</sup>. En 2014 se publicó un metanálisis de 40 estudios que sugiere un beneficio de las estatinas como factor protector del CCR, aunque los estudios y los datos son heterogéneos<sup>65</sup>.

Si atendemos a los pacientes diagnosticados de CCR, el uso de estatinas antes o después del diagnóstico se relaciona con una mejor supervivencia global y cáncer específica<sup>66</sup>.

e) **Bifosfonatos:**

Uno de los medicamentos más comúnmente usados en el tratamiento de la osteoporosis, han mostrado efectos antiproliferativos, antiangiogénicos y proapoptóticos en estudios preclínicos. Los estudios epidemiológicos realizados con estos fármacos muestran resultados contradictorios. Sin embargo, en 2013 se publicaron dos metanálisis que muestran una reducción estadísticamente significativa del riesgo de CCR con el uso de bifosfonatos<sup>67,68</sup>.

f) **IECA:**

Algunos datos *in vitro* e *in vivo* sugieren que la angiotensina II está implicada en el desarrollo del cáncer y que hay una relación entre los IECA y el crecimiento celular en el CCR. Sin embargo, numerosos estudios observacionales y el análisis de estos estudios no han demostrado dicha relación, excepto un estudio caso control que muestra un modesto efecto protector del fármaco<sup>69</sup>.

**v) Factores Genéticos**

Los factores genéticos cobran gran importancia en el desarrollo del cáncer, aunque son muchos los interrogantes que quedan aún por aclarar.

Existen dos formas fundamentales de la implicación de los factores genéticos en el desarrollo del cáncer<sup>70</sup>.

1) **Polimorfismos:** son pequeñas variaciones en la secuencia del DNA. Se trata de mutaciones muy frecuentes en la población general, con un incremento moderado del riesgo. El riesgo individual se incrementa poco, pero el número de cánceres atribuibles a estas características genéticas es alto.

Los polimorfismos del DNA condicionan diferentes interacciones entre los agentes externos y los genes. Cuando se producen en genes que codifican enzimas de metabolización se originan proteínas con diferentes capacidades para metabolizar carcinógenos.

2) **Síndromes Hereditarios:** en estos casos el riesgo acumulado a lo largo de la vida en portadores de mutación es muy alto (50-90%); sin embargo, tales mutaciones son raras en la población general, por lo que sólo una pequeña fracción de los cánceres puede ser atribuida a caracteres heredados.

Respecto al CCR, entre un 75-80% de todos los casos diagnosticados son de tipo esporádico. El 20-25% restante agrupa a individuos afectados con cáncer de colon en los que aparece un componente familiar; es decir, tienen familiares de primer y/o segundo grado con CCR. Sin embargo, tan sólo 5% de los tumores colorrectales tienen una predisposición hereditaria mediante un patrón mendeliano<sup>71</sup>.

Los síndromes hereditarios que conllevan aumento del riesgo de CCR se pueden clasificar como cáncer de colon asociado a poliposis, cuyo paradigma es la poliposis adenomatosa familiar (PAF), y cáncer de colon hereditario no polipósico (Síndrome de Lynch).

### 3- BASES CLÍNICAS DEL CÁNCER COLORRECTAL

#### Anatomía y Localización<sup>3,5,72</sup>

El cáncer colorrectal se localiza en la parte distal del tubo digestivo, en el intestino grueso que tiene una longitud aproximada de 1.5 metros. Se define como la parte de intestino comprendida desde la válvula ileocecal hasta el ano. La función del colon es la de absorber nutrientes, electrolitos y agua de los alimentos, y el recto tiene función de reservorio de las heces antes de su expulsión.

Anatómicamente, el colon se divide en colon ascendente o derecho, colon transverso, colon descendente o izquierdo, sigma y recto. En ocasiones, la división se realiza en colon proximal (incluye colon ascendente y transverso) y colon distal (incluye colon descendente, sigma y recto) (Figura 17). Esta división tiene su base en la localización retro o extraperitoneal del segmento, así como de su vascularización. El drenaje venoso y linfático es paralelo al circuito arterial.

El mesocolon, que es la parte de mesenterio encargada de fijar el colon a la pared abdominal, alberga los ganglios linfáticos de drenaje siguiendo el trayecto vascular antes citado. La extensión de la resección quirúrgica del CCR se define por la vasculatura así como por la necesidad de resecar los ganglios linfáticos regionales.

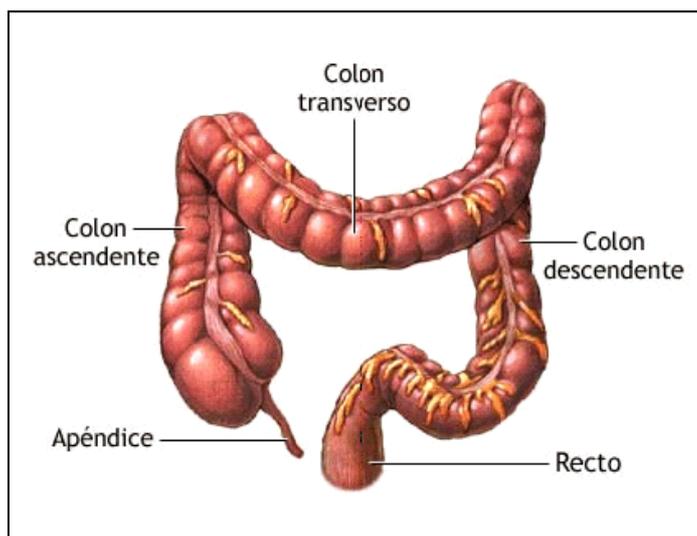


Figura 17. Anatomía del colon.

Las capas que forman la pared del colon son: mucosa, submucosa, capa muscular (interna circular y externa longitudinal) y serosa.

Considerando en conjunto el CCR, la localización predominante es rectosigma (45% recto y 25% sigma). Cuando se tiene en cuenta el colon de forma aislada, el orden de frecuencia es: colon descendente > colon transverso > colon ascendente; aunque existe una creciente progresión hacia áreas más proximales.

En el 3% de los casos de CCR se diagnostican tumores sincrónicos y en el 2% metacrónicos; este hecho hace necesaria la correcta evaluación de todo el colon antes de proceder al tratamiento. Si no es posible realizar la exploración endoscópica completa al diagnóstico (por ejemplo: estenosis neoplásica que impide el paso del endoscopio), es importante realizarla lo antes posible para detectar posibles tumores sincrónicos<sup>73,74</sup>.

### Histopatología<sup>3,5</sup>:

Más del 95% de los carcinomas colorrectales son adenocarcinomas (ADC). Otros tumores epiteliales (carcinomas) incluyen los carcinomas adenoescamosos, los carcinomas escamosos y los indiferenciados. Otras histologías que nos podemos encontrar en las neoplasias colorrectales son: sarcomas, linfomas, tumores neuroendocrinos o melanoma de la unión anorrectal (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación histológica CCR (mod. OMS)

<u>Tumores epiteliales</u>	<u>Tumores no epiteliales</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adenocarcinoma (ADC)               <ul style="list-style-type: none"> <li>* tubular o glandular</li> <li>* mucinoso</li> <li>* células anillo de sello</li> <li>* medular</li> </ul> </li> <li>- Carcinoma escamoso</li> <li>- Carcinoma adenoescamoso</li> <li>- Carcinoma indiferenciado</li> <li>- Carcinoma no clasificable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sarcoma</li> <li>- Linfoma</li> <li>- T. neuroendocrinos</li> <li>- Melanoma</li> <li>- Otros</li> </ul>

Las principales características de los adenocarcinomas colorrectales se describen a continuación:

- *ADC tubular o glandular*: es el más frecuente. Es un tumor maligno glandular epitelial, formado por estructuras tubulares y/o vellosas. Puede producir algunas sustancias, como la mucina, pero en cantidades pequeñas, cuando el componente de moco es menor del 50%. El ADC de colon puede dividirse de acuerdo con el grado de diferenciación histológico, es decir, de acuerdo con el porcentaje tumoral formado por glándulas; de esta manera un tumor bien diferenciado es aquel que en su mayoría (>95%) está formado por estructuras glandulares, mientras que si es menor del 50%, hablaríamos de tumores pobremente diferenciados<sup>75</sup>.

- *ADC mucinoso o coloide*: muchos tumores producen mucina, que puede quedarse en el interior de las células o ser secretado. Los tumores que producen gran cantidad de mucina extracelular (más del 50% de la masa tumoral) son clasificados como adenocarcinomas mucinosos<sup>75</sup>. Esta histología aparece en el 11-17% de todos los cánceres colorrectales. Estos tumores tienen predilección por la localización derecha y, a presentarse en estadios más avanzados. Aunque los datos son controvertidos, podría jugar un papel pronóstico independiente y cierta resistencia a los tratamientos; sin embargo y, hasta la fecha, no hay aval suficiente que soporte estas premisas y la histología mucinosa no cambia el abordaje terapéutico de los pacientes que lo presentan<sup>76</sup>.

- *ADC células en anillo de sello*: en algunos casos, la mucina intracelular es la característica histológica predominante, de forma que ésta desplaza al núcleo celular, lo que da un aspecto de anillo de sello (de ahí su nombre). Este subtipo es poco frecuente, corresponde al 1-2 % de los cánceres colorrectales y se asocia con diseminación difusa extensa y carcinomatosis peritoneal, estando considerada como una variante de peor pronóstico<sup>75,77</sup>.

- *ADC medular*: es un subtipo de adenocarcinoma caracterizado por la ausencia de glándulas, frecuentemente infiltradas por linfocitos. Se asocia a tumores con alta inestabilidad de microsatélites, incluidos los tumores asociados al Síndrome de Lynch, y presentan mejor pronóstico. Una reciente revisión sistemática y metanálisis, concluye que es un subtipo de CCR más frecuente en mujeres, localizado en colon derecho y con características moleculares y comportamiento diferente al ADC convencional (mayor tasa de inestabilidad de microsatélites, mayor tasa de mutaciones BRAF y menor tasa de mutaciones KRAS)<sup>75,78</sup>.

### Historia natural

La secuencia adenoma-carcinoma representa la manifestación patológica externa de las alteraciones genéticas secuenciales que promueven el crecimiento celular, la supervivencia y la invasión<sup>79</sup>. Este proceso se desarrolla a lo largo de 10-15 años, estando acortado en determinadas circunstancias, como pueden ser los síndromes hereditarios de predisposición al CCR<sup>80</sup>.

A nivel histológico, la expresión más incipiente es la aparición de focos de criptas aberrantes, que dan lugar a la formación de focos de adenomas microscópicos. Con el tiempo, estos cambios avanzan a lo largo de las criptas para llegar al epitelio de la superficie y crear una lesión elevada, el denominado pólipo adenomatoso. Al principio, las células que cubren la superficie de los pólipos mantienen una diferenciación similar a las células colónicas normales. Sin embargo, con el paso del tiempo, esta diferenciación se pierde y aparecen displasias que, más tarde, adquieren la capacidad de invadir las capas de la pared del colon. Incluso, en la etapa invasora, de carcinoma, la progresión de este se hace de forma ordenada, con tendencia al crecimiento circular y a estenotar la luz y, en profundidad, hacia las capas de la pared colónica. Por último, ocurre la diseminación ganglionar que suele suceder también de forma ordenada, primero los ganglios paracólicos y pararectales y luego se extiende a los mesentéricos (en función de la localización del tumor colorrectal, las estaciones de drenaje linfático serán distintas, como vimos con anterioridad).

### Patrón de diseminación y estadificación

La diseminación hematogena se realiza desde las estaciones ganglionares afectadas. Lo más habitual es el drenaje vía portal y, por tanto, el principal asiento de metástasis el hígado, seguido de pulmón, huesos y otras localizaciones; sin embargo, los tumores distales (principalmente recto) pueden dar lugar a metástasis pulmonares de inicio, ya que el drenaje se hace a través de la vena cava inferior, sin pasar por el sistema portal.

La primera clasificación pronóstica del cáncer colorrectal, fue propuesta por Dukes en 1932; posteriormente, fueron Astler y Coller los encargados de modificar dicha clasificación que ha sido utilizada hasta hace pocos años (Tabla 4)<sup>81</sup>.

Tabla 4. Clasificación de Astler y Coller (Dukes modificada).

Estadios	Extensión tumoral
<b>A</b>	Tumor limitado a mucosa
<b>B1</b>	Tumor invade hasta muscular propia
<b>B2</b>	Tumor atraviesa la capa muscular hasta la serosa
<b>C1</b>	Igual que B1 con afectación metastásica ganglionar
<b>C2</b>	Igual que B2 con afectación metastásica ganglionar
<b>D</b>	Metástasis a distancia

Actualmente, el sistema de clasificación TNM (tumor, node, metastasis) de la AJCC (American Joint Committee on Cancer) es el más ampliamente usado (Tablas 5 y 6)<sup>82</sup>.

Tabla 5. Clasificación TNM para el CCR, 7ª Ed. AJCC

<b>Tumor primario (T)</b>	
<b>Tx</b>	No puede ser valorado
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ (intraepitelial/invasión lamina propia)
<b>T1</b>	Invade submucosa
<b>T2</b>	Invade muscular propia
<b>T3</b>	Invade tejidos pericorectales
<b>T4a</b>	Penetra peritoneo visceral
<b>T4b</b>	Invade órganos/estructuras adyacentes
<b>Ganglios regionales (N)</b>	
<b>Nx</b>	No puede ser valorado
<b>N0</b>	No evidencia de afectación ganglionar regional
<b>N1</b>	Metástasis en 1-3 ganglios regionales
<b>N1a</b>	Metástasis en 1 ganglio regional
<b>N1b</b>	Metastasis en 2-3 ganglios regionales
<b>N1c</b>	Depósito en subserosa, mesenterio o tejido pericorectal no ganglionar
<b>N2</b>	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales
<b>N2a</b>	Metástasis en 4-6 ganglios regionales
<b>N2b</b>	Metástasis en 7 o más ganglios regionales
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
<b>M0</b>	No evidencia de metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia
<b>M1a</b>	Metástasis confinada a un órgano/sitio
<b>M1b</b>	Metástasis en más de un órgano/sitio o peritoneo

Tabla 6. Clasificación por estadios (TNM, 7ª Ed AJCC) del CCR.

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Estadio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estadio I</b>	T1, T2	N0	M0
<b>Estadio II</b>			
<b>IIA</b>	T3	N0	M0
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>Estadio III</b>			
<b>IIIA</b>	T1, T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
<b>IIIB</b>	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
<b>IIIC</b>	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
<b>Estadio IV</b>			
<b>IVA</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1a
<b>IVB</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1b

### Factores pronósticos clínicos y moleculares<sup>3</sup>

El factor pronóstico más importante es la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico, atendiendo a la clasificación por estadios de la AJCC, de manera que a estadios más avanzados, la supervivencia disminuye (tabla 7).

Tabla 7. Supervivencia por estadios

<b>Estadio</b>	<b>Supervivencia 5 años</b>
<b>Estadio I</b>	97%
<b>Estadio IIA</b>	87%
<b>Estadio IIB</b>	71%
<b>Estadio IIIA</b>	87%
<b>Estadio IIIB</b>	68-75%
<b>Estadio IIIC</b>	27-50%
<b>Estadio IV</b>	7%

Los principales factores pronósticos descritos en la literatura se describen a continuación:

### Grado histológico.

El grado histológico muestra el grado de diferenciación tumoral y ha demostrado ser un factor pronóstico independiente, existiendo cierto grado de subjetividad debido a la variabilidad interobservador. No obstante, los tumores pobremente diferenciados estadio II son considerados de alto riesgo en las principales guías clínicas (ESMO,

---

ASCO y NCCN). Sin embargo, esto sólo es cierto para aquellos tumores con expresión conservada de las proteínas del sistema mismatch repair<sup>73,83-86</sup>.

### **Nº ganglios afectados:**

Está claramente establecido que es necesario examinar un número adecuado de ganglios locorreccionales, para realizar un correcto estadiaje, puesto que lo contrario podría dar lugar a un infraestadiaje. El número de ganglios que debe ser examinado para considerar que el tratamiento quirúrgico es óptimo se ha postulado en 12 a 15 ganglios según el consenso del colegio americano de patólogos. Cuando no es así, debe de tenerse en cuenta para la toma de decisiones terapéuticas.

Por otro lado, la ratio de ganglios afectados es un factor pronóstico independiente y así está recogido en el sistema de clasificación TNM de la AJCC, recogido previamente. De modo que, a mayor número de ganglios de afectados, la supervivencia es menor<sup>5,82</sup>.

***Micrometástasis ganglionar:*** La mejora en las técnicas y la incorporación de métodos con mayor sensibilidad como la IHQ o la PCR, permiten detectar afectación ganglionar micrometastásica que no sería detectable por los medios convencionales. Varios son los trabajos que recogen estos datos utilizando diferentes técnicas y los resultados, en cuanto a la influencia en supervivencia, son controvertidos. Actualmente, la clasificación TNM no tienen en cuenta este concepto, pero algunos autores consideran este parámetro para la decisión terapéutica adyuvante<sup>5</sup>.

***Analisis ganglio centinela:*** Esta técnica está claramente implantada en el manejo del melanoma cutáneo y del cáncer de mama. Respecto al cáncer de colon la técnica fue descrita por Saha y cols. en el año 2000. Desde un punto de vista técnico, la disección del ganglio centinela puede realizarse en el momento de la resección del colon y el ganglio centinela ser identificado con precisión; sin embargo, la utilidad de esta técnica no esta bien establecida y se requieren mayores estudios para conocer su papel en el estadiaje del CCR<sup>5,87</sup>.

### **Invasión vasculo-linfática:**

La invasión vascular y linfática se ha postulado como un factor pronóstico independiente. La heterogeneidad en la metodología de estudio por parte de los patólogos, ha hecho que existan recomendaciones específicas, como es el estudio de, al menos, tres bloques de tumor para su detección. La importancia de la detección de invasión vasculo-linfática y su valor pronóstico es tal que las principales sociedades científicas lo incluyen en la definición de CCR estadio II de alto riesgo con las consecuentes posibles modificaciones en la indicación de tratamiento complementario a la cirugía<sup>73,85,88</sup>.

### **Tipo histológico:**

Como ya se ha descrito previamente, algunos subtipos histológicos pueden tener implicaciones pronósticas per se, sin embargo, muchos datos son controvertidos y es posible que juegue un papel aún más importante, el patrón molecular subyacente o el grado de diferenciación tumoral. En este sentido, el ADC células en anillo de sello está asociado a peor pronóstico y el ADC medular, a mejor pronóstico<sup>75-78</sup>.

### **Inestabilidad microsátélites (MSI):**

Los microsátélites son regiones del ADN con una secuencia corta de nucleótidos que se repiten múltiples veces. La situación de inestabilidad de microsátélites ocurre cuando un microsátélite ha ganado o perdido unidades repetidas y, por tanto, tiene un cambio en el marco de lectura, resultando en una mutación *frame shift*. Aproximadamente el 15% de los CCR tienen lugar por esta vía.

Los tumores con elevada inestabilidad de microsátélites (MSI-H) tienen características diferentes respecto a los que no tienen inestabilidad de microsátélites. Estos tumores tienden a localizarse en colon derecho, son de alto grado histológico y de tipo mucinoso; característicamente se asocian a infiltración linfocítica peritumoral y suelen ser diploides. En el momento del diagnóstico suelen presentarse con un gran tumor sin afectación ganglionar. En estos estadios iniciales los pacientes con tumores con inestabilidad de microsátélites tienen mejor pronóstico que aquellos con tumores similares pero sin inestabilidad de microsátélites.

Watanabe y cols. evaluaron el estado de MSI entre otros factores moleculares potencialmente involucrados en el pronóstico del CCR. El estudio se realizó en base a los pacientes con tumores estadio III y II de alto riesgo que fueron tratados con quimioterapia adyuvante (5FU); de ellos, el 21% presentaban MSI-H. En este análisis la inestabilidad de microsátélites se postula como un factor pronóstico favorable, ya que la SLP fue mayor en los pacientes con tumores MSI-H y la SG presentaba tendencia favorable al grupo MSI-H<sup>89</sup>.

Un estudio más reciente muestra datos más precisos, de modo que, cuando se evalúa globalmente el CCR con MSI, no se demuestra impacto pronóstico significativo; sin embargo, atendiendo por el factor localización del tumor, se encuentran diferencias estadísticamente significativas, de manera que los pacientes con tumores MSI y localizados en colon derecho tienen mejor pronóstico, algo que no ocurre con los tumores MSI localizados en colon izquierdo; las razones de estas diferencias no están claras<sup>90</sup>.

### **BRAF:**

La mutación de BRAF está presente en 10-20% de los CCR, generalmente se asocia a tumores proximales con MSI-H y confiere peor pronóstico<sup>91</sup>. Posteriormente, se ha confirmado como factor pronóstico adverso en tumores en estadio IV<sup>92</sup>.

Sin embargo, recientes estudios sugieren que la mutación de BRAF podría tener diferente significación pronóstica en función del estadio tumoral al que vaya asociada; así, no inferiría en el pronóstico de estadios iniciales, pero sí sería factor pronóstico adverso en estadios avanzados de la enfermedad<sup>93</sup>.

La frecuencia de mutaciones de BRAF en los tumores colorrectales es variable, como se recoge en los diferentes estudios que lo evalúan; sin embargo, todos ellos coinciden en encontrar una mayor frecuencia entre los tumores con inestabilidad de microsátélites<sup>94</sup>.

**LOH 18q:**

La pérdida de heterocigosidad en 18q ocurre en más de la mitad de los tumores colorrectales; generalmente afecta al gen DCC, pero también otros genes localizados en esta región como Smad2 y Smad4 podrían ser relevantes en el desarrollo de CCR. Se han publicado numerosos trabajos que incluyen LOH 18q entre los factores pronósticos a estudio, entre ellos el trabajo de Watanabe y cols, que concluyen que estadios III de CCR la presencia de LOH18q se asocia a peor supervivencia<sup>5,89</sup>.

**Respuesta linfoide en el huesped:**

La infiltración linfocítica se ha establecido como un factor pronóstico favorable; sin embargo, no está claro que sea un factor pronóstico independiente, ya que está asociada de forma importante con los tumores con inestabilidad de microsatélites (un factor pronóstico favorable).

Por otro lado, se ha evaluado la ratio neutrófilo-linfocito como factor pronóstico, llegándose a la conclusión de que una ratio elevada confiere peor pronóstico a los tumores. Este hallazgo es difícil de explicar, aunque se postula que podría representar una medida de la inmunidad innata adaptativa sometida a estrés con linfopenia relativa como marcador de inmunidad mediada por células deprimido, lo que le conferiría una desventaja en supervivencia<sup>5</sup>.

**Configuración del borde tumoral:**

La configuración del borde tumoral (infiltrativo versus expansivo) se ha mostrado como un factor pronóstico independiente. Un borde infiltrativo caracterizado por ser irregular, también conocido como desdiferenciación focal o *tumor budding*, presagia un peor pronóstico que aquellos tumores con un borde suave expansivo<sup>95,96</sup>.

**CEA:**

Se recomienda realizar una determinación de CEA previa a la intervención quirúrgica de CCR, puesto que la elevación de este marcador se postula como un factor pronóstico adverso. Los pacientes que presentan un CEA elevado que no se normaliza tras una cirugía con intención curativa se consideran pacientes con tumores de alto riesgo<sup>97</sup>.

No hay otros marcadores tumorales que hayan demostrado tal particularidad.

**Obstrucción, perforación:**

Los pacientes que debutan en el diagnóstico de CCR con perforación u obstrucción tienen peor pronóstico, independientemente del estadio tumoral. Esta característica también la incluyen las guías para clasificar a los CCR estadio II de alto riesgo<sup>73,85</sup>.

**Otros factores pronósticos<sup>5</sup>:**

Se han postulado muchos otros factores; sin embargo, su evidencia no está claramente demostrada. Entre estos factores se encuentran:

- ***Invasión perineural:*** parece que la capacidad del tumor de invadir el espacio perineural le confiere peor pronóstico; sin embargo, los análisis multivariantes no han demostrado tal eventualidad.
- ***Tabaquismo:*** parece no sólo ser un factor de riesgo sino también un factor pronóstico adverso. Este hecho, aún no bien clarificado, podría tener que ver con características moleculares del CCR, como son la presencia de inestabilidad de microsatélites y las mutaciones en BRAF, donde parece que los fumadores tendrían peor supervivencia.
- *IMC, DM, Sexo, localización del tumor primario, polimorfismos y otros marcadores moleculares, etc.* han sido estudiados sin demostrar, hasta el momento, su relevancia clínica en el pronóstico del CCR.

#### 4- BASES MOLECULARES DEL CÁNCER COLORRECTAL

En el cáncer colorrectal se han postulado dos modelos de carcinogénesis bien diferenciados, por un lado el modelo de inestabilidad cromosómica (ocurre en el 80-85% de los tumores colorrectales, cuyo principal implicado es el gen APC) y el modelo de inestabilidad de microsatélites (ocurre en el 15-20% de los tumores colorrectales esporádicos y es el mecanismo de carcinogénesis de CCR en síndrome de Lynch).

El conocimiento del modelo de carcinogénesis en el cáncer colorrectal ha partido del estudio de los dos síndromes hereditarios de predisposición al CCR, la poliposis adenomatosa familiar y el síndrome de Lynch. La investigación en estos y su extrapolación al CCR esporádico han permitido establecer una clasificación en base al modelo de tumorigénesis<sup>98</sup>.

Volgstein y cols. fueron los primeros en describir una cascada de alteraciones moleculares como responsables del desarrollo de CCR, establecieron la secuencia adenoma-carcinoma que llega hasta nuestros días y es la base del modelo de carcinogénesis del CCR más frecuente<sup>80</sup>.

En nuestros días, ese primer modelo explica la mayoría de tumores colorrectales; sin embargo, otros no presentan esas características y por ello se han postulado otros modelos de carcinogénesis como la inestabilidad de microsatélites (paradigma del CCR asociado al Síndrome de Lynch) y la vía del fenotipo metilador, que comparte muchas características con la inestabilidad de microsatélites<sup>98,99</sup>.

El CCR invariablemente surge de lesiones precursoras, pólipos, que muestran proliferación, displasia, diferenciación anormal y, en ocasiones, invasión focal. Los pólipos pedunculados son las lesiones precursoras más significativas, especialmente cuando alcanzan un tamaño superior a un centímetro (15% riesgo de progresar a CCR a lo largo de 10 años).

Adenomas no clásicos, como pólipos hiperplásicos, se consideraban sin potencial maligno, pero, en la actualidad, se reconocen también como precursores del CCR.

Los adenomas serrados con displasia evolucionan ocasionalmente a CCR con inestabilidad cromosómica y mutaciones en K-Ras; mientras que los adenomas sesiles serrados con ausencia de displasia pueden convertirse en CCR con inestabilidad de microsatélites, mutaciones en BRAF e hipermetilación<sup>79</sup>.

##### **Modelo de Inestabilidad Cromosómica (CIN):**

La inestabilidad cromosómica parece ser un fenotipo específico de CCR y, los tumores con CIN muestran frecuentes anomalías en el cariotipo (pérdidas y ganancias de cromosomas). Las pérdidas alélicas son bastante comunes en el CCR y la inestabilidad cromosómica es considerada promotor de la carcinogénesis a través de la pérdida de genes supresores y la ganancia en número de copias de oncogenes.

La inestabilidad cromosómica ha sido comúnmente determinada por el análisis de la ploidía del DNA o por el análisis de la pérdida de heterocigosidad (LOH) a partir de marcadores microsatélites. Para el análisis de LOH, marcadores de la región 18q han mostrado ser suficientemente sensibles comparados con otros en otros cromosomas; sin embargo, no hay criterios ni marcadores normalizados para determinar la CIN. Recientemente, se han utilizado diferentes *arrays* para mejorar la determinación de inestabilidad cromosómica<sup>98</sup>.

El factor presumiblemente iniciador de esta vía sería la pérdida de un gen supresor de tumores como es el gen *APC*. De ahí la denominación de vía supresora de carcinogénesis colorrectal, al ser este gen del tipo supresor (relacionado con la regulación negativa del ciclo celular), aunque también se observen, como se ha dicho, ganancias en el número de copias de oncogenes<sup>99</sup>.

La CIN es una característica del 80% de los tumores colorrectales y se asocia, frecuentemente, con mutaciones activadoras del punto de control K-Ras y pérdida de función de regiones que afectan a p53 y otros genes supresores de tumores en 18q y 17p, aunque no necesariamente en este orden (Figura 18)<sup>79</sup>.

### **Modelo de Inestabilidad de Microsatélites (MSI):**

La inestabilidad de microsatélites se refiere a alteraciones en la longitud de una secuencia corta de nucleótidos repetidos (microsatélites) en el DNA tumoral, comparada con DNA normal.

Desde 1993 Thibodeau y cols. sugirieron la MSI como un mecanismo de carcinogénesis alternativo a la inestabilidad cromosómica y, en nuestros días, ya se establece como un modelo diferente a la CIN (generalmente, mutuamente excluyentes en el CCR)<sup>100</sup>.

El modelo de carcinogénesis MSI se ha ido complicando a medida que avanza el conocimiento y, actualmente, se diferencian dos vías diferentes:

- 1- La MSI propiamente dicha, también conocida como RER (*replication error*) o como *Fenotipo Mutador*.
- 2- La vía CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) o *Fenotipo Metilador*, que, en la actualidad se la considera una vía de carcinogénesis alternativa.

Ambos modelos, comparten características clínicas y biológicas, como la preferencia por el colon proximal, o la pobre diferenciación de los tumores, pero difieren en el mecanismo iniciador (Figura 18).

### ***Fenotipo Mutador:***

La IMS es reflejo de la existencia de una alteración del sistema de reparación de errores de emparejamiento del DNA, que está encargado de corregir los fallos que se producen durante la replicación del DNA y es controlada por varios genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, entre otros). La alteración de este sistema conduce a la acumulación de alteraciones en los microsatélites que están distribuidos a lo largo de todo el genoma.

Hoy en día los tumores con IMS se refieren a aquellos que presentan IMS alta (2 ó más marcadores de microsatélites según el panel de Bethesda) y está presente en un 15% de los CCR, pudiendo producirse de dos formas diferenciadas:

- a) la que sucede en los casos de síndrome de Lynch, cuya base molecular serían mutaciones a nivel germinal de cualquiera de los genes relacionados con el sistema de reparación del DNA.
- b) en el que se hallan los casos esporádicos con IMS, donde la causa es la hipermetilación a nivel de la región promotora de los genes del sistema de reparación del DNA (con mayor frecuencia a nivel de *MLH1*).

Entre los genes que se ven implicados en la aparición de mutaciones en las secuencias repetidas de mononucleótidos codificantes (microsatélites codificantes) se encuentran distintos genes supresores tumorales, como son el del Receptor para el Factor de Crecimiento Transformador- $\beta$  tipo 2 (*TGFBR2*) o el gen *BAX*.

### ***Fenotipo Metilador***

Las islas CpG son regiones del DNA que están presentes en aproximadamente el 40% de los promotores de los genes de mamíferos. Son regiones donde existe una gran concentración de pares de Citosina y Guanina enlazados por fosfatos. Estos sitios CpG se encuentran desmetilados si los genes están expresados y, por tanto, la metilación de los dichos sitios CpG en los promotores de los genes puede inhibir la expresión del gen.

Esta vía de carcinogénesis colorrectal surgiría de una lesión precursora serrada (cuya caracterización histológica engloban los pólipos hiperplásicos, pólipos serrados sesiles, y adenomas serrados) y parece no seguir los mecanismos habituales de la secuencia clásica de adenoma-carcinoma. También se la conoce como *vía serrada*.

El mecanismo de los CCR que surgen a través de esta vía parece iniciarse mediante una mutación que activa el gen *BRAF*, lo que ocasiona una inhibición de la apoptosis a nivel de las células epiteliales del colon. A partir de este suceso, las lesiones serradas pueden dar lugar a pólipos hiperplásicos o pólipos serrados sesiles. Estas lesiones son muy propensas a la metilación de islotes CpG de regiones promotoras de múltiples genes y, por tanto, provocaría un silenciamiento epigenético de varios genes, siendo en principio aleatorio los genes específicos que se alteran.

En el caso de la metilación del promotor de *MLH1*, muy frecuente en estos casos, originan los CCR esporádicos con IMS. Sin embargo, parece ser un evento tardío a

partir del cual se produce una rápida adición de mutaciones de otros genes, como sucede también en el síndrome de Lynch y, por tanto, la progresión tumoral es más rápida<sup>98,99</sup>.

Los polimorfismos de único nucleótido (SNPs) son pequeñas variaciones en la secuencia de DNA que ocurren en un gran número de individuos y se consideran variantes de la normalidad; sin embargo, son muchos los estudios que se llevan a cabo para buscar posibles asociaciones con patologías o fenotipos. El SNP -93G>A localizado en el promotor del gen MLH1 se ha postulado como una alteración que interviene en la predisposición al desarrollo de tumores con inestabilidad de microsatélites asociado a la metilación del gen MLH1<sup>101</sup>.

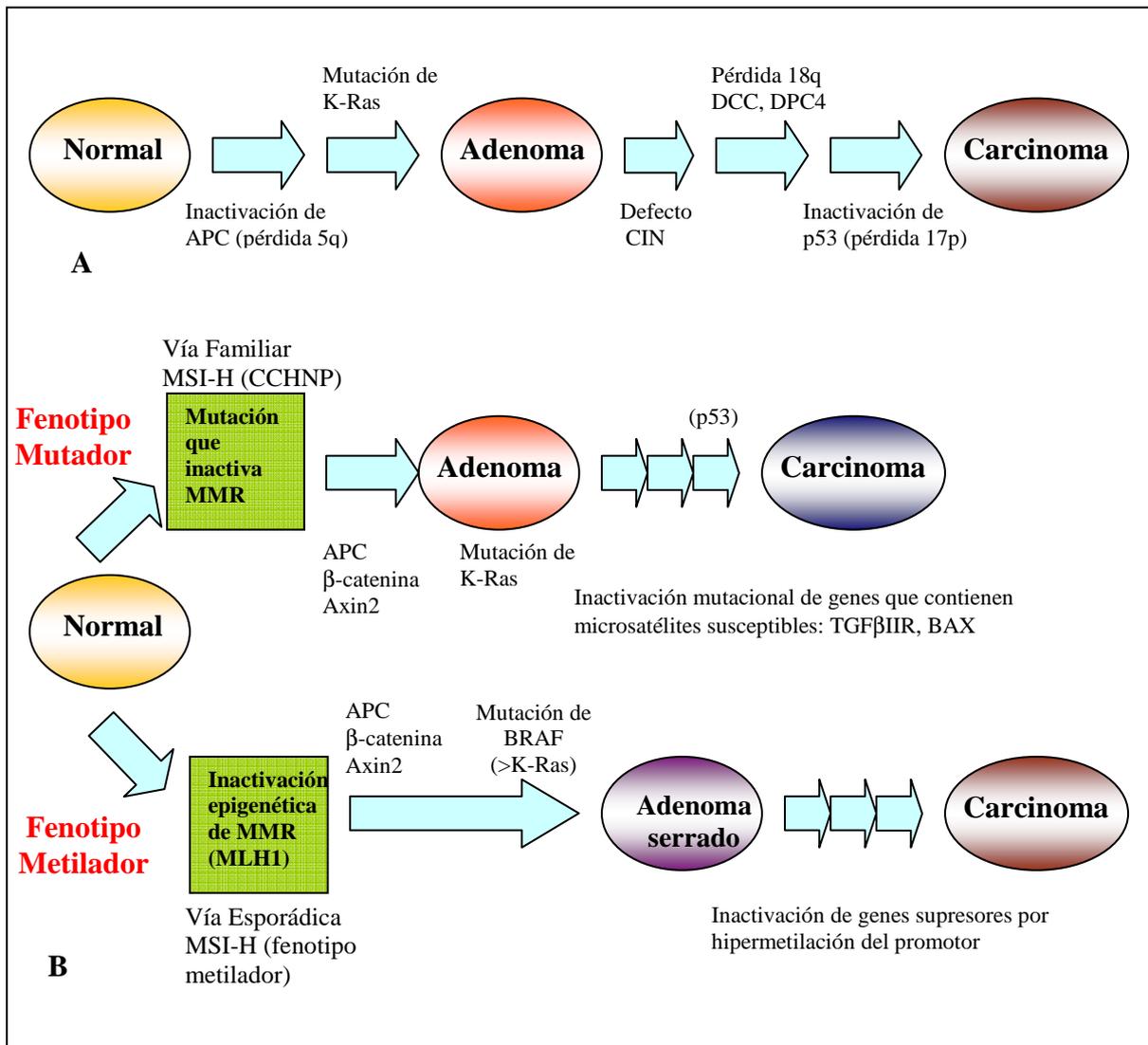


Figura 18. Vías de carcinogénesis del cáncer colorrectal.

A: Vía de inestabilidad cromosómica. B: Vía de la inestabilidad de microsatélites

(imagen adaptada de De Vita, et al. Cancer: Principles and practice of oncology, 10<sup>th</sup> Ed.)

Muchas son las clasificaciones que se establecen del CCR (localización, histopatología, etc.), pero cada vez con mayor frecuencia se clasifica al cáncer colorrectal en diferentes fenotipos atendiendo a su perfil molecular.

La clasificación molecular de los tumores colorrectales se confecciona a partir de los eventos celulares globales predominantes: vía supresora en el caso de CIN; vía mutadora en el caso de MSI o vía metiladora en el del Fenotipo Metilador.

Para resolver la inconsistencia entre las clasificaciones del CCR basadas en la expresión génica y facilitar la traslación a la clínica, se formó un consorcio internacional dedicado a compartir y analizar muchos datos entre grupos expertos. De esta forma, surge la clasificación molecular de consenso o “El Consenso de Subtipos Moleculares del Cáncer Colorrectal”. Este consorcio internacional, clasifica a los tumores colorrectales en 4 grupos con características moleculares diferenciadoras, los subtipos moleculares de consenso (CMS)<sup>102</sup>.

- CMS1: denominado también como grupo de inestabilidad de microsatélites inmune. Representa el 14% de todos los tumores.
- CMS2: denominado también canónico o epitelial. Representa el 37% de los cánceres colorrectales.
- CMS3: denominado también metabólico, representa el 13% de los tumores.
- CMS4: denominado también mesenquimal, representa el 23% de los CCRs.

El consorcio identifica un 13% de tumores no clasificables y no representan un quinto grupo independiente; esto podría deberse a la calidad de las muestras de expresión génica en estos tumores.

Las principales características de los cuatro subgrupos moleculares de consenso se recogen en la figura 19.

CMS1 MSI inmune	CMS2 Canónico	CMS3 Metabólico	CMS4 Mesenquimal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP alto, hipermutación	SCNA alto	MSI mixto, bajo SCNA, bajo CIMP	SCNA alto
Mutaciones BRAF		Mutaciones KRAS	
Infiltración y activación Inmune	Activación WNT y MYC	Desregulación metabólica	Infiltración estromal, activación TGF- $\beta$ , angiogénesis
Peor supervivencia tras la recaída			Peor SLP y SG

Figura 19. Clasificación Molecular de consenso del CCR. (adaptada de Guinney J, Dienstmann R, et al. Nat Med 2015)  
 MSI: inestabilidad de microsatélites. CIMP: CpG Island Methylator Phenotype. SCNA : alteración número copias somático.  
 SLP : supervivencia libre de progresión. SG : supervivencia global.

Teniendo en cuenta todos los datos, podemos decir que partimos de una clasificación básica, sencilla, donde los tumores se clasifican por su modelo de carcinogénesis (CIN o MSI), que, posteriormente, el mayor conocimiento molecular de los tumores, llevó a clasificarlos en base al evento predominante (vía supresora, vía mutadora o vía metiladora) y, en la actualidad, cobran importancia tanto unos como otros y entran en juego la genómica, la epigenómica, la trascríptómica, el sistema inmune, el estroma y la clínica (figura 20), estableciendo un nuevo modelo de clasificación molecular de los tumores colorrectales.

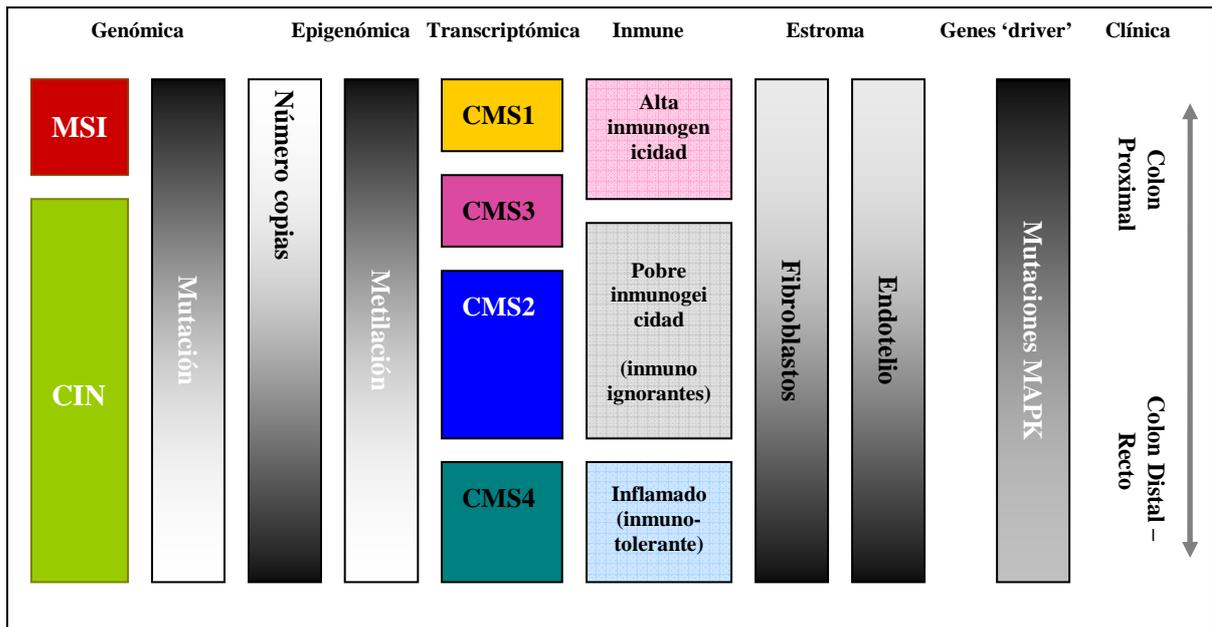


Figura 20. Clasificación del CCR (adaptada de Guinney J, Dienstmann R, et al. Nat Med 2015)

## 5- SINDROMES HEREDITARIOS DE PREDISPOSICIÓN AL CCR

### Síndromes no polipósicos

El síndrome no polipósico de predisposición al cáncer colorrectal es el, también denominado, síndrome de Lynch. Es el síndrome hereditario asociado al cáncer de colon más frecuente y representa el 1-5% de todos los cánceres colorrectales que se diagnostican en la actualidad. Se define por la presencia de mutaciones germinales en los genes del sistema reparador de bases desapareadas del ADN (mismatch repair-MMR) y sigue un patrón de herencia mendeliano autosómico dominante.

### Poliposis

Las poliposis gastrointestinales se caracterizan por la presencia de múltiples lesiones polipoideas con afectación preferente del área colorrectal. Constituyen un grupo de patologías de escasa incidencia pero con muy variadas características<sup>103</sup>.

En la tabla 8 se exponen los principales síndromes de poliposis gastrointestinal con riesgo de desarrollar cáncer colorrectal.

Tabla 8. Poliposis gastrointestinal hereditaria asociada a CCR

<b>Poliposis Adenomatosa</b>
❖ Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) ❖ Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada (PAFA) ❖ Poliposis Adenomatosa Asociada a MYH (PAM)
<b>Poliposis Hamartomatosa</b>
❖ Síndrome de Peutz-Jeghers ❖ Poliposis Familiar Juvenil
<b>Otras Poliposis</b>
❖ Poliposis Mixta Familiar ❖ Poliposis Hiperplásica Familiar

#### - *Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF):*

La poliposis adenomatosa familiar es la poliposis más importante. Se trata de una enfermedad con patrón de herencia mendeliano autosómico dominante con una prevalencia de 1 de cada 10.000 individuos y con una incidencia estimada en la población española de 2.8 por 100.000 habitantes. Supone menos del 0.5% de todos los cánceres colorrectales; pero es muy importante debido a que presenta una penetrancia del 100%.

La manifestación más importante de la PAF es la aparición de más de 100 pólipos (cientos o miles) adenomatosos en el colon y el recto, iniciándose a una edad muy joven y con un riesgo de cáncer colorrectal cercano al 100% si el paciente no es tratado de forma precoz.

Además de la patología colorrectal, dado que la PAF constituye un desorden genético complejo, puede asociarse con gran cantidad de alteraciones en otros órganos, como son: osteomas, quistes epidérmicos, tumores desmoides, pólipos gastroduodenales, tumores en intestino delgado, hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina, tumores hepatobiliares, tiroideos y del sistema nervioso central.

La Poliposis Adenomatosa Familiar se produce por mutaciones del gen APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), localizado en el cromosoma 5q, que codifica una proteína con múltiples dominios que juegan un papel importante en la vía de señalización Wnt y en la adhesión intercelular.

El 80% de los individuos con PAF se deben a mutaciones de línea germinal y, por tanto, con historia familiar; mientras que cerca del 20% son mutaciones producidas *de novo* y, en estos casos, los padres y hermanos del paciente no presentarán la enfermedad (no así sus hijos, que tendrán un 50% de posibilidades de heredar la enfermedad).

- ***Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada (PAFA):***

La variante atenuada de la PAF difiere de la forma clásica en que existe un número menor de pólipos (generalmente más de 15 y menos de 100) y que, además, tiende a desarrollarse en el colon derecho. La edad de aparición de los pólipos o el cáncer suele retrasarse unos 15 años en relación a la PAF clásica. No existen diferencias en cuanto a la aparición de lesiones en el tracto gastrointestinal superior, si bien presentan una limitada expresión de manifestaciones extracolónicas.

La PAFA se origina por mutaciones en el gen supresor APC, al igual que la clásica, pero en regiones diferentes del gen.

- ***Poliposis Adenomatosa Asociada a MYH (PAM):***

La poliposis adenomatosa asociada al gen MYH representa el 30% de las poliposis adenomatosas familiares atenuadas. Difiere en el patrón de herencia mendeliano, que es recesivo y, se deriva de mutaciones bialélicas en el gen MYH.

- ***Síndrome de Peutz-Jeghers:***

El Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ) es una enfermedad autosómica dominante con una elevada penetrancia y una incidencia estimada de 1 de cada 120.000 nacimientos. Aproximadamente el 50% de los casos son familiares y el resto esporádicos.

El síndrome se caracteriza por la aparición de múltiples pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal asociados con manchas melánicas mucocutáneas y un riesgo elevado de padecer neoplasias (intestino delgado, estómago, colon, páncreas, mama y ovario entre otros). Hasta un 95% de los pacientes con SPJ tienen manchas de melanina,

generalmente en los labios o en la mucosa bucal, aunque también pueden aparecer en otras localizaciones.

Los carcinomas del tracto gastrointestinal son frecuentes en el SPJ, siendo el riesgo de cáncer gastrointestinal 15 veces mayor que en la población general.

El gen responsable del SPJ es el gen supresor de tumores LKB1/STK11, que aparece mutado o presenta deleciones en hasta un 80-90% de los casos de SPJ.

- ***Poliposis Familiar Juvenil:***

El síndrome de Poliposis Familiar Juvenil es el síndrome de poliposis hamartomatosa más frecuente. Se hereda mediante un patrón de herencia mendeliano autosómico dominante con un penetrancia variable. Dependiendo de las series, el 20-50% de los afectos presentan historia familiar. La edad media de inicio son los 18 años.

Existe asociación con anomalías congénitas en el 15% de los casos, siendo las más frecuentes la malrotación intestinal, las alteraciones genitourinarias y los defectos cardíacos.

En la poliposis juvenil el riesgo de cáncer del tracto gastrointestinal, principalmente del cáncer colorrectal, es muy elevado (20-70%) y aumenta con la edad.

Se han descrito mutaciones de línea germinal en los genes SMAD4 (18q21) y BMPR1A (10q21-22) que están en la vía del TGF-beta, implicados en el desarrollo de la poliposis juvenil, aunque un tercio de los casos no muestran cambios detectables en dichos genes.

- ***Poliposis Mixta Familiar:***

El síndrome de Poliposis Mixta Familiar se caracteriza por la presencia de una variedad de diferentes tumores colorrectales entre los que se incluyen pólipos adenomatosos, hiperplásicos y hamartomatosos, y carcinomas. Parece afectar sólo al colon y no se han descrito manifestaciones extraintestinales.

Aún no se ha descrito el gen responsable de la enfermedad.

- ***Poliposis Hiperplásica Familiar:***

La Poliposis Hiperplásica Familiar se caracteriza por la presencia de pólipos hiperplásicos inusuales (inicio precoz y/o gran tamaño y/o localización en el colon proximal y/o múltiples) en el colon y en el recto. Inicialmente se consideró que era una entidad infrecuente sin potencial maligno. Posteriormente, se ha podido comprobar que algunos casos de poliposis hiperplásica se asocian con un mayor riesgo de cáncer colorrectal tanto para los pacientes como para sus familiares.

Existen dudas sobre su patrón de herencia y aún no se conoce el gen implicado en su patogénesis.

## 6- SÍNDROME DE LYNCH

El cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP), también conocido como síndrome de Lynch (SL), representa entre el 1 y el 5% de todos los cánceres colorrectales, siendo el síndrome hereditario de predisposición al cáncer de colon más frecuente.

La primera familia con síndrome de Lynch fue descrita por Warthin, patólogo de la Universidad de Michigan, en 1913, tras estudiar el árbol genealógico de una chica que falleció a edad temprana de cáncer de endometrio metastásico. En 1895, su costurera le dijo que ella probablemente fallecería debido a un cáncer de colon, estómago o ginecológico, ya que en su familia se daban con mucha frecuencia (desafortunadamente, como había predicho sufrió un cáncer de endometrio metastásico a edad temprana). Warthin publicó esto, junto a otras familias propensas al cáncer. En 1925 actualizó los datos de esta familia y, desde entonces, se la conoce como familia G<sup>104,105</sup>.

Sesenta años más tarde, Henry Lynch y Ann Krush actualizaron los datos sobre esta familia<sup>106</sup>. A lo largo de los siguientes 25 años, Henry Lynch fue, prácticamente, el único investigador que siguió describiendo este síndrome y del que toma su nombre.

En 1990 se creó el Grupo Colaborativo Internacional para promover la investigación del Síndrome de Lynch a nivel internacional. La cooperación internacional en esta área del conocimiento ha facilitado el estudio de este síndrome y ha permitido la identificación de las alteraciones genéticas responsables del mismo<sup>107</sup>.

### *Características Clínicas*

El cáncer de colon hereditario no polipósico se caracteriza por varios rasgos clínicos específicos. En la figura 21 se muestra un árbol genealógico de una familia con SL clásico.

El SL presenta un patrón de herencia mendeliano autosómico dominante, con una penetrancia del 80%. Las mutaciones *de novo* se han encontrado con poca frecuencia.

El tumor más frecuentemente asociado al SL es el cáncer colorrectal; sin embargo, se han descrito multitud de tumores extracolónicos asociados al SL. El riesgo de padecer CCR en el SL se desconoce, ya que casi todos los informes sobre el riesgo de CCR son sesgados, ya que las familias se seleccionan considerando el agrupamiento de CCR.

Los tumores extracolónicos que más frecuentemente se han descrito asociados al SL se describen en la tabla 9; no obstante, la frecuencia de aparición de cada uno de ellos es variable y las diferencias clínicas fenotípicas del SL tienen que ver tanto con la alteración molecular en cada caso, así como con la penetrancia variable que presenta este síndrome<sup>108</sup>.

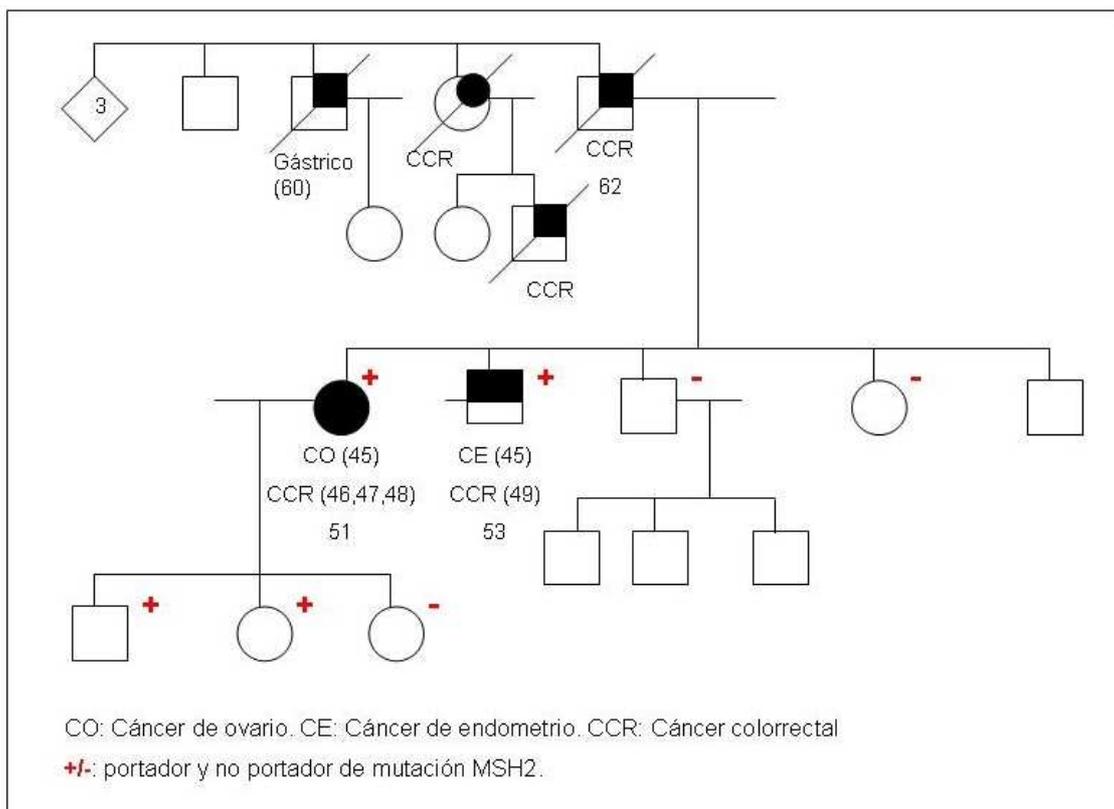


Figura 21. Árbol de una familia con Síndrome de Lynch (Unidad de Consejo Genético - Servicio de Oncología Médica del CAUSA)

Tabla 9. Riesgo de tumores en síndrome de Lynch.

Colorrectal (varón)	65-80%
Colorrectal (mujer)	30-70%
Endometrio	40-60%
Ovario	9-12%
Gástrico	2-13%
Vías urinarias	4-6%
Cerebral	4%
Vesícula biliar y vías biliares, páncreas	2%
Intestino delgado	5%
Tumores glándulas sebáceas	0-40%

Una de las características principales del SL es la edad temprana de aparición de los tumores.

El CCR en menores de 45 años representa un 11% de los tumores de colon y el 18% de los tumores de recto, y muchos de ellos no asocian inestabilidad de microsátélites. Algunos estudios que se están llevando a cabo en esta población de pacientes sugieren diferentes subtipos de CCR en base a la localización tumoral con correlación molecular y, frecuentemente, no asociado a síndromes hereditarios de cáncer colorrectal. No

obstante, es fundamental la valoración en una unidad de consejo genético de los pacientes con CCR a edad temprana atendiendo a los diferentes escenarios que nos podemos encontrar y el potencial beneficio de un diagnóstico y cribado acertado<sup>109,110</sup>.

El CCR asociado al SL tiene unas características fenotípicas definidas: predomina en colon derecho (70% región proximal a la flexura esplénica), son a menudo pobremente diferenciados y, con frecuencia, presentan diferenciación mucinosa o con células en anillo de sello. La OMS ha descrito un subtipo histológico que aparece casi exclusivamente en tumores con inestabilidad de microsatélites, el carcinoma medular que, por tanto, también está asociado al SL. Presentan con frecuencia reacción tipo Crohn o presencia de infiltración linfocítica peritumoral. Se suelen diagnosticar en estadios más precoces que el CCR esporádico y parece que son de mejor pronóstico, probablemente asociado a la IMS de estos tumores<sup>108,111</sup>.

Otra característica de los tumores asociados al SL es la alta incidencia de tumores sincrónicos (CCR múltiples diagnosticados en los primeros seis meses del primer diagnóstico) o metacrónicos y de tumores asociados.

En el CCHNP tiene lugar una aceleración de la carcinogénesis, de modo que la transformación de un diminuto adenoma a carcinoma tiene lugar en 2-3 años, en lugar de la evolución poblacional donde el paso adenoma-carcinoma puede llevar 10 años<sup>108</sup>.

El diagnóstico de Síndrome de Lynch es, a diferencia de la poliposis adenomatosa familiar, complejo dado lo heterogéneo del síndrome. Por este motivo, el Grupo Colaborativo Internacional sobre CCHNP (ahora conocido como International Society of Gastrointestinal Hereditary Tumours – INSIGHT) propuso en 1990 un conjunto de criterios para detectar a los sujetos con Síndrome de Lynch conocidos como criterios de Ámsterdam<sup>107</sup>.

Estos criterios permitieron utilizar la misma terminología por todos los investigadores; sin embargo, también fueron criticados por ser demasiado estrictos, de modo que excluían a familias con pocos miembros, no incluían tumores extracolónicos y tampoco las características de los tumores colorrectales. Por este motivo, en 1999, se establecieron unos nuevos criterios, denominados criterios de Ámsterdam modificados (donde se incluyen los tumores extracolónicos)<sup>112</sup>.

A lo largo de los años se han desarrollado muchos criterios para la identificación del SL. En 1996, se propusieron las guías de Bethesda, que describen casi todas las condiciones clínicas en las que existe sospecha de Síndrome de Lynch. Diversos estudios han puesto de manifiesto que estos criterios resultan útiles para la identificación de familias que deberán someterse a estudios genéticos para la detección de CCHNP. Recientemente, los criterios de Bethesda, han sido actualizados<sup>113-115</sup>.

En las tablas 10, 11 y 12, se recogen los criterios de Ámsterdam, Ámsterdam modificados y los criterios de Bethesda revisados.

Tabla 10. Criterios de Ámsterdam I de SL.

**CRITERIOS DE ÁMSTERDAM I**

Debe haber al menos tres parientes con cáncer colorrectal.

- un familiar debe ser pariente en primer grado de los otros dos,
- al menos dos generaciones sucesivas deberán verse afectadas,
- al menos un tumor debe ser diagnosticado antes de los 50 años de edad,
- deberá excluirse la poliposis adenomatosa familiar,
- los tumores deben ser confirmados mediante estudio histopatológico.

Tabla 11. Criterios de Ámsterdam Modificados de SL.

**CRITERIOS DE ÁMSTERDAM II (modificados)**

Deberá haber al menos tres parientes con cáncer colorrectal o con un cáncer asociado al síndrome de Lynch: cáncer de endometrio, de intestino delgado, de uréter o pelvis renal.

- un familiar debe ser pariente en primer grado de los otros dos,
- al menos dos generaciones sucesivas deberán verse afectadas,
- al menos un tumor debe ser diagnosticado antes de los 50 años de edad,
- la poliposis adenomatosa familiar deberá ser excluida en el caso de cáncer colorrectal si hubiese alguno,
- los tumores deben ser confirmados mediante estudio histopatológico.

Tabla 12. Criterios de Bethesda revisados de SL.

**CRITERIOS DE BETHESDA REVISADOS**

- A. Cáncer colorrectal diagnosticado en un paciente menor de 50 años de edad,
- B. Presencia de tumores colorrectales sincrónicos, metacrónicos, u otros tumores asociados al Síndrome de Lynch\*, independientemente de la edad;
- C. Cáncer colorrectal con una histología IMS-H\*\* diagnosticado en pacientes menores de 60 años;
- D. Pacientes con cáncer colorrectal y un pariente de primer grado que presentan un tumor asociado con el síndrome de Lynch, y con uno de los cánceres diagnosticados antes de los 50 años; y
- E. Pacientes con cáncer colorrectal con dos o más parientes de primer o segundo grado con un tumor asociado al síndrome de Lynch, independientemente de la edad.

\*Tumores asociados con el síndrome de Lynch incluyen colorrectales, endometrio, estómago, ovario, páncreas, uréter y pelvis renal, conducto biliar y cerebrales y, adenomas de glándula sebácea y queratoacantomas (en síndrome de Muir-Torre) y de intestino delgado.

\*\*MSI-H: alta inestabilidad de microsátélites.

**Características Moleculares****1- Mecanismos de reparación del DNA<sup>116</sup>**

El DNA nuclear está continuamente expuesto a factores endógenos y exógenos que le pueden originar daños. Para evitar las mutaciones del DNA, junto a mecanismos extremadamente precisos de replicación del DNA, son necesarios otros mecanismos que reparen las lesiones que se producen constantemente en el DNA.

Se han descrito cuatro mecanismos principales de reparación del DNA, los tres primeros reparan lesiones que afectan a una sola cadena, tomando como ventaja la redundancia inherente a la doble hélice:

- 1- *Reparación de errores por desapareamiento- Mismatch repair (MMR)*: protege la estabilidad del DNA al corregir los emparejamientos de bases que se producen de forma errónea durante la replicación y la recombinación.

- 2- *Reparación por escisión de bases (BER)*: elimina las bases nitrogenadas dañadas. En este sistema de reparación se incluye MYH, el único gen de este sistema de reparación con predisposición hereditaria al cáncer.
- 3- *Reparación por escisión de nucleótidos (NER)*: se encarga de reparar las lesiones inducidas por la radiación UV y los aductos de DNA secundarios a múltiples compuestos químicos, entre ellos el tabaco.
- 4- *Reparación de rotura de doble cadena*: este mecanismo utiliza dos posibles vías de reparación:
  - Recombinación homóloga: esta forma es muy exacta. Sólo puede llevarse a cabo en determinadas fases del ciclo celular, tras la replicación, cuando dispone de la cromátide hermana que le servirá como molde.
  - Recombinación no homóloga: es más rápida pero favorece la aparición de nuevos errores, ya que se limita a unir los extremos rotos, perdiendo la secuencia entorno a la rotura. Además, si la unión se produce entre secuencias de dos cromosomas diferentes, puede dar lugar a la aparición de translocaciones.

## 2- Sistema de reparación de errores por desapareamiento (MMR)<sup>117</sup>

Durante la replicación del DNA, se producen de forma espontánea emparejamientos erróneos, inserciones y deleciones de bases que son corregidos mediante MMR. Este mecanismo bloquea, además, la recombinación no homóloga, interviene en puntos de control del ciclo celular y en la muerte celular programada en respuesta a ciertos daños del DNA.

Mutaciones en alguno de los genes implicados en el sistema de reparación de bases desapareadas del DNA (sistema Mismatch Repair- MMR), son las responsables de la aparición del Síndrome de Lynch o de Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico (CCHNP).

La importancia del sistema MMR para mantener la estabilidad del genoma bacteriano se demostró hace más de 40 años con la observación de que defectos en estas vías se asociaban a una alta tasa de mutaciones espontáneas. Posteriormente, se identificó este sistema en las células humanas, lo que significa que está altamente conservado a través de la escala evolutiva.

El primer organismo donde se descubrió este sistema de reparación fue en *Escherichia coli* y a los genes que codificaban las proteínas encargadas de la reparación se les denominó “Mut” debido a que su inactivación generaba hipermutabilidad. MutS se une al error del DNA, MutL se une al complejo MutS-DNA y este complejo, activa MutH. De esta forma se procede a la reparación de los errores de bases desapareadas.

Aunque, como hemos dicho, el sistema de reparación es un proceso muy bien conservado a lo largo de la evolución, existen diferencias significativas. No obstante, en

los organismos eucariotas se han encontrado proteínas homologas a las proteínas implicadas en el sistema de reparación de los organismos procariotas.

En mamíferos se han descrito cinco homólogos de MutS: MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6. Estas proteínas ejercen su función en forma de heterodímeros. Los heterodímeros formados por MSH2-MSH6, también denominado MutS $\alpha$ ; y MSH2-MSH3, MutS $\beta$ , son necesarios para el reconocimiento del error en la secuencia del DNA durante la reparación. Estos dos complejos proteicos actúan frente a errores diferentes, de modo que MutS $\alpha$  reconoce emparejamientos erróneos o bucles de 1 o 2 nucleótidos, mientras que MutS $\beta$  identifica bucles que afectan a más de dos nucleótidos.

Así mismo, se han descrito cuatro homólogos de MutL en eucariotas: MLH1, MLH2, MLH3 y PMS2 (en mamíferos) o PMS1 (en otros organismos). Al igual que los homólogos de MutS, estos también actúan como heterodímeros. MutL $\alpha$  está formado por la interacción de MLH1 y PMS2 y, MutL $\beta$  está formado por MLH1 y MLH3. Estos complejos tienen actividad ATPasa y actúan como nexo de unión con las proteínas responsables de la escisión y síntesis.

### 3- Efecto de las mutaciones en el sistema *mismatch repair*

Los defectos del sistema MMR producen un aumento de la inestabilidad de todo el genoma, dando lugar a la aparición del denominado 'Fenotipo Mutador', es decir, la deficiencia en el sistema de reparación provoca un aumento en la frecuencia de mutaciones. Estas mutaciones se producen, sobre todo, en unas zonas altamente repetitivas de unos pocos nucleótidos, denominadas microsatélites, en las que la inserción o eliminación de una base puede, fácilmente, producir un codón de parada y, en consecuencia, una proteína no funcional.

Cuando aparecen estas mutaciones en las zonas de microsatélites, se produce el fenómeno conocido como inestabilidad de microsatélites, este hecho supone un buen marcador de los fallos en el sistema de reparación.

La inestabilidad de microsatélites puede producirse no sólo en el cáncer colorrectal hereditario no polipósico, sino también en el cáncer colorrectal esporádico. Sin embargo, el mecanismo por el que aparece es diferente, como hemos comentado anteriormente.

En el Síndrome de Lynch, la inestabilidad de microsatélites se produce por una mutación germinal de alguno de los genes que forman parte del sistema MMR. En el 90% de los casos la mutación tiene lugar en MLH1 y MSH2, mientras que el 10% restante se debe a mutaciones en MSH6, siendo muy infrecuentes las mutaciones en el resto de genes implicados.

En el cáncer colorrectal esporádico, la inestabilidad de microsatélites, se produce por pérdida en la expresión correcta de alguno de los genes del sistema MMR, debido a cambios epigenéticos del DNA, siendo lo más frecuente la metilación de la región promotora de MLH1<sup>111,118</sup>.

La evidencia clínica ha llevado a concluir que los sujetos con CCR esporádico que comparten mecanismos moleculares con el cáncer de colon asociado a síndrome de Lynch, también comparte características clínicas, pronósticas y de tratamiento<sup>89</sup>.

La inactivación de los genes MLH1 y MSH2 se expresa en los tumores como inestabilidad de microsatélites de alto grado (MSI-H), sin embargo, la inactivación de MSH6 no va asociada a tal inestabilidad.

En la actualidad se acepta como definición de CCR MSI-H la dada por el Instituto Nacional del Cáncer americano, que lo define como aquellos tumores en los que aparece inestabilidad en dos o más microsatélites de los cinco de los que consta el panel estándar; en el caso de que sólo haya inestabilidad en uno de ellos se hablara de baja inestabilidad de microsatélites (MSI-L) o estabilidad de microsatélites (MSS) cuando no afecta a ninguno.

Esta batería de cinco microsatélites se determinó tras realizar varios estudios y son los que se aceptan en la actualidad<sup>119</sup>. Se recogen los siguientes:

- BAT25 (4q12)
- BAT26 (2p16.3-p21)
- D5S346 (5q21-22)
- D17S250 (17q11.2-q12)
- D2S123 (2p16)

El test genético es el método diagnóstico que confirma o descarta la presencia de Síndrome de Lynch; sin embargo, se necesitan muchos recursos para su determinación y, por tanto, no puede ser una técnica de cribado. Es por esto por lo que se están perfeccionando los algoritmos diagnósticos incorporando nuevas técnicas como la inestabilidad de microsatélites o la determinación inmuno-histoquímica de las proteínas codificantes para los genes del sistema MMR.

Esta última técnica tiene ciertas ventajas sobre la inestabilidad de microsatélites; por un lado es capaz de detectar defectos en la expresión proteica de los genes MMR que no dan lugar a inestabilidad de microsatélites, como puede ocurrir en las mutaciones de MSH6 y, por otro lado, permite conducir la estrategia a seguir para el test genético, haciendo innecesario determinar las mutaciones en todos los genes implicados en la ruta de la reparación del DNA, cuando sólo existe alteración en la expresión de la proteína codificante de uno de ellos, de forma que se analizaría el gen con ausencia de expresión de su proteína.

Existen diversos estudios que demuestran que la IHQ de las proteínas producidas por los genes del sistema MMR es un método de cribado rápido, coste-efectivo, sensible y extremadamente específico para estudiar los defectos en genes reparadores del DNA<sup>120</sup>.

En un estudio publicado por Hampel, se muestra que la determinación por IHQ de las proteínas de expresión de los genes reparadores puede ser de similar efectividad que la estrategia más compleja de genotipado por inestabilidad de microsatélites. Además, en este estudio se proporciona una estrategia de cribado para pacientes con Síndrome de Lynch<sup>121</sup>.

En la actualidad, las guías de manejo de cáncer colorrectal hereditario, incorporan la determinación IHQ de las proteínas codificantes de los genes reparadores del DNA como parte de la estrategia diagnóstica de SL<sup>122,123</sup>.

## 7- POLIPOSIS ASOCIADA A MYH

La poliposis asociada a MYH es un síndrome hereditario responsable de la aparición de cáncer colorrectal a edad temprana, con una base genética diferente de la poliposis adenomatosa familiar y del síndrome de cáncer colorrectal hereditario no polipósico.

Este síndrome hereditario, descrito por primera vez en el año 2002, comparte características clínicas con la poliposis familiar atenuada y con el Síndrome de Lynch, lo que hace que la poliposis asociada a MYH se considere una entidad diferenciada<sup>124,125</sup>.

### *Características Clínicas*

El síndrome de poliposis asociada a MYH (MAP) se caracteriza por la presencia de múltiples pólipos adenomatosos en el colon, siendo responsable del 30-40% de los casos de poliposis adenomatosa en los que no se encuentran mutaciones en APC. Sin embargo, estudios recientes muestran que el fenotipo puede variar.

La MAP es el primer síndrome hereditario de predisposición al cáncer colorrectal que sigue un patrón de herencia mendeliano autosómico recesivo; por tanto, no comparte la teoría del 'segundo golpe' porque los dos alelos están mutados desde el nacimiento. Tiene una penetrancia casi completa con una expresión variable.

Los individuos con MAP desarrollan habitualmente entre 10 y 100 pólipos entre los 40-50 años; sin embargo, la presentación clínica puede variar y los portadores de MAP pueden tener sólo unos pocos pólipos (<10) e, incluso, desarrollar CCR en ausencia de pólipos.

Aunque los pólipos clásicamente asociados a la MAP son adenomas, se han asociado también pólipos hiperplásicos y/o serrados<sup>126</sup>.

El riesgo de CCR a lo largo de la vida de los individuos con MAP es muy alto, con una penetrancia casi completa a los 60 años. Además, los portadores de un solo alelo mutado del gen MYH (portadores heterocigotos) parecen tener un incremento en el riesgo de CCR, aunque no son claras las evidencias acerca de la magnitud del riesgo, pudiendo ser relevante el tipo de mutación, como se describe en algunos artículos<sup>127,128</sup>.

El síndrome de poliposis asociada a MYH también se caracteriza por la aparición de *manifestaciones extracolónicas*, aunque estas son menos frecuentes que en la poliposis adenomatosa familiar (PAF). Así, se describe la aparición de pólipos gástricos y duodenales en un 20-25% de portadores de MAP. Los pólipos de glándulas fúndicas del estómago son, incluso, menos frecuentes (a diferencia de lo que ocurre en la PAF). Otras manifestaciones de la PAF, son muy raras en la MAP, como la hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina, los osteomas o los tumores desmoides<sup>129-130</sup>.

El riesgo de otros tumores en la MAP no está muy bien determinado, si bien algunos casos descritos recientemente indican que el espectro de tumores extracolónicos asociados a la MAP difiere de la PAF y, sin embargo, se parecen más a lo que ocurre en

---

el síndrome de Lynch. Se ha descrito un incremento en el riesgo de tumores de duodeno, ovario, vejiga y piel y, algunos autores, describen también un incremento en el cáncer de endometrio<sup>131-133</sup>.

Algunos autores, también describen una correlación genotipo-fenotipo en la poliposis asociada a MYH, aunque son necesarios estudios prospectivos para validar estos hallazgos.

El diagnóstico de sospecha de MAP debe realizarse ante la presencia en un individuo de 10 o más adenomas colorectales o historia de adenomas en combinación con otras manifestaciones extracolónicas asociadas. El diagnóstico de certeza debe ser siempre genético.

### ***Características Moleculares***

El gen MYH está localizado en el cromosoma 1 (1p34), contiene 16 exones que codifican una proteína de 535 aminoácidos y participa, junto con otros genes, en el sistema de reparación del DNA por excisión de bases (BER).

La oxidación del DNA conduce a la formación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxoG), uno de los productos más estables del daño oxidativo del DNA. MYH es una glicosilasa que reconoce bases de guanina con daño oxidativo (8-oxoG). Estas bases tienden a emparejarse de forma incorrecta con adenina, de modo que un par de bases que fuese inicialmente G:C, se convertiría en 8-oxoG:A y, tras la replicación, se puede incorporar una timina en oposición a la adenina, originándose una transversión G:C>T:A. MYH es única entre las DNA glicosilasas porque reconoce la base dañada (8-oxoG) pero no la elimina, sino que elimina la base con la que se empareja erróneamente (adenina). La pérdida de función de MYH y la subsiguiente aparición de transversiones G:C>T:A originan mutaciones sin sentido que, con frecuencia, afectan a K-Ras y a APC. La presencia de estas transversiones en K-Ras permite distinguir los pólipos asociados a mutaciones en MYH de aquellos debidos a mutaciones iniciales en APC ya que estos últimos rara vez las presentan<sup>134-137</sup>.

Por tanto, el gen supresor APC puede estar mutado por varios mecanismos durante la oncogénesis colónica: de forma congénita en la PAF, de forma somática en el CCR esporádico y de forma secundaria a la inactivación del gen MYH en la poliposis asociada a MYH<sup>138</sup>.

Se han comunicado dos mutaciones del gen MYH como responsables de la mayoría de casos de poliposis asociadas a este gen en población caucásica. Son las mutaciones Y179C (exón 7) y G396D (exón 13), aunque hay otras muchas descritas<sup>139</sup>.

La penetrancia de CCR en individuos con mutaciones bialélicas en MYH es alta, pero incompleta. La penetrancia de pólipos colónicos es desconocida; más de un tercio de portadores de mutaciones en homocigosis del gen MYH desarrollan cáncer colorectal en ausencia de pólipos, lo que sugiere una penetrancia incompleta.

Recientemente se ha sugerido que los pólipos asociados a la MAP no tienen porqué ser adenomas; de esta manera, en pequeñas series de casos de portadores de MAP, se

describe la presencia de pólipos serrados. En este sentido, las transversiones G:C>T:A tienen lugar en el gen APC cuando aparecen pólipos adenomatosos, mientras que tienen lugar en el gen K-Ras cuando los pólipos son serrados; por lo que podrían diferenciarse dos grupos de MAP en función del análisis molecular de los pólipos<sup>140</sup>.

Los tumores colorrectales asociados a mutaciones en MYH tienen, a menudo, inestabilidad baja de microsatélites, lo que sugiere una asociación funcional entre el sistema BER y el sistema MMR<sup>141</sup>.

## 8- IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL DESARROLLO MOLECULAR EN CCR

Hasta hace pocos años, la única terapia disponible para el tratamiento del CCR era la quirúrgica y la supervivencia dependía, fundamentalmente, del estadio del tumor al diagnóstico; en nuestros días, el estadio sigue siendo el principal factor pronóstico del CCR, siendo la supervivencia del 97% cuando el estadio es inicial (estadio I) y menor del 7% cuando la enfermedad diagnosticada esta diseminada<sup>82</sup>.

En los años 70, el único tratamiento disponible para la enfermedad avanzada era el 5FU, tratamiento sistémico que sigue siendo un pilar básico del tratamiento médico del CCR en nuestros días; con este fármaco y el tratamiento quirúrgico, se conseguía una supervivencia global del CCR del 50%.

Durante los últimos años, con la entrada del nuevo siglo, hemos asistido a un incremento en la supervivencia global del CCR, llegando al 65%, debido a varias razones, entre las que se encuentran:

- 1- Aparición de nuevos fármacos
- 2- Mejora en los tratamiento de soporte
- 3- Programas de cribado o diagnóstico precoz

*Aparición de nuevos fármacos:* en el tratamiento habitual de la enfermedad avanzada se incluyen fármacos de quimioterapia, como Oxaliplatino e Irinotecan y derivados del 5FU, y también fármacos biológicos o ‘terapias dirigidas’, antiangiogénicos y anti-EGFR<sup>5</sup>. Todos ellos han demostrado beneficio en supervivencia en el tratamiento de CCR avanzado y, más aun, sabemos que cuando empleamos más fármacos para el tratamiento de un paciente el beneficio es mayor que si empleamos menos fármacos<sup>142</sup>.

*Mejora en los tratamientos de soporte:* la toxicidad de la quimioterapia es un hecho y, en ocasiones, puede condicionar no sólo la calidad de vida de los pacientes, sino también el adecuado cumplimiento terapéutico y, por tanto, puede redundar en una ausencia de beneficio de los fármacos. En este sentido, en los últimos años hemos asistido a un desarrollo en terapias de soporte como son los antieméticos, factores de crecimiento de colonias y otros.

*Programas de cribado o diagnóstico precoz:* existen estudios que demuestran el beneficio de los programas de cribado en el CCR en población de moderado-alto riesgo, motivo por el que la OMS lo propone como una recomendación de peso en el Código Europeo Contra el Cáncer<sup>143</sup>. El programa de detección precoz del cáncer colorrectal no solo es un elemento prioritario en prevención secundaria, sino también en la prevención primaria del CCR, ya que es capaz de detectar (y eliminar) lesiones premalignas, los pólipos<sup>80</sup>, y evitar (prevenir) la aparición del cáncer. Es, por tanto, una prioridad en nuestra sociedad hacer llegar el programa a toda la población de riesgo.

Hasta ahora, los marcadores predictivos de respuesta que se usan para el empleo de terapias dirigidas, se han caracterizado de manera retrospectiva; es decir, primero usamos el fármaco y luego buscamos porque funciona o porque no; sirva de ejemplo el uso de fármacos anti-EGFR y la determinación de la proteína RAS<sup>144-147</sup>.

Sin embargo, en la búsqueda de estos marcadores estamos empezando a conocer que los tumores colorrectales no son una única enfermedad y que la clasificación molecular<sup>102</sup> puede ser clave a la hora de tratar a los pacientes en un futuro próximo, sirva como ejemplo en este sentido el uso de la inmunoterapia en un subgrupo definido de tumores<sup>148</sup>.

Otro avance relevante en el estudio y conocimiento del CCR es el de la biopsia líquida<sup>149,150</sup> que, posiblemente, sea una herramienta básica para el tratamiento de nuestros pacientes, permitiendo el conocimiento de determinados marcadores moleculares a lo largo de la evolución de la enfermedad y de la exposición a terapias.

Por otro lado, a pesar de que la mayoría de diagnósticos son de CCR esporádico, existe alrededor de un 25% de casos donde se objetiva agregación familiar; sin embargo, solamente el 5% son debidos a síndromes hereditarios conocidos de predisposición al cáncer.

El asesoramiento genético o consejo genético en cáncer es una actividad sanitaria relativamente reciente que surge por la identificación y caracterización de las bases genéticas de predisposición al cáncer, junto con el conocimiento de sus implicaciones clínicas<sup>151</sup> que permiten avanzar hacia una medicina predictiva y preventiva. Es, por tanto, una actividad preventiva en continua evolución debido a su juventud y a los avances científicos y tecnológicos que se suceden.

El estudio del CCR hereditario, que representa un porcentaje pequeño de todos los tumores colorrectales, ha sido y sigue siendo clave para indagar en el conocimiento del modelo de carcinogénesis colorrectal, de forma que las alteraciones moleculares y genéticas que conducen a la aparición de tumores con una predisposición hereditaria está sirviendo de modelo para su extrapolación a tumores esporádicos con características biológicas similares.

La incidencia del CCR está marcada en gran medida por la edad, siendo habitual en mayores de 50 años, pero no en menores de esa edad. Este criterio, la edad temprana de diagnóstico, es un marcador para detectar síndromes hereditarios de predisposición al CCR; sin embargo, la incidencia de CCR en jóvenes sin historia familiar y sin diagnóstico de síndromes hereditarios va en aumento y es, por tanto, una prioridad detectar y definir este subgrupo de pacientes en el que, probablemente, sus tumores tengan un comportamiento diferente<sup>109-110</sup>.

La investigación actual en el cáncer colorrectal va encaminada a buscar agrupaciones, clasificaciones, marcadores moleculares que, pongan de manifiesto las semejanzas y diferencias entre los distintos tumores que padecen nuestros pacientes con el fin último de poder seleccionar aquellos sensibles a unos tratamientos y resistentes a otros y, así, hacer una medicina personalizada que redunde en una mejora de la supervivencia y de la calidad de vida, evitando toxicidades de fármacos no eficaces<sup>102,152</sup>.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:**

El cáncer colorrectal (CCR) es un tumor con una elevada incidencia y prevalencia en nuestro medio, siendo la edad y la interacción ambiente-gen los principales factores de riesgo.

El conocimiento de las características moleculares y genéticas que conducen a la aparición de tumores con una predisposición hereditaria y su extrapolación a tumores esporádicos con características biológicas similares, ha permitido avanzar en el diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico del CCR.

Este trabajo pretende caracterizar clínica y biológicamente a los pacientes diagnosticados de CCR en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca mediante el empleo de la historia clínica personal, la historia de agregación familiar de cáncer y el empleo de herramientas de biología molecular, con el fin de contribuir en la búsqueda del conocimiento científico en cáncer colorrectal.

Por ello, analizaremos las características clínico-biológicas de los pacientes diagnosticados de CCR y realizaremos un estudio experimental prospectivo en una población seleccionada para determinar características moleculares. Finalmente, estudiaremos el papel de la IHQ de las proteínas implicadas en la ruta de reparación de bases desapareadas del DNA, como cribado poblacional de Síndrome de Lynch.

Como objetivos específicos se plantean los siguientes:

- 1- Analizar las características clínico-patológicas de los pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca en base a la expresión inmunohistoquímica (IHQ) de proteínas del sistema *mismatch repair* (MMR) – MLH1, MSH2 y MSH6.
- 2- Estudiar las mutaciones germinales en los genes MLH1, MSH2 y/o MSH6 en aquellos pacientes portadores de tumores con expresión deficiente de alguna de las proteínas del sistema MMR estudiadas por IHQ.
- 3- Analizar la frecuencia de detección de Síndrome de Lynch mediante el cribado poblacional atendiendo, exclusivamente, a la determinación IHQ de proteínas del sistema MMR y correlacionarlo con los criterios clínicos de Ámsterdam y/o Bethesda.
- 4- Estudiar el gen MYH en aquellos pacientes con criterios clínicos de Síndrome de Lynch y expresión normal de las proteínas del sistema MMR por IHQ.
- 5- Analizar la presencia del polimorfismo c.-93A>G del gen MLH1 en la población diagnosticada de CCR, tanto en individuos con tumores esporádicos como en aquellos con agregación familiar de CCR o con síndromes hereditarios de predisposición al CCR.
- 6- Estudiar la mutación V600E de BRAF en pacientes con diagnóstico de CCR con expresión deficiente de alguna de las proteínas del sistema MMR y estudiar su correlación clínico-patológica.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **MATERIAL Y METODOS:**

### **1- Pacientes y Muestras:**

Se incluyeron en el estudio 348 pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal (CCR) en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA) durante el periodo de Mayo de 2008 a Diciembre de 2011 que cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- 1- Los pacientes debían de tener realizado el estudio de expresión de los genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6) mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) en la pieza tumoral.
- 2- Se disponía de la historia oncológica personal y familiar del caso diagnosticado de CCR, bien por revisión de la historia clínica y/o por entrevista personal con el paciente.

Se establecieron como criterios de exclusión los siguientes:

- 1- Pacientes que no cumplían con los criterios de inclusión
- 2- Pacientes que denegaron su consentimiento para ser incluidos en el estudio

El periodo de estudio se escogió así porque mayo de 2008 es la fecha en la que comenzó a realizarse en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca de forma sistemática la IHQ de MLH1, MSH2 y MSH6 en la pieza tumoral de CCR.

Las principales variables que se recogieron se registran a continuación:

- Variables demográficas:
  - o Sexo
  - o Edad de diagnóstico
- Variables clínicas
  - o Localización tumor primario
  - o Estadio clínico
- Variables histológicas:
  - o Tipo histológico
  - o Grado histológico
  - o Estadio patológico
  - o IHQ de genes reparadores
- Variables familiares
  - o Número de familiares de primer y segundo grado afectados de cáncer
  - o Tipo de tumores entre los familiares
  - o Edad a la que se diagnosticaron los tumores en los familiares

Los criterios clínicos de Síndrome de Lynch utilizados en nuestro estudio fueron los criterios de Ámsterdam, Ámsterdam modificados y criterios de Bethesda.

El estadio clínico y patológico fue recogido entre las variables de estudio; sin embargo, no se tuvo en cuenta en el análisis posterior. Los pacientes incluidos en el estudio tenían que tener resultado de la IHQ de los genes reparadores, técnica que se realiza de forma sistemática en todos los pacientes con diagnóstico de CCR, pero, a priori, de los que se dispone de pieza tumoral, es decir, aquellos sometidos a intervención quirúrgica, por lo que un grupo de pacientes metastásicos de inicio, no se van a recoger. Por tanto, nuestros resultados estarían sesgados en cuanto al estadio tumoral y, por eso, no se recogen en el análisis posterior de los datos.

Las características histológicas del tumor fueron analizadas sobre la pieza tumoral, tras la intervención quirúrgica o biopsia endoscópica, remitida al Servicio de Anatomía Patológica fijada en formol al 10%. Se realizó el tallado de la muestra, procesamiento del bloque de forma automática, fijación en parafina y corte con microtomo en láminas de 3-4 micras. Se tiñó la muestra con hematoxilina-eosina y se procedió a la selección de la muestra. Una vez seleccionada, se procedió a realizar las tinciones precisas para su estudio de forma automática y, finalmente, el patólogo las visualizó.

Los pacientes fueron estudiados según el siguiente algoritmo (Figura 22):

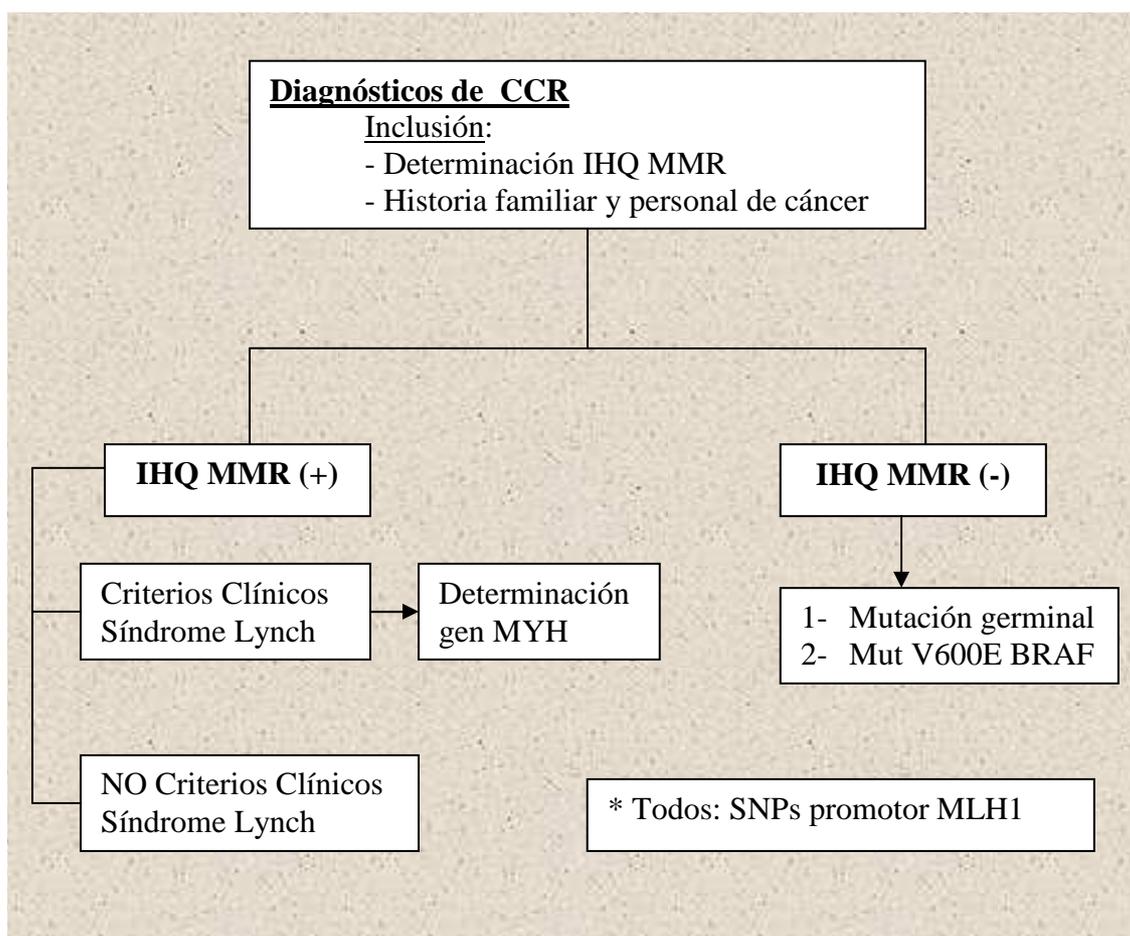


Figura 22. Algoritmo de estudio.

A los pacientes que presentaban ausencia de expresión de los genes reparadores se les realizó el estudio diagnóstico de Síndrome de Lynch mediante el análisis del gen correspondiente en línea germinal; asimismo, se les estudió en línea somática la mutación V600E de BRAF.

Por otra parte, aquellos pacientes con expresión conservada de los genes reparadores en la IHQ, fueron clasificados en base a la presencia de criterios clínicos de SL, de manera que si los cumplían, se les realizó el análisis genético en línea germinal del gen MYH.

A todos los pacientes incluidos en el estudio y que dieron su consentimiento, se les realizó el estudio del polimorfismo -93G>A situado en la región promotora del gen MLH1.

Para el análisis molecular, en el caso de estar indicados (según el algoritmo de estudio), se entrevistó a los pacientes y, previa firma de consentimiento informado (Anexos 1 y 2), se extrajo muestra de sangre periférica.

El consentimiento informado de aquellos pacientes con criterios clínicos de síndromes hereditarios e indicación de test genético fue el modelo estándar de la Unidad de Consejo Genético (Anexo 1) y, en aquellos casos sin criterios de valoración en la Unidad de Consejo Genético, se utilizó el modelo recogido en el Anexo 2, para utilización de muestras de sangre periférica para investigación.

Como grupo control, para los estudios de asociación se utilizó DNA de sangre periférica obtenida de pacientes no oncológicos mayores de 60 años, previa firma de consentimiento informado.

## **2- Estudio de IHQ de MLH1, MSH2 y MSH6**

El estudio de IHQ se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Una vez seleccionada la muestra adecuada, el proceso de tinción se realizó de forma automática en el aparato Vision BioSystem, el cual tiñe las muestras y las procesa de manera que quedan preparadas para ser vistas al microscopio por el patólogo.

Se utilizó una muestra control de mucosa colónica normal para asegurar que la técnica está bien realizada.

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron los siguientes:

- MLH1 → dilución 1:15, BD Pharmingen
- MSH2 → prediluido, Biocare Medical
- MSH6 → prediluido, Biocare Medical

Se considera positivo el test de inmunohistoquímica cuando se tiñe la muestra, esto significa que la proteína codificada por el gen correspondiente está presente en el tumor. Mientras que el resultado negativo aparece cuando no se tiñe la muestra, es decir, cuando no existe expresión de dicha proteína en el tumor.

### **3- Análisis de mutaciones germinales de genes del sistema MMR y del gen MYH**

#### **a) Extracción de DNA de sangre periférica:**

El DNA genómico de alto peso molecular se extrajo manualmente a partir de muestras de sangre periférica de los pacientes recogidas en tubos con EDTA.

Tras centrifugar las muestras de sangre se aisló la interfase de células leucocitarias, las cuales se suspendieron en tampón Fornace (0.25M sacarosa; 50mM Tris-HCl pH 7.5; 25mM KCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>); EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.5 pH 8; proteinasa K 20 mg/L y SDS (dodecil sulfato sódico) al 10%. El EDTA es un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleadas, la proteinasa K degrada las proteínas y, el SDS es un detergente capaz de romper las membranas celulares. Esta mezcla se incubó a 55° durante unas 16 horas, tras lo cual se purificó/centrifugó el DNA tratándolo con una mezcla de fenol tamponado y CIAA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1). El DNA contenido en la fase acuosa se limpió de residuos proteicos y detritus celulares mezclándolo con CIAA y centrifugando. Con la adición de etanol absoluto a la fase acuosa, se precipitó el DNA. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70% y, finalmente, se resuspendió en ddH<sub>2</sub>O. La muestra de DNA se almacenó en tubos Eppendorf® a -20° C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como la posible contaminación.

La concentración y el grado de contaminación proteica del DNA así obtenido se calcula tras medir la absorbancia a 260 y 280 nm siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de DNA/ml} = \text{D.O.260} \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

El valor 50 es un factor de corrección introducido, ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es el valor de absorbancia que tienen 50  $\mu\text{g/mol}$  de DNA.

El cociente D.O.260/D.O.280 se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica. Se consideran valores aceptables los comprendidos entre 1.6 y 2.0; siendo el óptimo 1.8. Los valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos. Los valores superiores indican un exceso de RNA en la muestra (Sambrock et al., 1989).

#### **b) Análisis de mutaciones puntuales en los genes MLH1, MSH2, MSH6 y MYH:**

##### **i- Amplificación por PCR de los genes MLH1, MSH2, MSH6 y MYH**

Los exones y las secuencias intrónicas flanqueantes de los genes MLH1, MSH2, MSH6 y MYH de las muestras de DNA fueron amplificadas por medio de la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25  $\mu\text{l}$ , cuyos componentes son idénticos para todos los exones:

- 10µl de MasterMix 5'Prime Eppendorf® (contiene Taq Polymerase, KCl, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg<sup>2+</sup> y el detergente Igepal®-CA360)
- 10µl de agua libre de nucleasas
- 1µl de cada oligonucleótido cebador
- 1µl de adicional de Mg<sup>2+</sup>
- Como DNA molde se añadieron 100ng la muestra del paciente obtenido a través del protocolo anteriormente descrito.

Como control negativo se utilizó un tubo de reacción con todos los componentes excepto el DNA molde.

Para la amplificación por PCR de los exones que conforman los genes MLH1, MSH2, MSH6 y MYH respectivamente, se utilizaron varios programas derivados del estándar y adaptados a las exigencias de cada exón.

Programa diseñado para amplificar todos los exones de los genes MLH1, MSH2 y MSH6, excepto el exón 1 del gen MSH6 (figura 23):

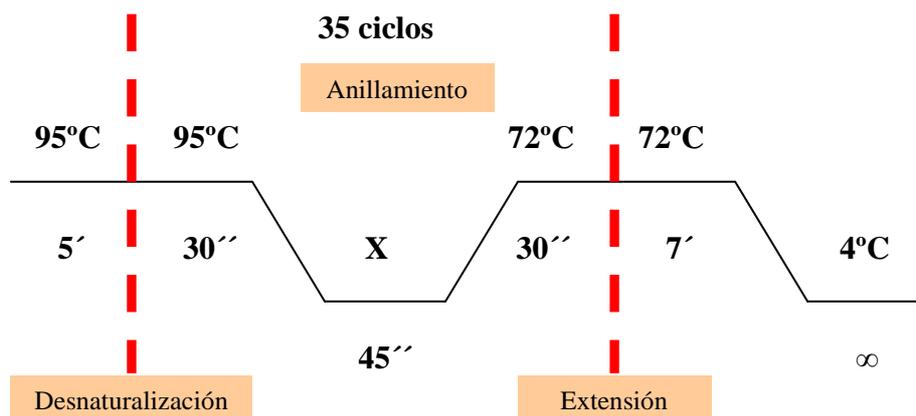


Figura 23. Programa de amplificación utilizado para la amplificación de la mayoría de los exones de MLH1, MSH2 y MSH6. X: temperatura de anillamiento para cada par de cebadores que aparecen especificadas en las tablas.



Programa diseñado para la amplificación del exón 3 del gen MYH (figura 26):

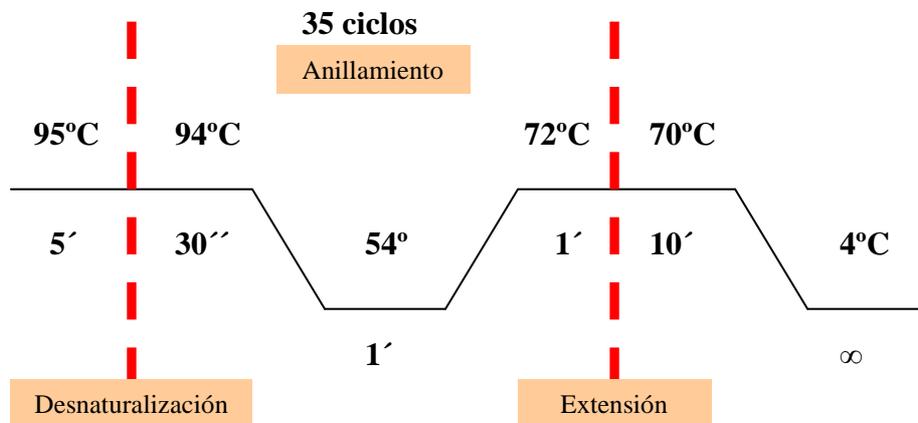


Figura 26. Programa de amplificación utilizado para la amplificación del exón 3 del gen MYH.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron descritos previamente por Hedge y colaboradores (2005), excepto los de los exones 12 y 13 de MSH2, que fueron diseñados en nuestro laboratorio a partir de la secuencia genómica. En las tablas 13, 14, 15 y 16 se recogen los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada gen.

Tabla 13. Oligonucleótidos tomados de Hedge y cols. para la amplificación de los exones del gen MLH1.

MLH1 Exón	Cebador sentido	Cebador antisentido	Tamaño (pb)	Temperatura anillamiento (°C)
1	AGG TGA TTG GCT GAA GGC AC	GCC CGT TAA GTC GTA GCC CT	231	62
2	ATG TAC ATT AGA GTA GTT GCAGAC TGA TAA ATT	AGT TTC CAG AAC AGA GAA AGG TCC	221	57
3	CAA GAA AAT GGG AAT TCA AAG AGA T	CTA ACA AAT GAC AGA CAA TGT CAT CAC	241	55
4	CCT TTG GTG AGG TGA CAG TGG	CAG GAT TAC TCT GAG ACC TAG GCA A	221	56
5	TTT TCC CCT TGG GAT TAG TAT CTA TC	CCC TGA AAA CTT AGA AGC AAT TTT ATT T	227	53
6	GGA CAT CTT GGG TTT TAT TTT CAA G	TGT TCA ATG TAT GAG CAC TAG AAC ACA	235	56
7 y 8	GGG CTC TGA CAT CTA GTG TGT GTT	AAA ATA ATG TGA TGG AAT GAT AAA CCA	417	56
9	TCT GAT TCT TTT GTA ATG TTT GAG TTT TG	CAT AAA ATT CCC TGT GGG TGT TTC	241	55
10	CTG AGG TGA TTT CAT GAC TTT GTG T	GAG GAG AGC CTG ATA GAA CAT CTG T	251	59
11	GTG GGC TTT TTC TCC CCC T	CTC TCA CGT CTG GCC GG	281	58
12	TTT TTT AAT ACA GAC TTT GCT ACC AGG AC	GTT TTA TTA CAG AAT AAA GGA GGT AGG CTG	346	55
13	CCA AAA TGC AAC CCA CAA AAT T	AAC CTT GGC AGT TGA GGC C	282	58
14	GGT GTC TCT AGT TCT GGT GCC TG	TGC CTG TGC TCC CTG GA	271	58
15	CCC ATT TTG TCC CAA CTG GTT	GAG AGC TAC TAT TTT CAG AAA CGA TCA G	203	57
16	TGG GAA TTC AGG CTT CAT TTG	GCA CCC GGC TGG AAA TT	292	58
17	GCA CTG GAG AAA TGG GAT TTG	CCT CCA GCA CAC ATG CAT G	221	59
18	AGT CTG TGA TCT CCG TTT AGA ATG AG	TTG TAT GAG GTC CTG TCC TAG TCC T	242	57
19	CAT CAG CCAG GAC ACC AGT G	CGG AAT ACA GAG AAA GAA GAA CAC A	288	58

Tabla 14. Oligonucleótidos tomados de Hedge y cols. para la amplificación de los exones del gen MSH2.  
\*Los oligonucleótidos 5Rb, 12F, 12R y 13F fueron diseñados a partir de la secuencia genómica.

MSH2 Exón	Cebador sentido	Cebador antisentido	Tamaño (pb)	Temperatura anillamiento (°C)
1	TTC GAC ATG GCG GTG C	GTC CCT CCC CAG CAC G	285	59
2	GAA GTC CAG CTA ATA CAG TGC TTG A	AAA CAC AAT TAA ATT CTT CAC ATT TTT ATT TT	301	53
3	AGA GTT TGG ATT TTT CCT TTT TGC	TCA TGT CAA TTA AAG AGC CTT TCC	241	57
4	TTC ATT TTT GCT TTT CTT ATT CCT TTT	ATA TGA CAG AAA TAT CCT TCT AAA AAG TCA CTA T	316	50
5	ACT GGA TCC AGT GGT ATA GAA ATC TTC	GCT TCT TCA GTA TAT GTC AAT GAA AAC A b* AAA GGT TAA GGG CTC TGA CT	285	53 55
6	GCG TAG TAA GGT TTT CAC TAA TGA GC	CAT GTG GGT AAC TGC AGG TTA CA	251	56
7	TGA GAC TTA CGT GCT TAG TTG ATA AAT TT	GCA CAT TGC CAA GTA TAT ATT GTA TGA G	341	53
8	TGA TGC TTG TTT ATC TCA GTC AAA ATT	AAT CTA CAA ACT TTC TTA AAG TGG CCT T	275	53
9	GTC TTT ACC CAT TAT TTA TAG GAT TTT GTC A	GTA TAG ACA AAA GAA TTA TTC CAA CCT CC	217	56
10	ATT GAA AAA TGG TAG TAG GTA TTT ATG GAA	CAC ATC ATG TTA GAG CAT TTA GGG A	274	54
11	ATA TGT TTC ACG TAG TAC ACA TTG CTT CTA	TCA AAT ATC ATG ATT TTT CTT CTG TTA CC	249	54
12	* GGG TTT TGA ATT CCC AAA TG	* ACA AAA CGT TAC CCC CAC AA	393	46
13	TGG GGG TAA TAT GGG CAG TA	* TCC TTC TCA CAG GAC AGA GAC A	442	48
14	TGT GGC ATA TCC TTC CCA ATG	AAT AAT TTA TAC TAA CTT AGA ATA AGG CAA TTA CTG AT	452	55
15	TAC ATA AAT TGC TGT CTC TTC TCA TGC	AAA AAC CTT CAT CTT AGT GTC CTG TTT	311	57
16	TAA TTA CTA ATG GGA CAT TCA CAT GTG T	TAC CTT CAT TCC ATT ACT GGG ATT T	230	55

La secuencia flanqueante al exón 5 del gen MSH2 contiene una repetición de 27 adenosinas que imposibilita la correcta amplificación y secuenciación. Para poder analizar la secuencia exónica y la secuencia intrónica se diseñaron un par de cebadores que amplificaban el exón entero. Además se diseñó otro oligonucleótido anti-sentido (*reverse*) que evitaba la repetición de adenosinas problemática.

Tabla 15. Oligonucleótidos tomados de Hedge y cols. para la amplificación de los exones del gen MSH6.  
\*El exón 4 del gen está dividido en 7 fragmentos debido a su gran tamaño.

MSH6 Exón	Cebador sentido	Cebador antisentido	Tamaño (pb)	Temperatura anillamiento (°C)
1	TGT TGA TTG GCC ACT GGG	CAA CCC CCT GTG CGA GCC TC	463	55
2	TAA CTG CCT TTA AGG AAA CTT GAC CA	TCA TAT AGA AAA AAG TCT GCC TGT CTG	330	60
3	CTG GTC TTG AAC TGC TGG GAT	CCC CTT TCT TCC CCC ATC	289	58
4.1	TGC ACG GGT ACC ATT ATA AAG TCA	GTA TTC TTG GTT TCT GAT GAA ATG CTA G	450	58
4.2	GAA GGA AAC GCC CTC AGC	CAG TTG CCT TTC ATG AAT ACC AG	420	58
4.3	CCA CAT GGA TGC TCT TAT TGG A	TCA TCT GAA AAC TGA CCT ATG AAA AAC T	420	58
4.4	TTT GTT GAT ACT TCA CTG GGA AAG TT	CTC CTG ATC AAT AAG GCA TTT TTT G	420	57
4.5	CTC TAG GTG GTT GTG TCT TCT ACC TC	TGA GTA GCC TCT CAA GAT CTG GAA	420	57
4.6	CGA AGT TGT AGA GCT TCT AAA GAA GCT	GTC CTA CAG CCA ATT CTG TTG C	480	57
4.7	AGC CTC CTG GAA TAC CTA GAG AAA C	ACT TAT TTT TAG GGA TAA TAT ACA GCT GGC	420	58
5	CAC TTA GGC TGA TAA AAC CCC C	GTA TGT TAT TCC TAA TGT CAC AAA TGA CTT T	386	57
6	AAG ACA AAA GTT TAT GAA ACT GTT ACT ACC A	AGA AGC AAA TAT CTT TTA TCA CAT CTA AAT G	250	56
7	TAA CCT AGA AGA TGA ATT TAT GTA ATA TGA TTT	TTC AGA TAA TCT TCT ATA AAA ATA GTT ATT TGT	224	53
8	TGA GTT ACT TCC TTA TGC ATA TTT TAC T	AAT ATT AGC GAT ACA TGT GCT AGC A	275	57
9	TGC TAG CAC ATG TAT CGC TAA TAT T	GCA TCA TCC CTT CCC CTT TTA	320	56
10	GAA GGG ATG ATG CAC TAT GAA AAA	GTA GAA GGT AGA TAA GAA TTA AAA GGG TTT AAT TT	296	52

Tabla 16. Oligonucleótidos para la amplificación de los exones del gen MYH.

MYH Exón	Cebador sentido	Cebador antisentido	Tamaño (pb)	Temperatura anillamiento (°C)
1	GAA GCT GCG GGA GCT GAA A	ATC CCC GAC TGC CTG AAC C	132	57
2	CTG CTT TGG CTG GGT CTT T	CGC ACC TGG CCC TTC GTA AG	259	57
3	AGG GAT GAT TGC TGA GTF TC	CAA TGC AAC CCC AGA TGA GG	268	54
4	CTC ATC TGG GGT TGC ATT GA	GGG TTG GCA TGA GGA CAC TG	166	57
5	GGG CAG GTC AGC AGT GTC	TAC ACC CAC CCC AAA GTA GA	189	57
6	TAC TTT GGG GTG GGT GTA GA	AAG AGA TCA CCC GTC AGT CC	185	57
7	GGG ACT GAC GGG TGA TCT CT	TTG GAG TGC AAG ACT CAA GAT T	186	57
8	CCA GGA GTC TTG GGT GTC TT	AGA GGG GCC AAA GAG TTA GC	240	57
9	AAC TCT TTG GCC CCT CTG TG	GAA GGG AAC ACT GCT GTG AAG	196	57
10	GTG CTT CAG GGG TGT CTG C	TGT CAT AGG GCA GAG TCA CTC C	262	57
11	TAA GGA GTG ACT CTG CCC TAT G	GCC AAG AGG GCT TTA GG	251	57
12	AGC CCT CTT GGC TTG AGT A	TGC CGA TTC CCT CCA TTC T	297	57
13	AGG GCA GTG GCA TGA GTA AC	GGC TAT TCC GCT GCT CAC TT	242	57
14	TTG GCT TTT GAG GCT ATA TCC	CAT GTA GGA AAC ACA AGG AAG TA	256	57
15	TGA AGT TAA GGG CAG AAC ACC	GTT CAC CCA GAC ATT CGT TAG T	207	57
16	AGG ACA AGG AGA GGA TTC TCT G	GGA ATG GGG GCT TTC AGA	224	57

ii- Electroforesis en gel de agarosa

El tamaño del producto amplificado y su intensidad han sido analizados mediante electroforesis en geles de agarosa preparados al 2% con tampón TBE (Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0mM pH=8.3). Las muestras migraron en paralelo a un marcador de tamaño de DNA derivado del DNA del fago  $\Phi$ X-174 cortado por la endonucleasa *Hae III*. Los fragmentos que esta endonucleasa genera en el DNA del fago  $\Phi$ X-174 se corresponden con los siguientes tamaños: 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.072 Kb. La electroforesis se llevó a cabo con un potencial constante de 120 voltios durante 40 minutos.

Para la monitorización de la electroforesis, el DNA se mezcló con dos colorantes incorporados al tampón de carga: el xileno cianol, que migra dentro del rango de los fragmentos de 5 Kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra con los fragmentos de 0.5 Kb.

Posteriormente a la migración, los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio (0.1 $\mu$ g/ml). El bromuro de etidio tiene la capacidad de intercalarse entre las bases nitrogenadas de la molécula de DNA y emite fluorescencia durante la exposición a la luz ultravioleta (245nm).

iii- Análisis de los fragmentos amplificados por PCR mediante CSGE (Electroforesis en gel sensible a la conformación)

Los fragmentos amplificados fueron sometidos a un análisis por CSGE siguiendo la técnica descrita por Orita, con algunas modificaciones (Orita et al., 1989).

Esta técnica requiere una desnaturalización previa de los fragmentos de DNA amplificados por PCR a 95°C y una lenta re-naturalización posterior, para permitir la formación de heterodúplex (combinación entre una hebra de DNA mutada y otra hebra de DNA no mutada) en el caso de los individuos heterocigotos y homodúplex en individuos portadores de una mutación en heterocigosis (figura 27). Heterodúplex y homodúplex presentan un patrón de migración diferente en una electroforesis en un gel de acrilamida.

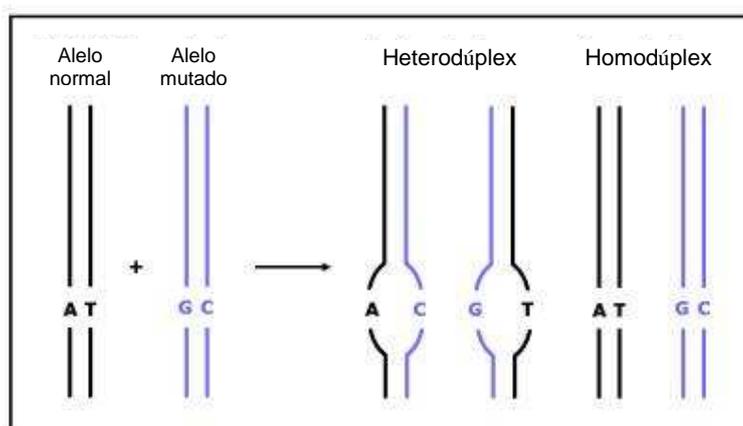


Figura 27. Formación de heterodúplex tras la desnaturalización y posterior re-naturalización del producto de PCR en un individuo heterocigoto.

Los geles para electroforesis fueron hechos con MDE<sup>TM</sup> 2X (AT Biochem, Inc. USA), un polímero de acrilamida modificado derivado del vinilo. Se utilizaron las siguientes cantidades para preparar cada gel:

- Agua destilada: 7.705mL
- Formamida 99%: 5.98mL
- Etilenglicol 99%: 4.025mL
- TBE 10X: 2.415mL
- MDE TM 2X: 20.125mL
- TEMED (N, N, N, N' Tetrametilendiamina): 36.8  $\mu$ L
- APS 25% (Persulfato de amonio): 138  $\mu$ L

La electroforesis se llevó a cabo a 180 voltios durante, aproximadamente, 21 horas (el tiempo varía en función del tamaño del fragmento de PCR).

El gel fue teñido con nitrato de plata. Para ello se utilizó un kit comercial DNA Silver Staining Kit de Amershan Pharmacia®, con un volumen de 250 mL, siguiendo las instrucciones del comerciante. Posteriormente, los fragmentos de DNA con patrones diferentes de migración fueron secuenciados.

Esta técnica fue utilizada inicialmente, ya que se trataba de la técnica empleada habitualmente para el diagnóstico de síndrome de Lynch. Posteriormente, la técnica utilizada fue la secuenciación mediante la técnica de Sanger (descrita a continuación).

iv. Purificación de fragmentos amplificados de DNA:

La muestra amplificada de DNA se purificó con el fin de eliminar cualquier resto de cebadores, dNTPs o iones que puedan inhibir la reacción de secuenciación. Para la purificación se utilizó el kit comercial PureLink® PCR Purification Kit de invitrogen™ by life technologies™, siguiendo las instrucciones del comerciante.

Este reactivo se basa en la capacidad del DNA de unirse a membranas de sílice en presencia de sales caotrópicas. En primer lugar, el producto de PCR o el fragmento de agarosa que lo contiene se disuelven en una solución tampón con isotiocianato de guanidina; el DNA queda retenido en la superficie de sílice de la matriz, mientras que el resto de los componentes son eluidos a través de la columna al centrifugar. Después el DNA se lava con un tampón que contiene etanol y, finalmente, se eluye con una solución tampón de baja concentración salina.

v- Secuenciación automática por la técnica de Sanger:

Todos los productos de PCR fueron secuenciados para analizar la posible existencia de mutaciones. Cuando se empleó la técnica de heteroduplex, los productos de PCR secuenciados fueron aquellos que mostraban un patrón de migración diferente.

La secuenciación de los productos purificados se llevó a cabo en un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems) en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca y en un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) en la Unidad de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca).

Se preparó una muestra con el cebador sentido (*forward*) y otra con el cebador antisentido (*reverse*) a una concentración de 3 pmol en un volumen de 2 µL. El DNA se preparó a una concentración de 40-60 ng para un volumen final de 8 µL.

#### **4- Estudio de polimorfismos de la región promotora de MLH1: discriminación alélica mediante sondas TaqMan (Genotipado)**

En la PCR con sondas TaqMan o sondas de hidrólisis, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se pueden medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR con sondas TaqMan incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

Para la discriminación alélica hemos empleado sondas específicas marcadas con fluorocromos. Estas sondas de hibridación específica son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y, un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En todos nuestros ensayos de discriminación alélicas mediante PCR con sondas TaqMan los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM.

Mientras la sonda está intacta la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del DNA diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 28)

El incremento de DNA en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

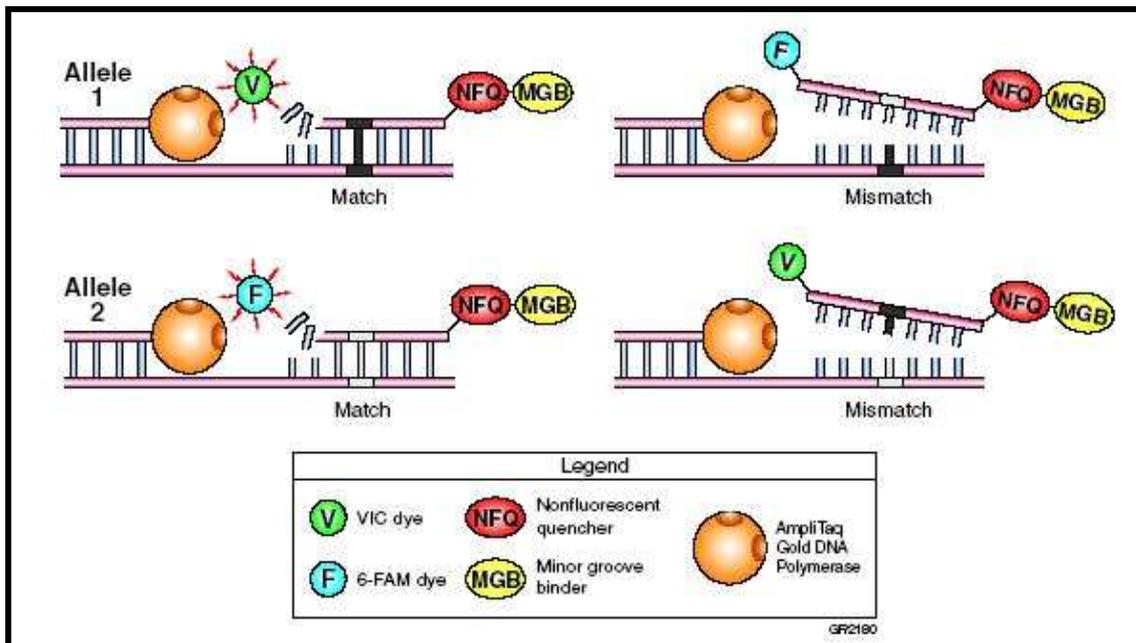


Figura 28. Mecanismo de la PCR con sondas TaqMan

Esta técnica nos permitió analizar rápida y eficazmente la distribución del polimorfismo c.-93G>A localizado en el promotor del gen MLH1. Utilizamos para ello la sonda C\_7535141\_1 de Applied Biosystem. Nuestro estudio se realizó en el termociclador StepOnePlus de Applied Biosystems, que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados.

### **5- Estudio de mutación somática V600E de BRAF: test Cobas®**

Para el estudio de la mutación somática V600E de BRAF se utilizó el test Cobas® 4800, Roche Molecular Systems. Mediante esta técnica se pueden detectar las mutaciones de BRAF V600, a partir de DNA extraído de tejido tumoral fijado en formol e impregnado en parafina. Se trata de una PCR a tiempo real diseñada para tal fin.

De manera que, tras recuperar la muestra diagnóstica de CCR de cada uno de los pacientes seleccionados, se les aplica el test, obteniendo los posibles resultados: detección de mutación V600E o no detección de mutación V600E.

Durante el proceso de validación de la técnica, esta ha mostrado tener más sensibilidad que la secuenciación directa mediante método Sanger.

Los pasos llevados a cabo para aplicar la técnica y obtener resultados se describen en el siguiente diagrama (figura 29).

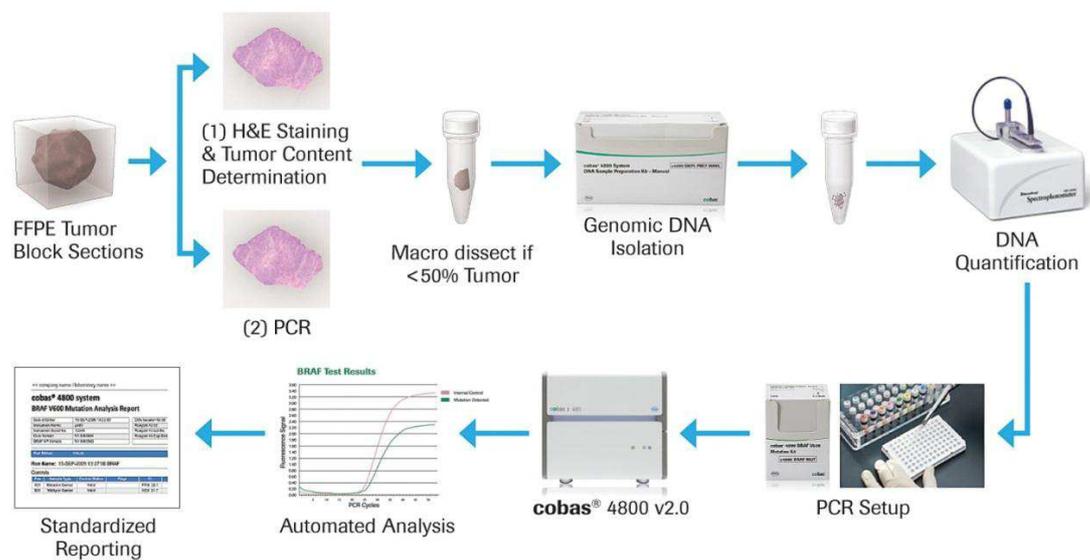


Figura 29. Diagrama del Test de Cobas® (extraída de Halait et al, Diagn Mol Pathol).

## **6- Análisis estadístico de los resultados**

Para el análisis estadístico de los resultados se han empleado la base de datos Excel y el paquete estadístico SPSS v. 23

Para analizar la asociación entre dos variables cualitativas se ha utilizado el test Chi-Cuadrado, para la comparación de medias de edad, el test T-Student para datos independientes y, para medianas de edad en los diferentes grupos se ha utilizado el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney.

Los estudios inferenciales sobre los OR, se llevan a cabo mediante contrastes de hipótesis con el test Z, y/o con el cálculo de intervalos de confianza, utilizando el  $\log(OR)$ , ya que el OR tiene una distribución muy asimétrica y su logaritmo sigue aproximadamente una ley Normal. La expresión del intervalo de confianza sería:

$\log(OR) \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}$  (siendo a, b, c y d, las frecuencias que aparecen en las celdas de las tablas 2x2).

La significación estadística se ha fijado en p-valor 0.05; en este caso se declara asociación entre las variables estudiadas. En cualquier caso, se ha tenido en cuenta si la significación es al 1% (p-valor 0.01), en cuyo caso se especifica en los resultados.

Finalmente, se ha utilizado la técnica estadística multivariante conocida como análisis de segmentación o árbol de decisión. El objetivo de estas técnicas es detectar la existencia de interacción en un modelo de predicción, operando de un modo secuencial y tratando de dividir el conjunto de individuos objeto de estudio en grupos homogéneos (segmentos) mutuamente excluyentes y exhaustivos, en los cuales se pueda describir la relación entre los predictores y la variable respuesta sin que ésta sea enmascarada por el efecto interacción.

Hay varios métodos descritos en la literatura, entre ellos está el algoritmo CHAID pensado para cuando la variable dependiente es cualitativa y que utiliza el test Chi-Cuadrado para contrastar la independencia de las distintas fases del proceso.

El resultado final de este análisis suele representarse en un diagrama de árbol en el que se muestra gráficamente el proceso de las sucesivas segmentaciones. Este diagrama ofrece un resumen parsimonioso de los datos. En cada nudo del árbol se indica el predictor que produce la segmentación, en cada rama se indica la categoría que define el subgrupo y dentro de cada rectángulo se indica la distribución porcentual de la variable dependiente en ese subgrupo.

# **RESULTADOS**



## **RESULTADOS:**

Se llevó a cabo el estudio de las características clínico-biológicas de pacientes con cáncer colorrectal, en todos los pacientes que cumplieran ambos criterios de inclusión descritos en material y métodos:

- 1- IHQ de proteínas codificantes para los genes del sistema MMR
- 2- Historia personal y familiar de eventos oncológicos

En la siguiente figura (figura 30) se describe el diagrama de flujo:

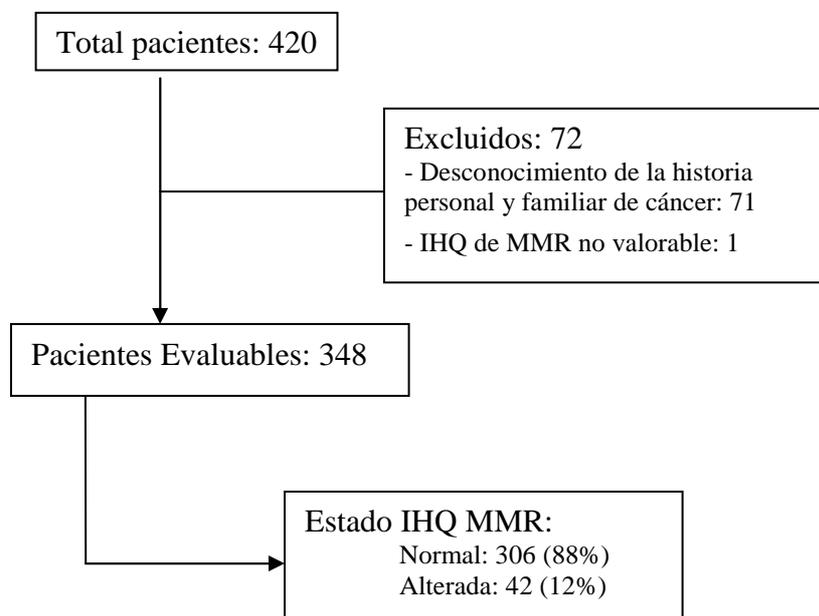


Figura 30. Diagrama de flujo del estudio

## 1- Descripción General de la Muestra

Inicialmente, los pacientes incluidos en el estudio fueron todos los pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal, a los que, de forma consecutiva, se les realizó el estudio de la expresión proteica de los genes MLH1, MSH2 y MSH6 por medio de técnicas de inmunohistoquímica en la pieza tumoral.

El 86% de los pacientes estudiados presentaba IHQ de proteínas reparadoras del DNA (MLH1, MSH2 y MSH6) normal. La distribución por sexos puede verse reflejada en la tabla 17.

Tabla 17. Características clínicas de los pacientes con primer criterio de inclusión

	Varones	Mujeres	Todos
N (%)	249 (59)	171 (41)	420 (100)
Edad diagnóstico			
Media (años)	72	69	71
Mediana (años)	73	72	73
Rango (años)	25-91	18-96	18-96
Estado IHQ MMR			
Normal (%)	225 (62)	136 (38)	361 (86)
Alterada (%)	20 (42)	28 (58)	48 (11)
No Valorable (%)	4 (36)	7 (64)	11 (3)

Por el contrario, el 11% de los pacientes presentaba alguna alteración en la expresión IHQ de estas proteínas. La distribución de la alteración en la expresión, según la proteína afectada puede verse en la figura 31.

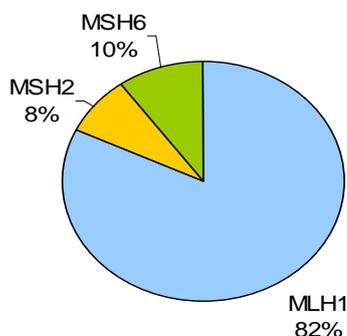


Figura 31. Distribución de la ausencia de expresión IHQ.

En dos pacientes coexistía la pérdida de expresión de MSH2 y MSH6; asimismo, en otro de ellos se observó ausencia de expresión de las proteínas MLH1 y MSH2.

Se encontraron 11 pacientes en los que la técnica de IHQ no fue valorable, 7 de estos pacientes tenían expresión no válida para la proteína MLH1 (4 mujeres y 3 varones). En 4 pacientes no pudo valorarse la expresión de MSH6 (en uno de ellos coexistía con la expresión no valorable de MLH1). Asimismo, encontramos un paciente en los que la técnica de IHQ no fue válida para las tres proteínas, motivo por el cual fue excluido del estudio.

Posteriormente, se excluyeron aquellos pacientes de los que no conocíamos la historia personal y familiar de cáncer (ante la imposibilidad de realizar la entrevista personal y la ausencia de estos datos en la historia clínica hospitalaria del paciente).

Las características clínicas de los pacientes evaluables se definen en la tabla 18. La distribución pone de manifiesto un leve predominio de varones sobre mujeres (58/42%), con una mediana de edad de 71 años (18-90), con tumores localizados en colon derecho y colon izquierdo (37 y 40% respectivamente), con histología de adenocarcinoma tipo entérico (83%), bien o moderadamente diferenciados (83%).

En estos pacientes, la expresión de proteínas reparadoras del DNA se distribuyó de la siguiente forma (figura 32):

- IHQ MMR normal (expresión conservada): 298 pacientes
  - IHQ MMR alterada (expresión ausente): 42 pacientes
    - o Ausencia expresión MLH1: 37 pacientes
    - o Ausencia expresión MSH2: 3 pacientes
    - o Ausencia de expresión MSH6: 4 pacientes
- En 2 pacientes coexistía la ausencia de expresión de MSH2 y MSH6
- IHQ MMR no valorable (fallo de la técnica en alguna proteína): 8 pacientes

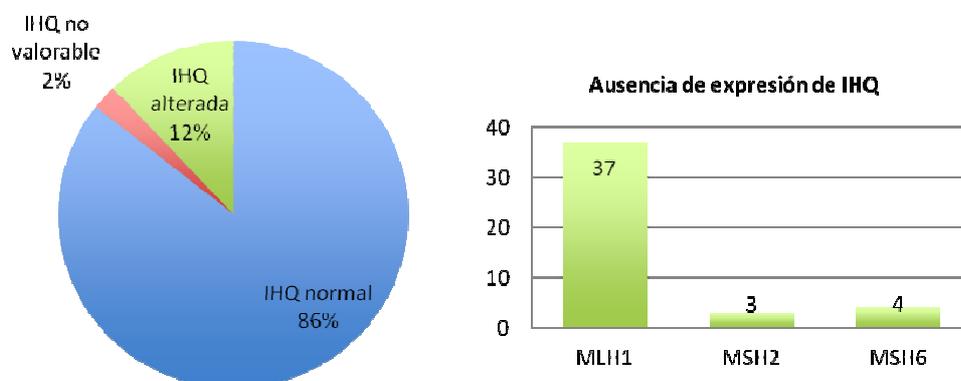


Figura 32. Expresión IHQ de genes del sistema MMR

Tabla 18. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio, por cumplir ambos criterios de inclusión.

	N (%)
<b>Sexo</b>	
Hombre	203 (58)
Mujer	145 (42)
<b>Edad diagnóstico</b>	
Media (años)	69
Mediana (años)	71
Rango (años)	18-90
<b>Localización tumor 1º</b>	
Colon derecho	128 (37)
Colon izquierdo	139 (40)
Colon transversal	17 (5)
Recto	48 (14)
Varias	16 (4)
<b>Tipo histológico</b>	
Entérico	289 (83)
Mucinoso	40 (11)
C. anillo sello	2 (1)
Mixto	11 (3)
Otros	2 (1)
Desconocido	4 (1)
<b>Grado histológico</b>	
Bien diferenciado	121 (35)
Mod. diferenciado	167 (48)
Pobre. Diferenciado	27 (8)
Desconocido	33 (9)

Respecto a los criterios clínicos de Síndrome de Lynch, utilizando los criterios de Ámsterdam, Ámsterdam modificados y Bethesda, el 69% de los pacientes no cumplen ninguno de los criterios (239 pacientes), mientras que el 31% de ellos cumple alguno de ellos, distribuidos de la siguiente forma (figura 33):

- Ámsterdam: 11 pacientes
- Ámsterdam modificados: 17 pacientes
- Bethesda: 109 pacientes. En función del criterio de Bethesda se desglosan en:

- A: 16 pacientes
- B: 28 pacientes
- C: 1 paciente
- D: 7 pacientes
- E: 32 pacientes
- Combinación de varios: 25 pacientes. Las distintas combinaciones y sus frecuencias se describen en la tabla 19; así como su correlación con los criterios de Ámsterdam.

Tabla 19. Distribución de los pacientes que cumplen criterios clínicos de SL. Resumen de los distintos criterios de Bethesda: Criterio A: CCR diagnosticado en un paciente menor de 50 años. Criterio B: Tumores CCR sincrónicos, metacrónicos, u otros tumores asociados a SL, independientemente de la edad. Criterio C: CCR con histología IMS-H, diagnosticado en menores de 60 años. Criterio D: Paciente con CCR y un pariente de primer grado con un tumor asociado a SL, uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años. Criterio E: Pacientes con CCR con 2 o más parientes de primer o segundo grado con un tumor asociado a SL, independientemente de la edad

Criterio de Bethesda	Número de pacientes	Criterios Ámsterdam
A	16	0
B	28	0
C	1	0
D	7	0
E	32	2
A + B	1	0
A + C	1	0
A + D	2	0
A + E	2	0
A + C + D + E	2	2
A + D + E	1	1
A + B + C +D +E	2	2
B + D	2	0
B + E	1	0
B + D + E	1	1
D +E	10	9



**CRITERIOS:**  
 Todos cumplen Bethesda  
 Sólo 17 Ámsterdam

Figura 33. Criterios clínicos de SL

Como un subgrupo especial, se han analizado los pacientes que, únicamente, cumplen el criterio A de Bethesda, diagnóstico de CCR en paciente menor de 50 años; es decir, pacientes jóvenes con diagnóstico de CCR sin antecedentes familiares. En estos pacientes no ha habido ningún diagnóstico de Síndrome de Lynch y las características de los tumores de este subgrupo de pacientes se describen en la tabla 20.

Solamente 16 pacientes han sido diagnosticados antes de los 50 años y no presentan antecedentes familiares. Dos tercios de los pacientes son mujeres, con mediana de edad de 44 años (18-49). Los tumores se localizan principalmente en colon izquierdo y recto, siendo la mayoría adenocarcinomas de tipo entérico bien o moderadamente diferenciados. Solamente un paciente mostró ausencia de expresión IHQ de genes reparadores, siendo la proteína MLH1 la no expresada. En este paciente no hubo confirmación de Síndrome de Lynch tras el estudio genético en línea germinal.

Tabla 20. Características de los pacientes con CCR menores de 50 años.

	N (%)
Sexo	
Hombre	6 (37)
Mujer	10 (63)
Edad diagnóstico	
Media (años)	39
Mediana (años)	44
Rango (años)	18-49
Localización tumor 1º	
Colon derecho	1 (6)
Colon izquierdo	8 (50)
Colon transverso	2 (12)
Recto	5 (32)
Tipo histológico	
Entérico	15 (94)
Mixto	1 (6)
Grado histológico	
Bien diferenciado	6 (38)
Mod. diferenciado	7 (44)
Pobre. Diferenciado	2 (12)
Desconocido	1 (6)
IHQ MMR	
Presente	15 (94)
Ausente	1 (6)
MLH1	1

Las figuras 34 y 35 muestran las principales características de los pacientes en el grupo global de estudio y en el grupo de pacientes con CCR menores de 50 años sin antecedentes familiares (AF), respectivamente.

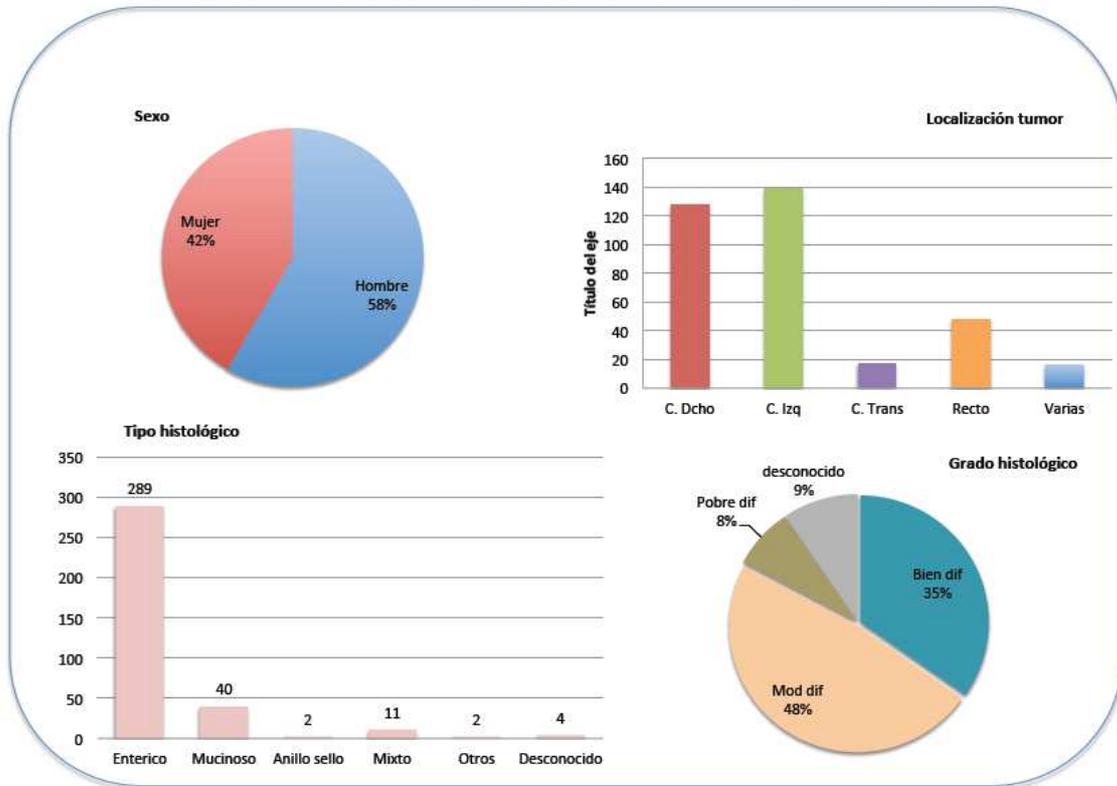


Figura 34. Características de los pacientes, población global de estudio.

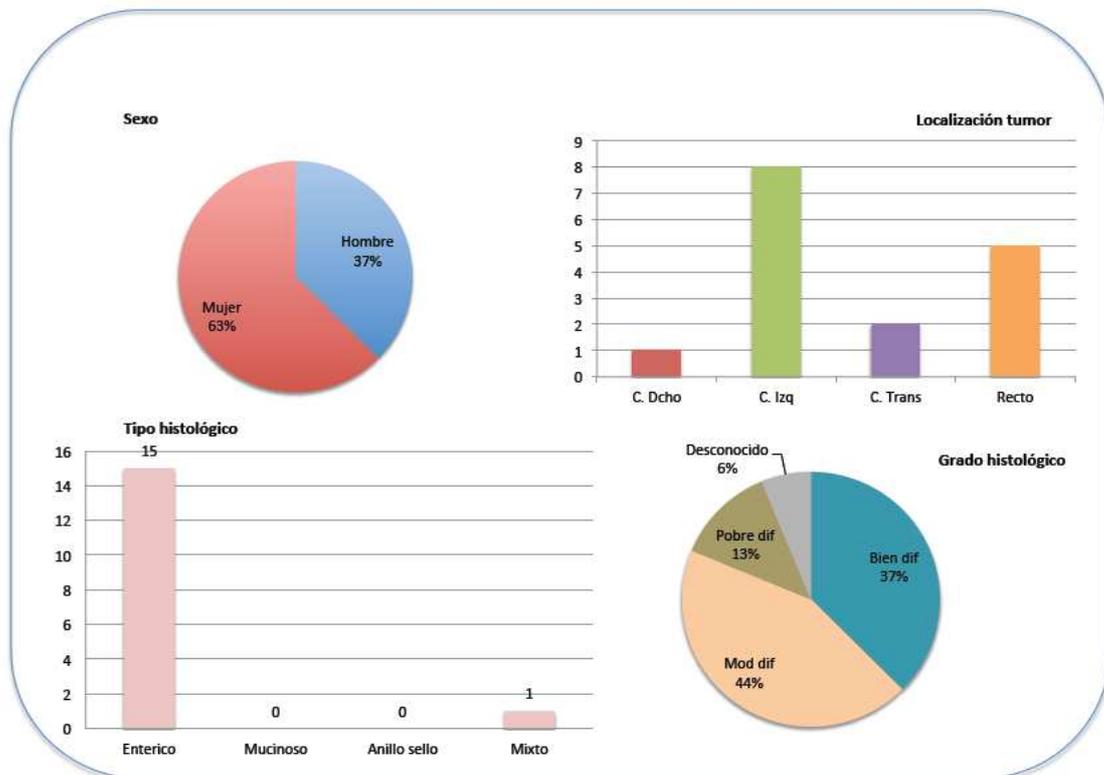


Figura 35. Características de los menores de 50 años sin AF.

## **2- Análisis de las características clínico-biológicas en base a la expresión IHQ de MMR**

De los pacientes elegibles para el estudio, aquellos que cumplían los dos criterios de inclusión, se analizaron en función de la expresión por IHQ de las proteínas del sistema MMR (figura 36).

→ Pacientes con IHQ MMR normal: 306.

→ Pacientes con IHQ MMR alterada: 42.

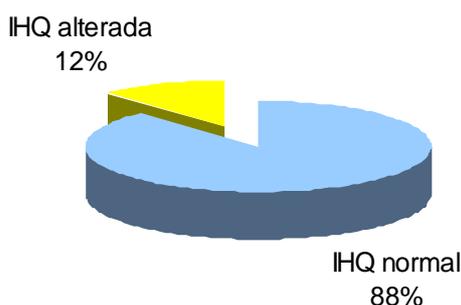


Figura 36. Distribución del resultado IHQ.

Las características clínico-biológicas se describen en la tabla 21, así como el análisis estadístico de asociación entre variables.

Los pacientes que tienen tumores con expresión conservada de genes reparadores en la IHQ son ligeramente predominantes los varones (60%), con una mediana de edad de 71 años (18-88), con tumores localizados en colon izquierdo o derecho (42 y 33%, respectivamente), adenocarcinomas tipo entérico (86%), bien o moderadamente diferenciados (36 y 50%, respectivamente). El 71% no cumplen criterios clínicos de síndrome de Lynch y, del 29% que los cumple, solamente el 11% cumple criterios de Ámsterdam.

Respecto a los pacientes que presentan ausencia de expresión de estos genes en la IHQ, predominan ligeramente las mujeres (55%), con una mediana de edad de 72 años (26-90), con tumores localizados principalmente en colon derecho (62%) y, aunque predominan los adenocarcinomas tipo entérico (60%), la proporción de adenocarcinomas mucinosos es del 31%. Lo mismo ocurre con el grado de diferenciación, predominan los tumores bien o moderadamente diferenciados (24 y 36% respectivamente), pero la proporción de tumores pobremente diferenciados es del 21%. El 45% de estos pacientes cumplen criterios clínicos de síndrome de Lynch y el 37% de estos cumple criterios de Ámsterdam.

El análisis comparativo entre estos dos grupos muestra diferencias estadísticamente significativas en la localización tumoral, el tipo histológico y el grado de diferenciación, así como en la proporción de pacientes que cumplen criterios clínicos de síndrome de Lynch (figura 37).

Tabla 21. Características clínico-biológicas de los pacientes y asociación, en base a la expresión IHQ genes reparadores.

		IHQ normal	IHQ alterada	P -VALOR
N (%)		306 (88)	42 (12)	
Sexo	Hombre	184 (60)	19 (45)	0.066 NS
	Mujer	122 (40)	23 (55)	
Edad diagnostico				
	Media (años)	69	68	0.860 NS
	Mediana (años)	71	72	0.748 NS
	Rango (años)	18-88	26-90	
Localización tumor 1°				
	Colon derecho	102 (33)	26 (62)	0,004 **
	Colon izquierdo	129 (42)	10 (24)	
	Colon transverso	17 (6)	0	
	Recto	45 (15)	3 (7)	
	Varias	13 (4)	3 (7)	
Tipo histológico				
	Entérico	264 (86)	25 (60)	0,000**
	Mucinoso	27 (9)	13 (31)	
	C. anillo sello	1 (0.3)	1 (2)	
	Mixto	8 (3)	3 (7)	
	Otros	2 (0.7)	0	
	Desconocido	4 (1)	0	
Grado histológico				
	Bien diferenciado	111 (36)	10 (24)	0,000**
	Mod. Diferenciado	152 (50)	15 (36)	
	Pobre. Diferenciado	18 (6)	9 (21)	
	Desconocido	25 (8)	8 (19)	
Criterios clínicos Sd. Lynch				
	No	216 (71)	23 (55)	0,05 *
	Si	90 (29)	19 (45)	
	Ámsterdam	6 (7)	5 (26)	0,030*
	Ámsterdam mod.	10 (11)	7 (37)	0,014*
	Bethesda	90 (100)	19 (100)	

\* p&lt;0.05; \*\*p&lt;0.01; NS: no significativo

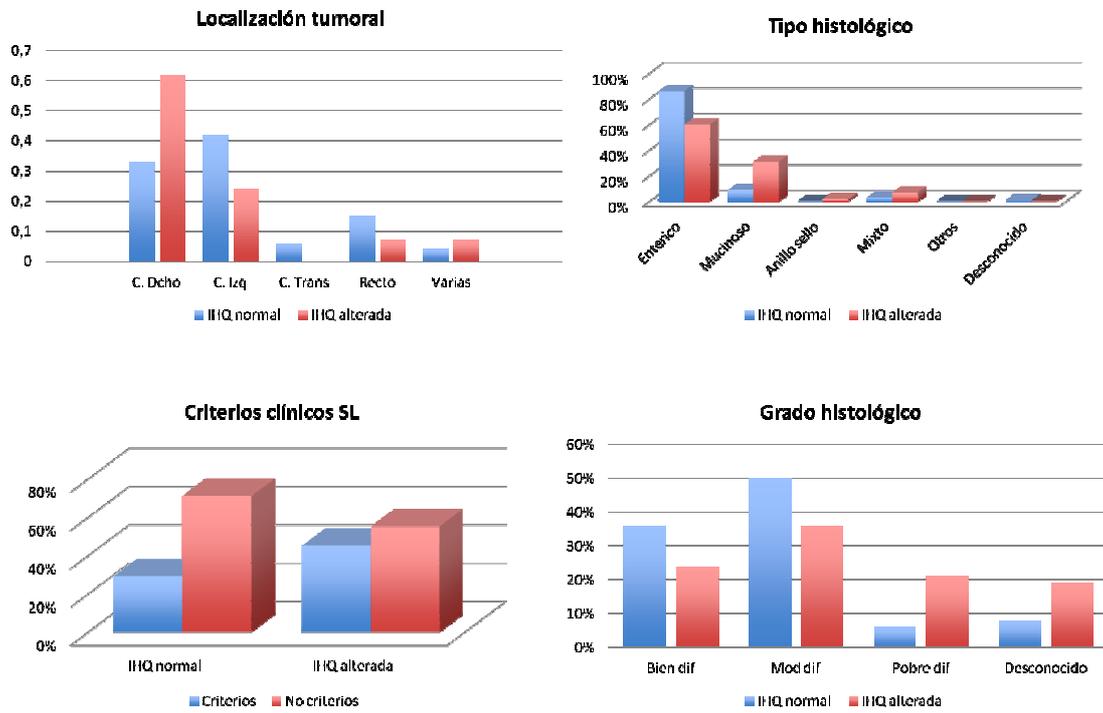


Figura 37. Diferencias entre expresión normal o ausencia de expresión en alguna proteína codificante de los genes reparadores del DNA.

De los 42 pacientes con ausencia de expresión por IHQ de proteínas del sistema MMR, 37 pacientes tienen alteración en MLH1 y 5 pacientes tienen alteración de MSH2 y/o MSH6. Las características de estos pacientes se recogen en las tablas 22 y 23. No es posible el análisis comparativo entre ellos dado el pequeño tamaño muestral.

Tabla 22. Características de los pacientes con pérdida IHQ de MLH1.

	N (%)
<b>Sexo</b>	
Hombre	15 (41)
Mujer	22 (59)
<b>Edad diagnóstico</b>	
Media (años)	68
Mediana (años)	72
Rango (años)	26-83
<b>Localización tumor 1º</b>	
Colon derecho	25 (68)
Colon izquierdo	9 (24)
Recto	2 (5)
Varias	1 (3)
<b>Tipo histológico</b>	
Entérico	25 (68)
Mucinoso	9 (24)
C. anillo sello	1 (3)
Mixto	2 (5)
<b>Grado histológico</b>	
Bien diferenciado	10 (27)
Mod. diferenciado	11 (30)
Pobre. Diferenciado	9 (24)
Desconocido	7 (19)
<b>Criterios clínicos Sd. Lynch</b>	
No	22 (59)
Si	15 (41)
Ámsterdam	4 (27)
Ámsterdam mod.	5 (33)
Bethesda	15 (100)

Tabla 23. Características de los pacientes con pérdida IQH de MSH2 y/o MSH6.

	<b>Paciente 1</b>	<b>Paciente 2</b>
<b>Sólo MSH2 negativo (n=1)</b> Sexo Edad diagnóstico Localización tumor 1° Tipo histológico Grado histológico Criterios clínicos SL	Hombre 51 años Recto Mucinoso Desconocido Si (Bethesda-B)	
<b>MSH2 neg y MSH6 neg (n=2)</b> Sexo Edad diagnóstico Localización tumor 1° Tipo histológico Grado histológico Criterios clínicos SL	Hombre 66 Varios (D+T) Mucinoso 2 Si (A-mod y Bethesda)	Mujer 58 Varios (R+T) Mixto (enterio+anillo) 2 Si (A+Amod+Beth)
<b>Sólo MSH6 negativo (n=2)</b> Sexo Edad diagnóstico Localización tumor 1° Tipo histológico Grado histológico Criterios clínicos SL	Hombre 90 Derecho Mucinoso 2 No	Hombre 73 Izquierdo Mucinoso 2 Si (Bethesda- E)

Se ha llevado a cabo un análisis multivariante de los datos. Sólo se ha considerado para este análisis aquellas variables del estudio que han presentado, previamente, asociación significativa: histología, localización del tumor y grado histológico. Además se ha puesto un filtro de tamaño de muestra para que los grupos terminales (segmentos finales) obtenidos no tuviesen un tamaño de muestra inferior a 20 individuos.

Del total de pacientes del estudio (348) un 87.5% no presentaron alteración en la expresión IHQ, frente a un 12.5% que si la tenían alterada. Esta será nuestra variable dependiente que pretendemos explicar con las diferentes variables del estudio (variables independientes: histología, localización tumoral, grado de diferenciación).

En la figura 38 se representa el árbol de segmentación resultante.

En el primer paso, el predictor con mayor poder discriminante resultó ser la histología, diferenciándose dos grupos, aquellos que presentaron una histología mucinosa, de células en anillo de sello o mixta (histología-1), frente al grupo de pacientes con histología de tipo entérico, otros o desconocido (histología-2). En esta primera segmentación, de los 53 pacientes que presentaron histología-1, un 67.5% no tenían alteración de la IHQ, mientras que un 32.1% tenían ausencia de expresión. En el otro grupo de individuos (histología-2), de los 295 sujetos de este grupo, el 91.5% no tenían alteración de la IHQ y sólo un 8.5% si.

El siguiente predictor con capacidad explicativa y que aporta información clasificatoria de interés resultó ser el siguiente:

A) Para aquellos pacientes del grupo histología-1, el mejor predictor resultó ser la localización del tumor, dividiendo a los pacientes en dos grupos, 31 individuos con tumores localizados en colon derecho o en varias localizaciones (Loc-1), y 22 pacientes con tumores localizados en colon izquierdo, recto o transversal (Loc-2). La clasificación mostró en el grupo Loc-1 un 41.9% con alteración (ausencia) en la expresión IHQ de genes reparadores. Por el contrario, en el grupo Loc-2, casi todos los pacientes tenían expresión conservada de la IHQ (sólo un 18.2% tenían alterada la expresión). Estos grupos son grupos terminales, ya que no existe ninguna otra variable con capacidad discriminativa; dado que en este caso el algoritmo ha utilizado un filtro de tamaño de muestra, que impide segmentar más estos grupos.

B) En el grupo de pacientes con histología-2, la variable con mayor poder discriminatorio resultó ser el grado de diferenciación (a diferencia del grupo anterior que era la localización de tumor). En este caso aparecen dos grupos, aquellos pacientes con tumores bien o moderadamente diferenciados (grado-1) frente a aquellos pacientes con tumores pobremente diferenciados (grado-2). De los 295 pacientes pertenecientes al grupo histología-2, se repartieron de la siguiente manera: De los 22 pacientes con grado-2, un 36.4% presentaban alteración en la expresión IHQ, mientras que sólo ocurría eso en un 6.2% de los 273 pacientes pertenecientes al grupo grado-1. El porcentaje de individuos con alteración en la IHQ es 6 veces superior en el grupo grado-2, frente al grupo grado-1. El grupo grado-2, es un grupo terminal, por el pequeño tamaño muestral, no ocurre esto en los pacientes del grupo grado-1.

Los 273 pacientes del grupo grado-1 (es decir, individuos con tumores cuya histología es tipo entérico, desconocido u otros, bien o moderadamente diferenciados), se dividen de nuevo en dos grupos de comportamiento diferente, ahora sí, atendiendo a la localización tumoral.

El primer segmento esta formado por 87 pacientes que presentaban una localización del tumor en colon derecho y, los 186 pacientes restantes muestran tumores en otras localizaciones. La diferencia fundamental entre estos dos nuevos grupos es que en los pacientes con localización en colon derecho, el 11.5% presentan alteración IHQ, frente al 3.5% de pacientes con tumores en otras localizaciones.

Estos dos grupos ya son terminales, puesto que el resto de variables predictoras no presentaban significación estadística previa.

En síntesis, para detectar un pacientes con presencia o ausencia de expresión por IHQ de genes reparadores, se debería de atender en primer lugar a la histología del tumor, diferenciando entre histología mucinosa, con células en anillo de sello o mixta, ya que en estos casos la probabilidad de encontrar alteración es 4 veces superior a cualquier otra histología. Si, efectivamente, la histología es de este grupo (histología-1), tendremos en cuenta la localización tumoral ya que es 2 veces más probable encontrar alteración IHQ si la localización es en colon derecho o muestra varias localizaciones que si el tumor aparece en otras localizaciones.

Sin embargo, si la histología es de tipo entérico, desconocida u otra, la primera variable a la que tenemos que atender es el grado, ya que es 6 veces superior la probabilidad de encontrar alteración IHQ de genes reparadores en pacientes con tumores con histología-2, cuando presentan tumores pobremente diferenciados. En este último caso, habría que prestar atención después a la localización tumoral, resultando, al igual que antes, ser tres veces más probable encontrar alteraciones en la IHQ cuando los tumores se localizan en colon derecho frente a otras localización, a pesar de que en esta rama del árbol hay pocos pacientes con alteraciones en la IHQ.

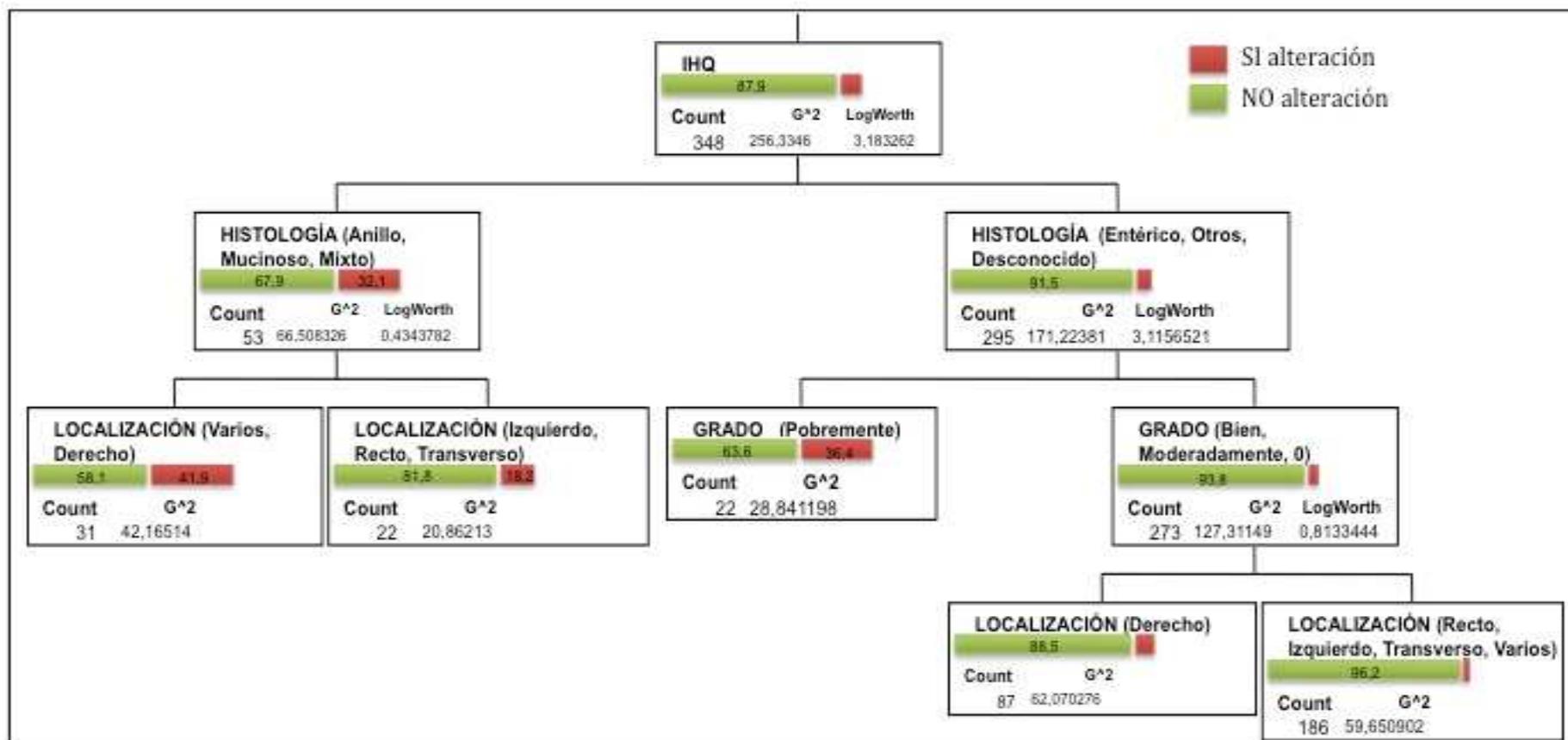


Figura 38. Árbol de segmentación, análisis multivariante.



### **3- Análisis de las características clínico-biológicas en base a los criterios clínicos de Síndrome de Lynch**

El global de pacientes elegibles para el estudio (n: 348), fueron también analizados en base a la presencia o ausencia de criterios clínicos de Síndrome de Lynch. Los pacientes con presencia de criterios son aquellos que cumplen al menos un criterio (Ámsterdam o Bethesda) (Figura 39). Todos los pacientes con presencia de criterios cumplen algún criterio de Bethesda (dado que estos criterios son menos estrictos y los pacientes que cumplen criterios de Ámsterdam cumplen también criterios de Bethesda).

→ Pacientes con criterios clínicos de SL: 109.

→ Pacientes sin criterios clínicos de SL: 239.

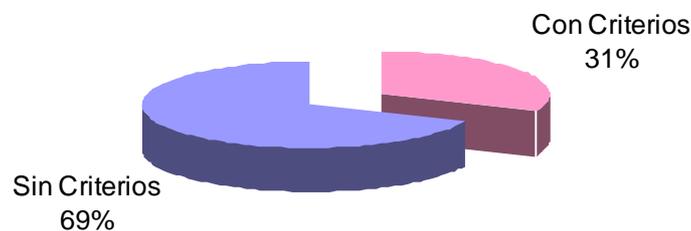


Figura 39. Distribución de pacientes según criterios clínicos de SL.

La distribución por sexos entre los pacientes con presencia de criterios clínicos de Síndrome de Lynch muestra una distribución similar entre hombres y mujeres. La mediana de edad se sitúa en los 68 años (18-85). Un 12% de pacientes presenta tumores en varias localizaciones. El 17% presentan ausencia de expresión por IHQ de genes del sistema MMR.

En relación con los pacientes que no tienen criterios clínicos de Síndrome de Lynch, predominan los varones (62%), con una mediana de edad de 73 años (50-90), solamente un 1% presentó tumores en varias localizaciones. La ausencia de expresión de genes reparadores por IHQ se observó en el 10% de los pacientes.

El resto de características están descritas en la tabla 24.

Teniendo en cuenta el análisis de asociación de variables entre ambos grupos, se demuestran diferencias estadísticamente significativas en relación con la edad, la localización tumoral y la expresión IHQ de genes reparadores.

Tabla 24. Características clínico-biológicas de los pacientes en función de los criterios clínicos de Síndrome de Lynch.

	Presencia de criterios	Ausencia de criterios	p-valor
N (%)	109 (31)	239 (69)	
Sexo			0.075 NS
Hombre	56 (51)	147 (62)	
Mujer	53 (49)	92 (38)	
Edad diagnóstico			
Media (años)	63	72	0.000 **
Mediana (años)	68	73	0.000 **
Rango (años)	18-85	50-90	
Localización tumor 1°			0.000 **
Colon derecho	36 (33)	92 (38)	
Colon izquierdo	39 (36)	100 (42)	
Colon transverso	6 (5)	11 (5)	
Recto	15 (14)	33 (14)	
Varias	13 (12)	3 (1)	
Tipo histológico			0.451 NS
Entérico	89 (82)	200 (84)	
Mucinoso	13 (12)	27 (11)	
C. anillo sello	0	2 (1)	
Mixto	6 (5)	5 (2)	
Otros	0	2 (1)	
Desconocido	1 (1)	3 (1)	
Grado histológico			0.957 NS
Bien diferenciado	38 (35)	83 (35)	
Mod. Diferenciado	53 (49)	114 (48)	
Pobre. Diferenciado	9 (8)	18 (7)	
Desconocido	9 (8)	24 (10)	
IHQ MMR			0.038 *
Presente	90 (83)	216 (90)	
Ausente	19 (17)	23 (10)	
MLH1	15 (79)	22 (96)	0.236 NS
MSH2 y/o	4 (21)	1 (4)	0.236 NS
MSH6			

\*p&lt;0.05; \*\*p&lt;0.01; NS: no significativo

Al elegir únicamente a los pacientes que presenta criterios clínicos de síndrome de Lynch, analizamos las diferencias entre los que presentan y no presentan alteraciones en la expresión IHQ de las proteínas MMR. En la tabla 25 se recogen las características de estos subgrupos de pacientes.

Como valores estadísticamente significativos se encuentran diferencias en el tipo histológico, predominando el adenocarcinoma tipo entérico entre los que conservan la expresión en la IHQ y, aunque el más frecuente también es el tipo entérico entre los que tienen expresión ausente de alguna proteína, el adenocarcinoma mucinoso se encuentra en un 32% de los pacientes.

Tabla 25. Características de los pacientes con criterios clínicos de SL, en función de IHQ MMR.

	IHQ normal	IHQ alterada	p-valor
N (%)	90 (83)	19 (17)	
Sexo			
Hombre	50 (56)	6 (32)	0.057 NS
Mujer	40 (44)	13 (68)	
Edad diagnóstico			
Media (años)	63	63	0.899 NS
Mediana (años)	67	71	0.848 NS
Rango (años)	18-85	26-80	
Localización tumor 1º			
Colon derecho	27 (30)	9 (47)	0.354 NS
Colon izquierdo	35 (39)	4 (21)	
Colon transversal	6 (7)	0	
Recto	12 (13)	3 (16)	
Varias	10 (11)	3 (16)	
Tipo histológico			
Entérico	78 (87)	11 (58)	0.016 *
Mucinoso	7 (8)	6 (32)	
C. anillo sello	0	0	
Mixto	4 (4)	2 (10)	
Otros	0	0	
Desconocido	1 (1)	0	
Grado histológico			
Bien diferenciado	31 (34)	7 (37)	0.107 NS
Mod. Diferenciado	47 (52)	6 (32)	
Pobre. Diferenciado	5 (6)	4 (21)	
Desconocido	7 (8)	2 (10)	

\*p<0.05; \*\*p<0.01; NS: no significativo

Por otro lado, si tenemos en cuenta los pacientes que no cumplen criterios clínicos de SL en el momento del estudio y realizamos el mismo ejercicio de análisis, nos encontramos con diferencias estadísticamente significativas entre los que expresan y no expresan las proteínas MMR en los siguientes parámetros: la localización del CCR (mayoritariamente derecho entre los que muestran ausencia de alguna proteína), la histología (mayor proporción de tumores mucinosos que, aunque no es la principal, si es importante entre los que no expresan alguna proteína MMR) y el grado de diferenciación histológica (mayor proporción de tumores bien diferenciados (grado 1) en los pacientes con presencia de expresión en la IHQ). Todas las características analizadas se muestran en la tabla 26.

La siguiente figura 40 muestra las características estadísticamente significativas en función de si cumplen o no criterios clínicos de síndrome de Lynch.

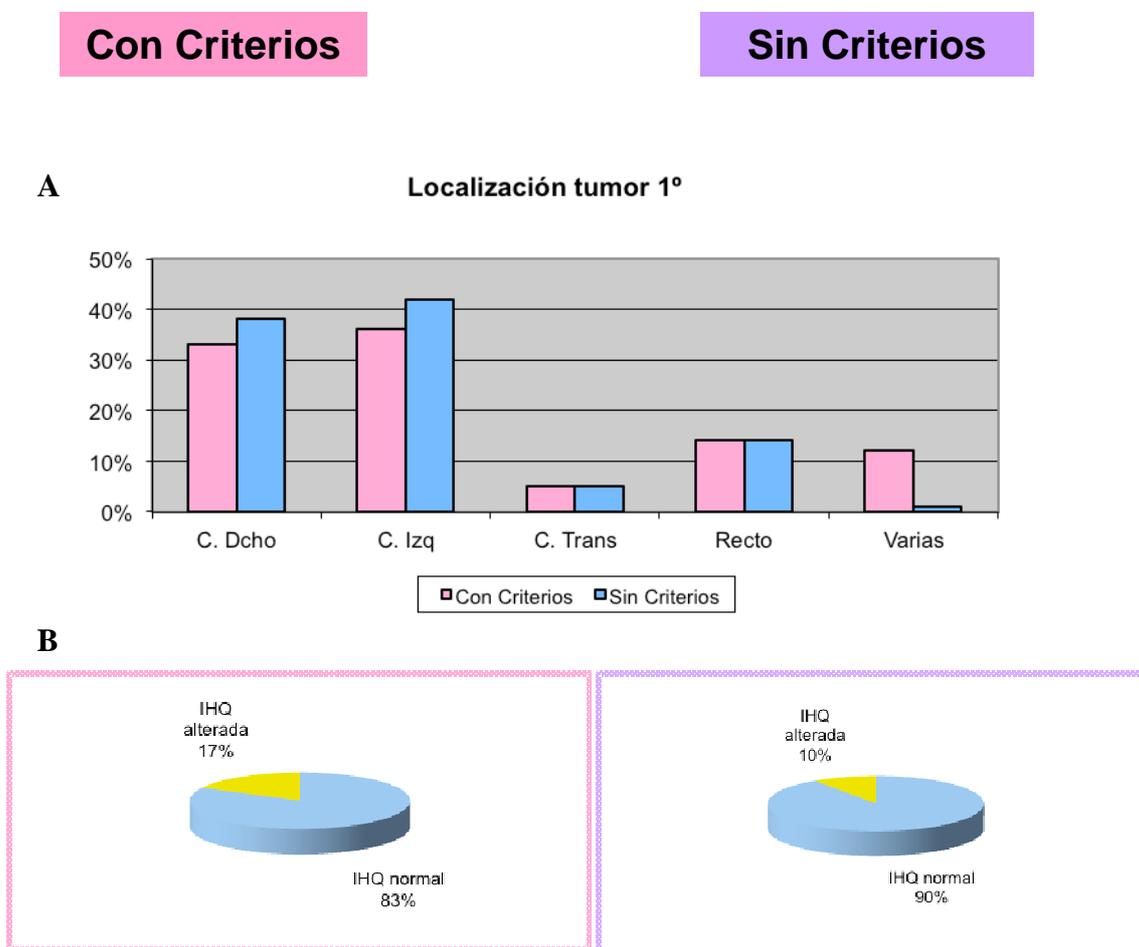


Figura 40. Diferencias clínicas entre cumplir y no criterios clínicos de SL.  
A) Localización del tumor primario. B) Expresión IHQ de genes reparadores.

Tabla 26. Características de los pacientes que no presentan criterios clínicos de SL, en función de la IHQ MMR.

	IHQ normal	IHQ alterada	p-valor
N (%)	216 (90)	23 (10)	
Sexo			0.605 NS
Hombre	134 (62)	13 (57)	
Mujer	82 (38)	10 (43)	
Edad diagnóstico			
Media (años)	72	74	0.267 NS
Mediana (años)	73	78	0.288 NS
Rango (años)	50-88	61-90	
Localización tumor 1°			0.005 **
Colon derecho	75 (35)	17 (74)	
Colon izquierdo	94 (44)	6 (26)	
Colon transverso	11 (5)	0	
Recto	33 (15)	0	
Varias	3 (1)	0	
Tipo histológico			0.012 *
Entérico	186 (86)	14 (61)	
Mucinoso	20 (9)	7 (31)	
C. anillo sello	1 (0.5)	1 (4)	
Mixto	4 (2)	1 (4)	
Otros	2 (1)	0	
Desconocido	3 (1.5)	0	
Grado histológico			0.001 **
Bien diferenciado	80 (37)	3 (13)	
Mod. Diferenciado	105 (49)	9 (39)	
Pobre. Diferenciado	13 (6)	5 (22)	
Desconocido	18 (8)	6 (26)	
IHQ MMR			
Ausente		23 (100)	
MLH1		22 (96)	
MSH6		1 (4)	

\*p&lt;0.05; p&lt;0.01; NS: no significativo

Analizando a los pacientes que presentan expresión de proteínas reparadoras, comparamos aquellos que cumplían criterios con aquellos que no cumplían criterios clínicos de Síndrome de Lynch (Tabla 27).

Cuando la expresión de proteínas MMR está conservada y se cumplen criterios de SL, se observa una proporción de mujeres y hombres similar, la mediana de edad se sitúa en los 66 años (18-85), el 30% de los tumores primarios se sitúan en colon derecho, el 39% en colon izquierdo y, cabe destacar, un 11% de pacientes que presentan tumores en varias localizaciones. El tipo histológico que predomina es el entérico, con un grado bien o moderadamente diferenciado en el 86% de los casos.

En el caso de la expresión conservada en pacientes que no cumplen criterios de SL, la proporción de hombres es ligeramente superior a las mujeres (62%), con una mediana de edad de 73 años (50-88); la localización más frecuente del tumor primario es el colon izquierdo (44%), seguido del colon derecho (35%); el porcentaje de pacientes con tumores en varias localizaciones fue del 1%. El tipo histológico también predominante el entérico bien o moderadamente diferenciado.

Las diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos se observan en la edad (66 versus 73 años de mediana) y en la localización del tumor primario (más frecuente la aparición de tumores en varias localizaciones en aquellos pacientes con criterios clínicos de SL (11 Vs 1%).

Tabla 27. Características de los pacientes con expresión IHQ de MMR conservada, en función de los criterios clínicos de SL.

		Con Criterios	Sin Criterios	p-valor
N (%)		90 (29)	216 (71)	
Sexo	Hombre	50 (56)	134 (62)	0.291 NS
	Mujer	40 (44)	82 (38)	
Edad diagnóstico				
	Media (años)	63	72	0.000 **
	Mediana (años)	67	73	0.000 **
	Rango (años)	18-85	50-88	
Localización tumor 1°				
	Colon derecho	27 (30)	75 (35)	0.001 **
	Colon izquierdo	35 (39)	94 (44)	
	Colon transverso	6 (7)	11 (5)	
	Recto	12 (13)	33 (15)	
	Varias	10 (11)	3 (1)	
Tipo histológico				
	Entérico	78 (87)	186 (86)	0.687 NS
	Mucinoso	7 (8)	20 (9)	
	C. anillo sello	0	1 (0.5)	
	Mixto	4 (4)	4 (2)	
	Otros	0	2 (1)	
	Desconocido	1 (1)	3 (1.5)	
Grado histológico				
	Bien diferenciado	31 (34)	80 (37)	0.954 NS
	Mod. Diferenciado	47 (52)	105 (49)	
	Pobre. Diferenciado	5 (6)	13 (6)	
	Desconocido	7 (8)	18 (8)	

\*p<0.05; \*\*p<0.01; NS: no significativo

Siguiendo el mismo esquema anterior, analizamos aquellos pacientes que presentaban ausencia en la expresión de proteínas MMR en base a la presencia o ausencia de criterios clínicos de Síndrome de Lynch (tabla 28)

Los pacientes que cumplen criterios (y tienen IHQ alterada) son mayoritariamente mujeres (68%), con una mediana de edad de 71 años (26-80), con tumores localizados en colon derecho (47%). Predominan los adenocarcinomas tipo entérico (58%), pero también son frecuentes los tumores mucinosos (32%).

Aquellos pacientes que no cumplen criterios clínicos de SL pero tienen IHQ alterada, muestran una proporción similar entre hombres y mujeres (57 y 43% respectivamente), con una mediana de edad de 78 años (61-90), con tumores localizados en colon derecho (74%), principalmente adenocarcinomas tipo entérico (61%), pero con un 30% de tumores mucinosos.

Las diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos se encuentran en la edad (66 Vs 78 años de mediana) y en la localización de los tumores. Estas mismas diferencias se encontraban en aquellos pacientes con expresión conservada de proteínas MMR, en base a la presencia o ausencia de criterios clínicos de SL.

Tabla 28. Características de los pacientes con ausencia de expresión de IHQ de MMR, en función de los criterios clínicos de SL.

		Con Criterios	Sin Criterios	p-valor
N (%)		19 (45)	23 (55)	
Sexo				0,106 NS
	Hombre	6 (32)	13 (57)	
	Mujer	13 (68)	10 (43)	
Edad diagnóstico				
	Media (años)	61 63	74	0.011**
	Mediana (años)	66 71	78	0,009**
	Rango (años)	26-80	61-90	
Localización tumor 1º				
	Colon derecho	9 (47)	17 (74)	0,036*
	Colon izquierdo	4 (21)	6 (26)	
	Colon transversal	0	0	
	Recto	3 (16)	0	
	Varias	3 (16)	0	
Tipo histológico				
	Entérico	11 (58)	14 (61)	0,705 NS
	Mucinoso	6 (32)	7 (30)	
	C. anillo sello	0	1 (4.5)	
	Mixto	2 (10)	1 (4.5)	
	Otros	0	0	
	Desconocido	0	0	
Grado histológico				
	Bien diferenciado	7 (37)	3 (13)	0,265 NS
	Mod. Diferenciado	6 (32)	9 (39)	
	Pobre. Diferenciado	4 (21)	5 (22)	
	Desconocido	2 (10)	6 (26)	
IHQ MMR - Ausente		19	23	
	MLH1	15 (79)	22 (96)	0,226 NS
	MSH2	1 (5)	0	-----
	MSH6	1 (5)	1 (4)	0,466 NS
	MSH2 y MSH6	2 (11)		

\*p&lt;0.05; p&lt;0.01; NS: no significativo

#### **4- Estudio molecular en pacientes con alteración en la expresión IHQ de genes MMR**

En todos los pacientes con ausencia de expresión en IHQ de alguno de los genes reparadores del DNA, MLH1, MSH2 y MSH6, se llevó a cabo el estudio genético diagnóstico de Síndrome de Lynch, es decir, se estudiaron en línea germinal los genes anormalmente expresados en la IHQ.

En este subgrupo de pacientes también se llevo a cabo el estudio molecular en línea somática, es decir, en la pieza tumoral, de la mutación V600E de BRAF.

##### **i. Determinación de mutación germinal en genes del sistema MMR**

Los 42 pacientes que presentaban alteración en la expresión IHQ fueron seleccionados para llevar a cabo el estudio genético diagnóstico de Síndrome de Lynch.

De ellos, solamente 36 pacientes pudieron ser estudiados. Los 6 pacientes restantes no pudieron ser estudiados por fallecimiento en el postoperatorio inmediato o por rechazo de los mismos a realizar el estudio genético.

→ Ausencia de expresión de MLH1: 37 pacientes.

El estudio genético en línea germinal de MLH1 se llevó a cabo en 31 pacientes. De ellos, solamente 2 fueron diagnosticados de Síndrome de Lynch.

Se trata de 2 pacientes con pérdida de expresión en la IHQ de MLH1 y con criterios clínicos de Síndrome de Lynch.

El primero de ellos es un varón diagnosticado de tumores metacrónicos de colon y recto a la edad de 45 y 51 años, respectivamente. Sólo disponemos de datos histopatológicos del segundo tumor, que fue un adenocarcinoma tipo entérico de recto, grado 1 de diferenciación, con estadio tumoral I (pT2N0M0). Cumplía criterios clínicos de Ámsterdam y de Bethesda (los 5 criterios).

En este paciente se identificó la mutación c. 676C>T/p.Arg226STOP (exón 7-8), esta mutación es una mutación sin sentido que genera un codón de parada prematuro, dando lugar a una proteína más corta y carente de dominios importantes para su función.

En este mismo paciente se identificó un polimorfismo que afecta al mismo exón (c.655A>G/p.Ile219Val) y que está asociado con mayor riesgo de desarrollar CCR no hereditario<sup>153</sup>.

El segundo paciente diagnosticado de Síndrome de Lynch, es una mujer diagnosticada de adenocarcinoma de endometrio a los 51 años y, posteriormente, de tumores metacrónicos de colon y recto. Fue diagnosticada de ADC de colon derecho a los 52 años, de ADC de colon izquierdo a los 63 años, a los 72 años tuvo una recidiva sobre la anastomosis en colon derecho y a los 74 años un adenocarcinoma *in situ* de recto.

La mutación que se encontró en esta paciente se trata de una mutación *missense*, localizada en el exón 16 de MLH1 (c.1780G>T/p.Glu594Ter), que afecta a la función de la proteína.

Por otro lado, en 15 de los 31 pacientes a los que se les estudio el gen MLH1 en línea germinal, se identificó un polimorfismo (c.655A>G/p.Ile219Val) asociado con a un aumento de riesgo de desarrollar CCR (el mismo que se encontró también en el primer paciente diagnosticado de Síndrome de Lynch).

→ Ausencia de expresión de MSH2: 1 paciente.

Se llevó a cabo el estudio de MSH2 en línea germinal en este paciente, encontrándose una mutación patogénica y, por tanto, diagnosticándolo de Síndrome de Lynch.

El paciente es un varón que presentaba tumores metacrónicos en colon y recto a los 51 y 57 años respectivamente. Las características histopatológicas del segundo diagnóstico fue de un adenocarcinoma mucinoso de recto, estadio tumoral II (pT3N0M0). Cumplía criterios clínicos de Síndrome de Lynch, concretamente el criterio B de Bethesda (presencia de tumores colorrectales sincrónicos, metacrónicos u otros tumores asociados a SL, independientemente de la edad).

La mutación identificada se trata de una mutación de splicing, localizada en el exón 5 de MSH2 (c.942+3A>T, IVS5+3 A>T) que afecta al procesamiento de la proteína.

→ Ausencia de expresión de MSH6: 2 pacientes.

El estudio de estos dos pacientes en línea germinal fue normal, no mostrando mutaciones patogénicas y, por tanto, no fueron diagnosticados de SL.

→ Ausencia de expresión de MSH2 y MSH6 de forma sincrónica: 2 pacientes.

En estos dos pacientes pudo llevarse a cabo el estudio genético, mostrando en ambos una mutación patogénica en MSH2 diagnóstica de Síndrome de Lynch.

En el primero de los casos, el estudio se realizó a partir de la información familiar, ya que previamente se había descrito una mutación patogénica que fue, posteriormente, encontrada en el sujeto objeto de estudio.

Se trataba de un varón diagnosticado a los 66 años de un adenocarcinoma mucosecretor de colon izquierdo que a los 74 años fue diagnosticado de 2 tumores sincrónicos en colon derecho y transversal, cuya histopatología fue de adenocarcinoma mucinoso moderadamente diferenciado, con estadios tumorales II y I (pT4 y pT2 N0M0). El paciente cumplía criterios clínicos de *Ámsterdam* y de *Bethesda* (B, D y E).

La mutación encontrada es una mutación sin sentido, que produce la aparición de un codón de parada prematuro con las consecuentes traducción a una proteína más corta carente de dominios importante para su función (c.1165C>T/p.Arg389STOP, exón 7).

El segundo de los pacientes, es una mujer diagnosticada con 48 años de un adenocarcinoma de endometrio y a los 58 años de tumores sincrónicos de recto y colon transverso, cuya histología fue de adenocarcinoma de células en anillo de sello moderadamente diferenciado y adenocarcinoma entérico bien diferenciado, respectivamente. El estadio tumoral fue I y II (pT2 y pT3 N0M0).

La paciente cumplía ambos criterios clínicos de Ámsterdam y de Bethesda (los 5 criterios).

La mutación identificada en MSH2 es una mutación de splicing que afecta al procesamiento de la proteína, localizada en el exón 5 (c.942+3A>T, IVS5+3 A>T).

En la siguiente tabla (tabla 29) se recogen las principales características de las mutaciones encontradas en los 5 pacientes diagnosticados de Síndrome de Lynch.

Tabla 29. Mutaciones encontradas en los 5 pacientes diagnosticados de SL.

Alt IHQ	Criterios SL	Gen mutado	Mutación	Exón	Tipo mutación
MLH1	SI	MLH1	c.676C>T/ p.Arg226X	7-8	Sin sentido
MLH1	SI	MLH1	c.1780G>T/ p.Glu594Ter	16	<i>Missense</i>
MSH2	SI	MSH2	c.942+3A>T/ IVS5+3 A>T	5	<i>Splicing</i>
MSH2 y MSH6	SI	MSH2	c.1165C>T/ p.Arg389X	7	Sin sentido
MSH2 y MSH6	SI	MSH2	c.942+3A>T/ IVS5+3 A>T	5	<i>Splicing</i>

## ii. Determinación de mutación V600E de BRAF

A los tumores que presentaban ausencia de expresión de alguna de las proteínas codificantes de los genes reparadores del DNA (MLH1, MSH2, MSH6) se les determinó la mutación somática V600E de BRAF.

De los 42 casos elegibles, se estudiaron 38 (figura 41):

- BRAF mutado (mutación V600E): 16 pacientes.
- BRAF nativo: 21 pacientes.
- Estudio no válido: 1 paciente.

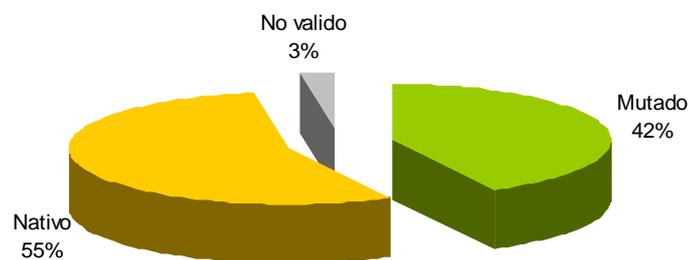


Figura 41. Distribución de mutación BRAF.

El 42% de los casos estudiados correspondían a tumores con mutación de V600E del gen BRAF. Si tenemos en cuenta los casos elegibles (42 pacientes), la proporción de mutados es del 38%.

Se han analizado los pacientes estudiados en función de la presencia de BRAF nativo o con mutación V600E en sus tumores. Las características de estos pacientes se muestran en la tabla 30.

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los tumores nativos y mutados en las siguientes variables: los tumores con BRAF mutado aparecen a edad más avanzada, se localizan casi exclusivamente en colon derecho y son , con mayor frecuencia, pobremente diferenciados (Figura 42).

Tabla 30. Características de los pacientes en base al estado mutacional de BRAF.

	Normal	Mutado	p-valor
N (%)	21 (57)	16 (43)	
Sexo			0,3682 N.S.
Hombre	11 (52)	6 (37)	
Mujer	10 (48)	10 (63)	
Edad diagnóstico			
Media (años)	66	75	0,011*
Mediana (años)	69	78	0,044*
Rango (años)	35-90	61-82	
Localización tumor 1°			0,0269*
Colon derecho	11 (52)	14 (87)	
Colon izquierdo	8 (38)	0	
Colon transverso	0	0	
Recto	1 (5)	0	
Varias	1 (5)	2 (13)	
Tipo histológico			0,2387 N.S.
Entérico	13 (62)	9 (56)	
Mucinoso	5 (24)	6 (38)	
C. anillo sello	0	1 (6)	
Mixto	3 (14)	0	
Otros	0	0	
Desconocido	0	0	
Grado histológico			0,0205*
Bien diferenciado	7 (33)	2 (12)	
Mod. Diferenciado	11 (52)	4 (25)	
Pobre. Diferenciado	1 (5)	6 (38)	
Desconocido	2 (10)	4 (25)	
IHQ MMR - Ausente	21	16	
MLH1	18 (85)	15 (94)	0,435 N.S.
MSH2	0	0	
MSH6	2 (10)	0	
MSH2 y MSH6	1 (5)	1 (6)	0,843 N.S.

\*p<0.05; p<0.01; NS: no significativo

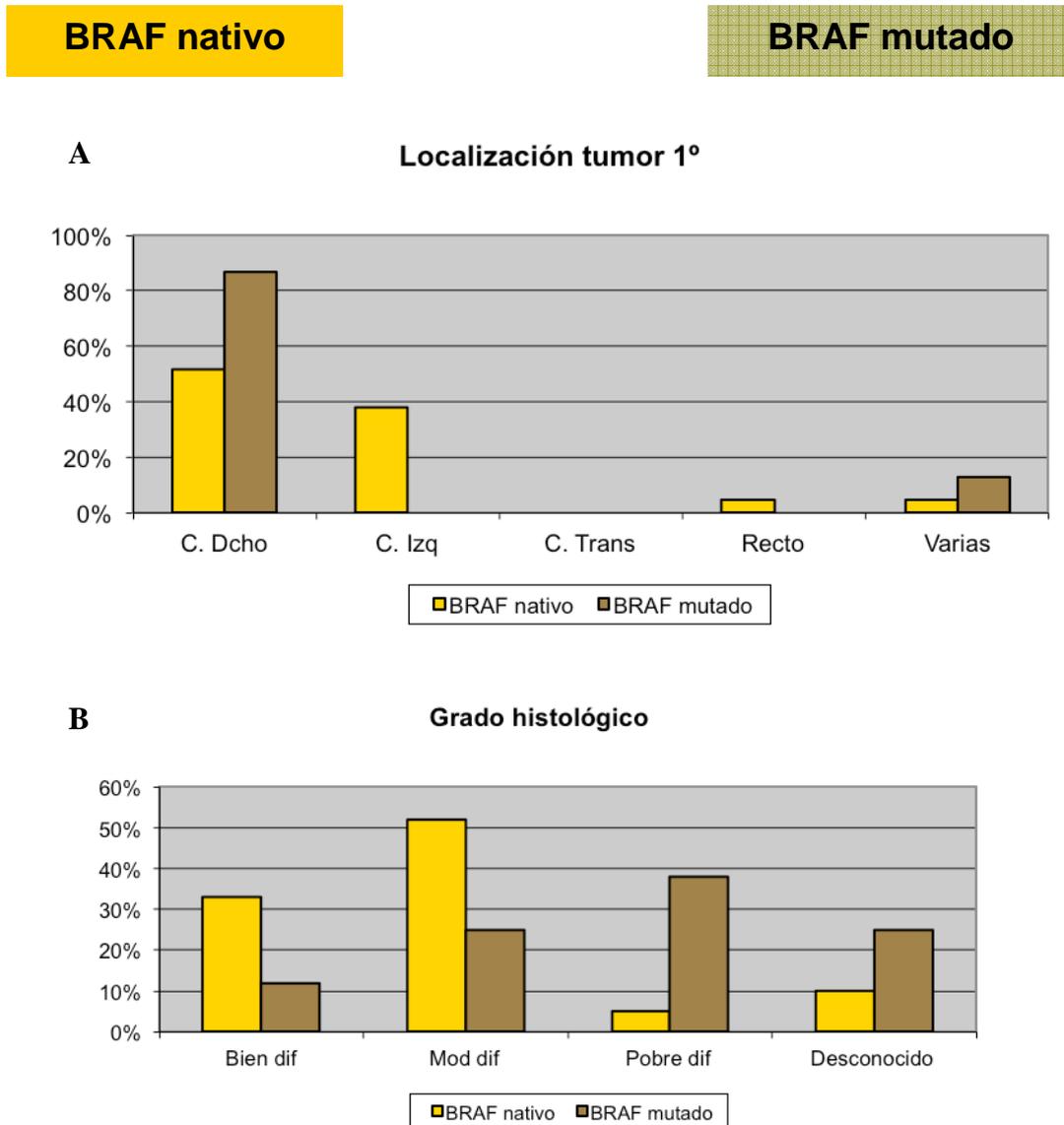


Figura 42. Características según estado mutacional de BRAF.  
 A) Localización tumor primario. B) Grado histológico.

iii. **Estudio de pacientes con expresión IHQ no valorable de alguna de las proteínas reparadoras del DNA**

Ocho pacientes presentaban expresión IHQ no valorable de alguna de las proteínas MMR. (MLH1: 6 pacientes; MSH6: 3 pacientes; en 1 paciente coexistía la expresión no valorable de MLH1 y MSH6).

De estos pacientes, aquellos que además cumplían criterios clínicos de SL, se realizó el estudio genético en línea germinal de aquella proteína incorrectamente expresada.

Fueron 3 pacientes los incluidos en este apartado:

- Un paciente con expresión no valorable de MSH6, que cumplía criterio E de Bethesda. No se encontró ninguna mutación patogénica.
- Un paciente con expresión no valorable de MLH1 que cumplía criterios de Ámsterdam y Bethesda (criterios D y E). No se encontró ninguna mutación patogénica.
- Un paciente con expresión no valorable de MLH1 que cumplía el criterio B de Bethesda. No se encontró ninguna mutación patogénica. En esta paciente, se detectó el polimorfismo en MLH1 c.655A>G/p.Ile219Val (exón 7-8), descrito como asociado a aumento de riesgo de CCR esporádico.

### **5- Estudio molecular en pacientes con criterios clínicos de CCR hereditario y expresión IHQ de MMR normal**

Las características de los pacientes con criterios clínicos de SL y expresión IHQ de las proteínas reparadoras conservada se describen en la tabla 25.

Estos pacientes no tienen indicación de test genético de Síndrome de Lynch, puesto que al tener la expresión IHQ normal, los genes que codifican no pueden estar alterados. Por tanto, son pacientes con historia personal y/o familiar de CCR.

En estos casos, dado que no disponemos de los datos personales y familiares de pólipos y presentan carga familiar de CCR, teniendo en cuenta que las características clínicas de la poliposis atenuada asociada a MYH puede confundirse con el SL, fueron propuestos para estudio de mutaciones germinales de MYH.

#### **Determinación de mutaciones frecuentes del gen MYH**

Las mutaciones que se analizaron en estos pacientes fueron las dos mutaciones descritas como más frecuentes del gen MYH:

- c. 494A>G/p.165Tyr>Cys (exón 7)
- c.1145G>A/p.382G>D (exón 13)

De los 90 pacientes que cumplían los criterios para estudiar este gen, fueron estudiados 63 casos. Del resto de pacientes no disponíamos de consentimiento para llevarlo a cabo, bien por fallecimiento e imposibilidad de solicitarlo o por denegación del mismo.

No se detectó ninguna mutación en ninguno de los casos estudiados, salvo en un paciente, al que se encontró la mutación del exón 13 en heterocigosis; posteriormente se secuenció todo el gen MYH, sin encontrar otras mutaciones.

Este paciente es una mujer diagnosticada a los 49 años de ADC de colon derecho tipo entérico moderadamente diferenciado, con estadio III (pT4N2M0), que cumplía el criterio A de Bethesda (CCR diagnosticado antes de los 50 años).

## 6- Estudio del polimorfismo c.-93G>A de la región promotora de MLH1

Se ha llevado a cabo el estudio del polimorfismo c.-93G>A de MLH1 en 129 pacientes de los que disponíamos muestra de DNA para llevarlo a cabo y de 149 controles. La figura 43 muestra la imagen resultante del genotipado.

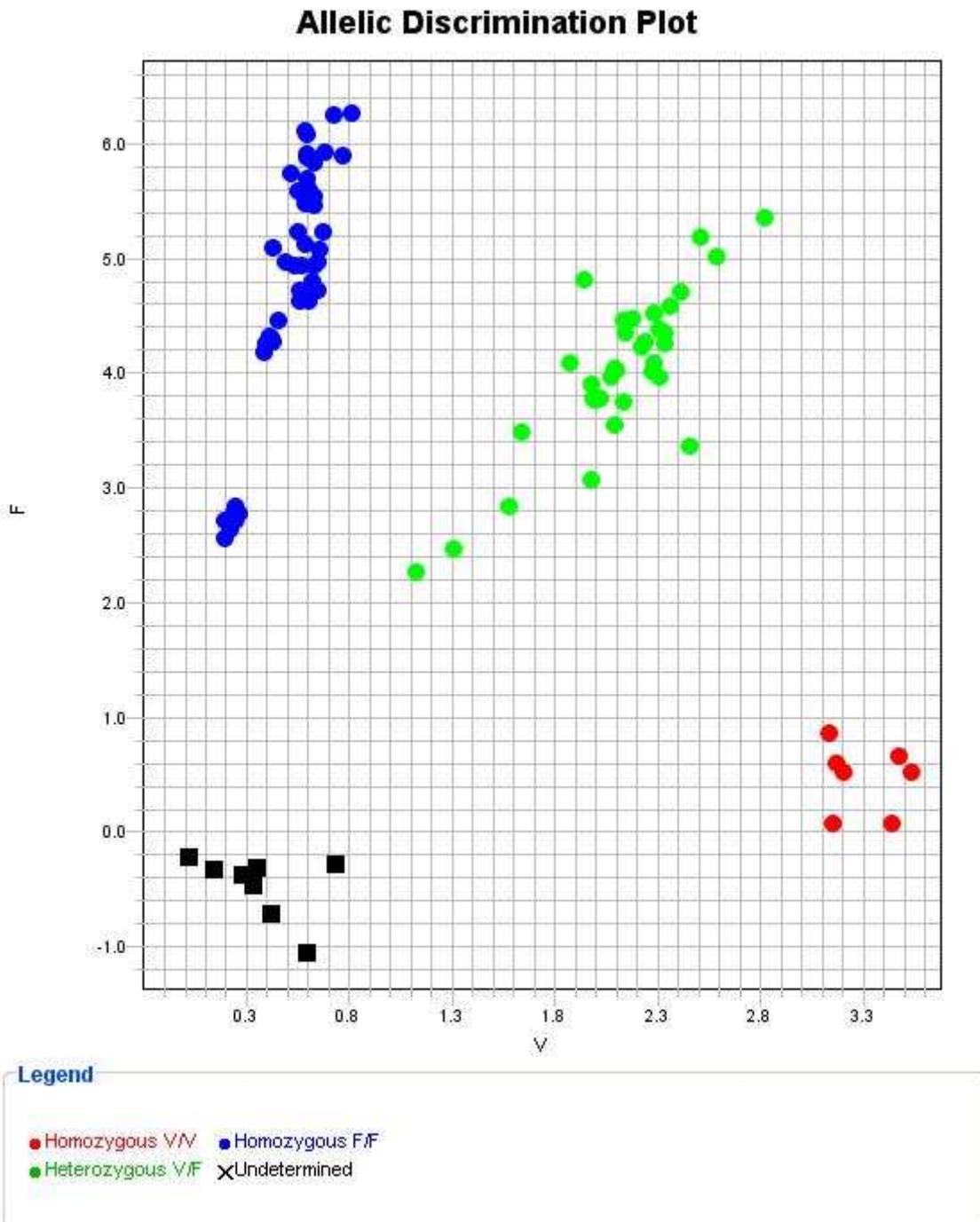


Figura 43. Resultado de la discriminación alélica c.-93G>A MLH1

La tabla 31 muestra la distribución de genotipos entre los diferentes subtipos de pacientes con CCR analizados.

En nuestro estudio hemos observado mayor frecuencia del genotipo normal (GG) entre los controles frente a los pacientes con diagnóstico de CCR (población total), sin embargo las diferencias no son significativas (OR: 0,699; IC 0,452-1,12; p 0.13). Sin embargo, la proporción de pacientes que presentan el genotipo mutado en homocigosis (AA), es mayor en la población con CCR que en población control, con diferencias estadísticamente significativas (OR: 2,68; IC 1,16-6,17; p 0.013).

Por otro lado, la proporción de pacientes con genotipo normal (GG) es menor en el grupo de pacientes con CCR sin criterios de SL, aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (OR: 0,62; IC 0,34-1,13; p 0.12). Igualmente, si tenemos en cuenta el genotipo mutado en homocigosis (AA), se encuentran diferencias altamente significativas entre el grupo de pacientes sin criterios clínicos de SL y la población control (OR: 3,42; IC 1,33-8,74; p 0.0072).

Por tanto, en nuestro estudio, se demuestra un incremento del riesgo para el diagnóstico de CCR cuando está presente el genotipo AA en la posición -93 del gen MLH1; siendo este riesgo mayor entre la población sin agregación familiar de CCR.

Tabla 31. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-93G>A de MLH1

	Distribución de genotipos			Agrupación mut. Recesivo	Agrupación mut. Dominante
	GG (%)	AG (%)	AA (%)	AG, AA (%)	GG, AG (%)
<b>CCR total (n:129)</b>	63 (48.9)	47 (36.4)	19 (14.7)	66 (51.2)	110 (85.3)
<b>Criterios SL (n:68)</b>	35 (51.5)	25 (36.8)	8 (11.7)	33 (48.5)	60 (88%)
<b>No Criterios SL (n:61)</b>	28 (45.9)	22 (36.1)	11 (18)	33 (54.1)	50 (82%)
<b>Controles (n:149)</b>	86 (57.7)	54 (36.2)	9 (6.1)	63 (42.3)	140 (93.9)

Hubo 2 pacientes que presentaban criterios clínicos de SL que tuvieron confirmación diagnóstica molecular de Síndrome de Lynch a los que se les estudio el polimorfismo, ambos mostraron alelo normal (GG).

En la figura 44 se muestra la distribución del genotipado en los distintos subgrupos.

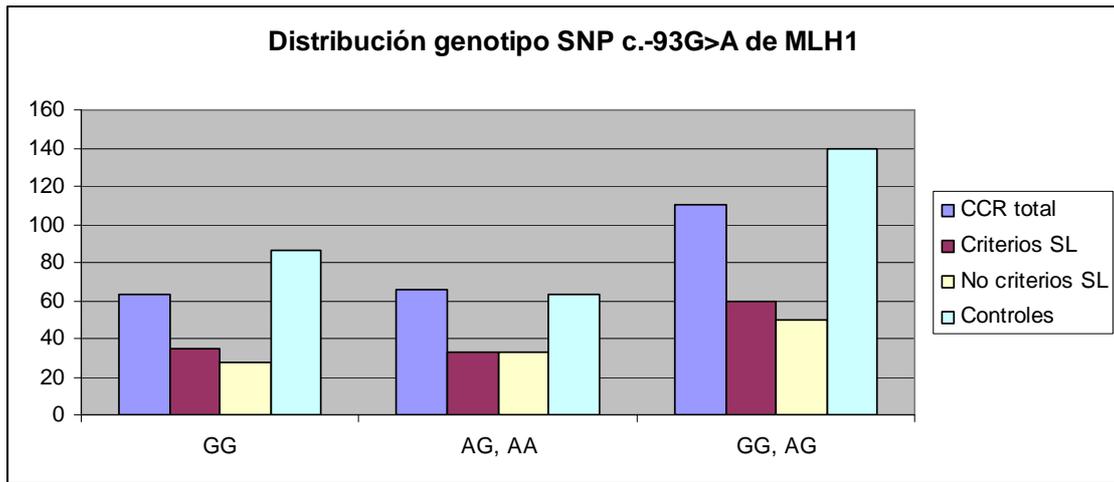


Figura 44. Distribución del genotipo SNP c.-93G>A de MLH1.

Se analizaron las características de los tumores en los pacientes con genotipo normal (GG) frente al genotipo mutado (AG, AA), así como de los pacientes con genotipo mutado en homocigosis (AA) frente al resto de genotipos, y no se encontraron diferencias significativas en ninguna variable.

# **DISCUSIÓN**



## **DISCUSIÓN:**

Profundizar en el conocimiento de las características clínico-biológicas y moleculares del CCR nos permitirá avanzar en el manejo de nuestros pacientes, contribuyendo al conocimiento científico con el fin último de mejorar la supervivencia y calidad de vida de los individuos con CCR o con predisposición hereditaria a desarrollar CCR.

Como se ha descrito en material y métodos, se incluyeron en el estudio los pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca durante el periodo de Mayo de 2008 a Diciembre de 2011. Partimos de una muestra amplia de pacientes, 420 pacientes con diagnóstico de CCR a los que se les ha realizado el estudio IHQ de genes reparadores del DNA en pieza tumoral; sin embargo, la muestra final de pacientes incluidos en el estudio es de 348 de los que, además de la IHQ, tenemos la historia personal y familiar de eventos oncológicos.

A pesar de tener que excluir pacientes por no disponer de todos los datos requeridos para el análisis, el sexo, la edad y la frecuencia de alteración de la IHQ fueron similares en el grupo inicial de 420 pacientes y en el grupo final de estudio de 348 pacientes. El 59% y el 58%, respectivamente, correspondían a varones, la mediana de edad fue igual (71 años) y la frecuencia de IHQ alterada (ausencia de expresión) fue del 11% en el grupo inicial y 12% en el grupo final.

Los criterios clínicos de síndrome de Lynch han sido y siguen siendo el pilar básico para sospechar la presencia del síndrome de predisposición hereditaria al cáncer colorrectal más frecuente<sup>112-115</sup>. Sin embargo, en los últimos años la determinación de inestabilidad de microsatélites y, más aún, la posibilidad de estudiar la expresión de proteínas codificadas por los genes involucrados en la ruta de reparación de desapareamientos del DNA y así dirigir el estudio diagnóstico de SL (la determinación de mutación germinal en alguno de los genes del sistema MMR) han modificado el algoritmo de estudio<sup>154,155</sup>.

En el año 2005 Hampel y cols<sup>121</sup> publicaron el algoritmo diagnóstico de screening de CCHNP que es la base de los algoritmos diagnósticos de estudio de SL que se están empezando a proponer de forma universal en todas las Unidades de Consejo Genético.

De los 348 pacientes incluidos en nuestro estudio, el 12% presentaban ausencia de expresión en IHQ de alguna de las proteínas reparadoras del DNA. En estos 42 pacientes se llevo a cabo el estudio diagnóstico confirmatorio de síndrome de Lynch (test genético en línea germinal) y el estudio de la mutación V600E de BRAF.

Podemos decir que los pacientes con IHQ alterada se corresponden con aquellos pacientes con tumores producidos por el modelo de inestabilidad de microsatélites, cuyas características clínicas son diferentes a los tumores que surgen como consecuencia de otros modelos de carcinogénesis<sup>120</sup>.

Los tumores con inestabilidad de microsatélites son, con mayor frecuencia, tumores mucinosos, con células en anillo de sello, pobremente diferenciados y se localizan, de forma preferente, en colon derecho o colon proximal, entre otras características<sup>98,99</sup>.

Nuestros datos muestran que las características de los pacientes con inestabilidad de microsatélites incluidos en nuestro trabajo son similares a las publicadas en la literatura, aparecen con mayor frecuencia en localización proximal o colon derecho, presentan con mayor frecuencia histología mucinosa o con células en anillo de sello y son más indiferenciados, mostrando diferencias estadísticamente significativas con los tumores sin inestabilidad de microsatélites (tabla 21).

Por otro lado, como cabría suponer, nuestros datos reflejan que los pacientes que tienen tumores con inestabilidad de microsatélites presentan, con mayor frecuencia, criterios clínicos de SL (tanto de Bethesda como de Ámsterdam).

Dado el pequeño tamaño muestral de los tumores con IHQ alterada, no ha sido posible realizar estudios de asociación en función del tipo de alteración que presentan (del gen afectado) y, por tanto, tampoco podemos extraer conclusiones contrastadas entre las diferencias clínico-biológicas de los pacientes con ausencia de expresión de MLH1, MSH2 o MSH6.

El estudio genético confirmatorio de SL se llevó a cabo en 36 pacientes de los 42 con alteración IHQ del sistema MMR y confirmó el diagnóstico de 5 pacientes con síndrome de Lynch, lo que representa un 14% de los casos estudiados con alguna deficiencia en la expresión IHQ.

Según la proteína no expresada, los resultados del test genético muestran que, cuando la IHQ muestra ausencia en la expresión de MSH2, bien sea de forma única o acompañada de ausencia de expresión de MSH6, el diagnóstico de síndrome de Lynch por mutación en MSH2 es del 100%; mientras que si sólo hay ausencia en la expresión de MSH6 no encontramos mutaciones en línea germinal.

Respecto a MLH1, encontramos un 6.5% de pacientes con síndrome de Lynch entre los que presentaban déficit en la expresión IHQ; algo que demuestra que el modelo de inestabilidad de microsatélites incluye a los pacientes con SL y, también aquellos con cambios epigenéticos, siendo lo más frecuente la metilación del promotor de MLH1<sup>98</sup>.

En nuestro estudio no hemos podido analizar la metilación del promotor de MLH1, pero estamos convencidos de que un alto porcentaje de pacientes con inestabilidad de microsatélites medido por la falta de expresión IHQ de MLH1, corresponden a tumores metilados en el promotor de este gen.

La frecuencia poblacional de Síndrome de Lynch en nuestro estudio fue del 1.4%, en el límite bajo de lo publicado, donde siempre que se hace referencia al SL se habla de que es responsable del 1-5% de todos los tumores colorrectales. En el estudio de Hampel y cols.<sup>121</sup>, la frecuencia fue del 2%.

Todos los pacientes diagnosticados de SL cumplían alguno de los criterios clínicos de SL, bien de Ámsterdam o de Bethesda, por lo que podríamos concluir que el cribado universal sólo sería válido para aquellos pacientes que cumplan algún criterio; sin embargo, cuando analizamos el tipo de criterio que cumplen vemos que en dos de ellos (representan el 40% de los diagnósticos de SL) el único criterio que presentaban era el B de Bethesda (CCR sincrónicos o metacrónicos, u otros tumores asociados a SL, independientemente de la edad), lo que nos hace predecir que estos pacientes se

hubieran diagnosticado de Síndrome de Lynch tras el diagnóstico del primer caso de cáncer si hubiéramos tenido disponible el estudio de IHQ en aquel momento.

Por tanto, al igual que recomiendan las guías y grupos de expertos, nosotros creemos que el cribado universal de SL mediante el empleo de la IHQ de las proteínas que son codificadas por los genes reparadores del DNA es una medida de cribado eficaz, rápida y coste-efectiva.

Sin embargo, no podemos dejar de señalar que, aunque con escasa frecuencia, aparecen casos de síndrome de Lynch (mutación germinal en algún gen del sistema MMR) con expresión conservada en la IHQ (con o sin estabilidad de microsatélites). En el estudio de Moreira y cols.<sup>155</sup>, describen un 3.8% de pacientes (12/312) con diagnóstico de SL en los que la expresión de genes reparadores en la IHQ y/o el estudio de microsatélites, mostró tumores con IHQ normal y/o MSS. Estas familias, que son pocas, podrían escaparse de un cribado universal por medio de la IHQ, con lo que tendremos que seguir valorando los criterios clínicos en la búsqueda de familias con SL. En nuestro estudio no hemos detectado ningún caso de Síndrome de Lynch con expresión normal de proteínas reparadoras.

El estudio de la mutación V600E de BRAF, se ha podido llevar a cabo en 38 de los 42 pacientes con inestabilidad de microsatélites (90%) y se ha encontrado mutación en el 42% de los casos estudiados.

Sabemos que las mutaciones en BRAF no se encuentran mayoritariamente en los tumores colorrectales; se ha descrito en el 10% de los casos<sup>94</sup>. Sin embargo, también sabemos que esa frecuencia cambia cuando nos referimos a población seleccionada por inestabilidad de microsatélites, llegando a describirse mutación en BRAF en el 40-70% de tumores MSI<sup>94,156</sup>.

El meta-análisis publicado por Cheng y cols. en 2014<sup>94</sup>, recoge las principales características clínico-biológicas en pacientes con mutación de BRAF. Esta publicación describe que los pacientes con tumores con BRAF mutado son, con mayor frecuencia, mujeres de edad avanzada, con tumores mucinosos, pobremente diferenciados y localizados en colon derecho. Asimismo, la mutación de BRAF se correlaciona con mayor frecuencia con tumores con inestabilidad de microsatélites y con metilación del promotor del gen MLH1.

En nuestro estudio observamos resultados bastante similares, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con tumores BRAF mutado y BRAF nativo en los siguientes parámetros: edad más avanzada al diagnóstico (mediana 78 Vs 69 años), localización proximal casi en la totalidad de los tumores mutados y grado histológico pobremente diferenciado (38% Vs 5%). Respecto al sexo, no se alcanza la significación estadística, pero numéricamente vemos que entre los tumores BRAF mutados el porcentaje de mujeres es mayor que entre los tumores BRAF nativo (63% Vs 48%). Lo mismo ocurre con la histología, donde no se alcanza la significación estadística, pero numéricamente son más los tumores mucinosos o con células en anillo de sello en el grupo BRAF mutado (tabla 30).

Varios autores incluyen la determinación de BRAF en el algoritmo diagnóstico de SL, ya que la presencia de mutaciones BRAF en pacientes con síndrome de Lynch es

prácticamente nula<sup>157</sup>; por tanto, sería una manera de discriminar aquellos pacientes con IMS debida a fenotipo metilador antes de realizar el estudio genético en línea germinal en busca de SL<sup>122,158-160</sup>.

En nuestro trabajo, de los 16 pacientes con mutación en BRAF, 15 tenían alteración en la expresión IHQ de la proteína MLH1 y, sólo uno pérdida de expresión de MSH2 y MSH6. Ninguno de los pacientes con IHQ ausente para MLH1 fue diagnosticado de síndrome de Lynch, por lo que podemos concluir que nuestros datos apoyan los recogidos en la literatura.

Desde 1991, año en que se publicaron los primeros criterios de Ámsterdam<sup>107</sup> para discriminar familias con predisposición hereditaria al cáncer de colon, estos han ido cambiando con el paso de los años y la incorporación de nuevo conocimiento acerca de las familias con síndrome de Lynch hasta disponer de las guías de Bethesda modificadas<sup>115</sup>. El objetivo de las modificaciones que han sufrido los criterios, no es otro que el de no dejar a ninguna familia con síndrome de Lynch sin estudiar y, por tanto, sin un potencial beneficio del diagnóstico. De esta manera, los primeros criterios de Ámsterdam era muy estrictos y, por tanto, quien los cumple tiene una alta probabilidad de tener SL, mientras que los últimos de Bethesda, más laxos, no tenían tanta especificidad, pero aumentaba la sensibilidad.

Por tanto, los criterios clínicos de SL son una manera de “medir” la agregación familiar de cáncer colorrectal y, aunque en este momento podemos disponer de herramientas más sensibles y específicas para el diagnóstico de SL, no podemos dejar de lado la agregación familiar de CCR, que puede ser debida a otros síndromes de predisposición hereditaria al cáncer y que puede conllevar alteraciones genéticas aún no descritas.

Cuando analizamos nuestros datos en busca de diferencias entre los pacientes y sus tumores en base a si cumplen o no criterios clínicos de síndrome de Lynch, observamos que las diferencias con significación estadística lo son porque son parte del criterio en si mismo. En este sentido los pacientes que presentan criterios clínicos de SL son más jóvenes al diagnóstico de su tumor, aparecen con mayor frecuencia tumores en varias localizaciones (CCR sincrónico o metacrónico) y el CCR presenta inestabilidad de microsatélites con mayor frecuencia que en aquellos pacientes sin criterios clínicos de SL.

En los pacientes que presentan agregación familiar de CCR pero en cuyos tumores la expresión IHQ de los genes reparadores estaba presente, decidimos estudiar las dos mutaciones más frecuentes de MYH (encontradas en el 80% de los casos de MAP)<sup>139</sup>, ya que el síndrome de poliposis asociada a MYH es una entidad recientemente descrita, cuya correlación fenotipo-genotipo no esta totalmente establecida.

La MAP se describió por primera vez buscando alteraciones genéticas que pudieran explicar un fenotipo atenuado de la poliposis adenomatosa familiar<sup>124</sup> y se la hace responsable del 30-40% de casos de PAFA en los que no se encuentran mutaciones en el gen APC. Sin embargo, en los últimos años se están describiendo mutaciones en el gen MYH que son responsables de la aparición de tumores extracolónicos con un fenotipo más parecido a lo que ocurre en el síndrome de Lynch<sup>131-133</sup>. Es por tanto, un síndrome hereditario de predisposición al cáncer y, concretamente, al CCR del que aún nos quedan muchas cosas por aprender.

Sin embargo, no hemos encontrado ninguna mutación bialélica en el gen MYH y, por tanto, ninguna de nuestras familias con criterios clínicos de SL y expresión conservada en IHQ de MMR tienen diagnóstico de MAP.

No obstante, una paciente con CCR, en la que solamente se cumplía el criterio A de Bethesda (diagnóstico antes de los 50 años), presentaba una mutación en heterocigosis del gen MYH (G396D); el estudio completo del gen no mostró otras alteraciones. Esto también nos lleva a pensar, en consonancia con publicaciones recientes, que las mutaciones de un sólo alelo del gen MYH pueden incrementar el riesgo de CCR<sup>127,128,161</sup>.

Los pacientes diagnosticados de CCR antes de los 50 años, pero sin historia familiar de cáncer, han sido incluidos en los criterios clínicos de Bethesda para el diagnóstico de SL en base a una de las características principales del SL<sup>111</sup>, el diagnóstico de los tumores a edad temprana; sin embargo, varios autores se refieren al CCR de inicio temprano como una entidad diferente, con características propias que, frecuentemente, no está ligada al CCR hereditario.

Nosotros hemos querido analizar los pacientes diagnosticados antes de los 50 años, en busca de características propias y, aunque la muestra es pequeña (16 pacientes) y no permite extraer conclusiones contrastadas, observamos como la mayoría de pacientes son mujeres (63%), con tumores localizados en colon izquierdo y recto (82%), bien o moderadamente diferenciados (82%) y, solamente, un paciente tuvo ausencia en la expresión IHQ del gen MLH1. Parece que nuestros datos, a pesar del tamaño muestral, definen un subgrupo de tumores colorrectales, con características clínicas diferenciadas y del que, muy posiblemente subyacen características moleculares diferentes, como están definiendo otros grupos<sup>102</sup>.

Finalmente, para completar el algoritmo de nuestro trabajo, hemos estudiado la frecuencia del SNP -93G>A de la región promotora de MLH1 en todos los pacientes con CCR de los que disponíamos muestra y consentimiento informado (129 pacientes) y en un grupo control (149 sujetos).

Este polimorfismo ha sido descrito como una alteración que interviene en la aparición de tumores con inestabilidad de microsatélites asociado a la metilación del gen MLH1, por tanto, asociado a tumores esporádicos con fenotipo metilador.

Nosotros concluimos con nuestros datos que la presencia del alelo mutado A en homocigosis en la posición -93 del gen MLH1 representa un aumento del riesgo de cáncer colorrectal esporádico, siendo este riesgo mayor entre la población que no cumple criterios clínicos de SL, es decir, entre la población sin agregación familiar. No obstante, nuestros datos no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes genotipos (AA, AG, GG) en cuanto a las características clínico-biológicas de los tumores. Por tanto, no encontramos correlación con el fenotipo MSI.

#### Limitaciones del estudio:

Respecto a los pacientes, se han elegido aquellos que cumplían los dos criterios de inclusión recogidos en material y métodos, de forma que se pierde parte de la muestra poblacional para el cribado de Síndrome de Lynch.

A todos los pacientes intervenidos de CCR se les realizó el estudio de IHQ de los genes reparadores de forma rutinaria; pero no todos los pacientes diagnosticados de CCR se les interviene quirúrgicamente, por lo que aquellos pacientes diagnosticados en estadio IV que no precisan resección del tumor primario, no tienen estudio IHQ, salvo que se solicite expresamente.

En el momento en el que comenzó a realizarse la IHQ, el resultado no era imprescindible para el manejo del paciente, por lo que sólo en algunos casos de los que únicamente se disponía de biopsia, se solicitaba el estudio.

Igualmente, es preciso disponer de historia personal y familiar de eventos oncológicos, y estos datos no están siempre recogidos en las historias clínicas, esta limitación asociada al hecho de que algunos pacientes fallecieron poco después del diagnóstico y no fue posible recoger estos datos en la entrevista personal, hace que se pierda parte de la muestra.

En algunas ocasiones no dispusimos de DNA del paciente para los estudios posteriores. En otros casos, fue el propio paciente quien declinó la participación en el estudio, incluso, algunos rechazaron el estudio genético diagnóstico de Síndrome de Lynch, indicado en práctica clínica asistencial.

Otra limitación del estudio referente a los pacientes fue la ausencia de datos referentes a los antecedentes personales y familiares de pólipos. Dos pacientes, fueron diagnosticados de poliposis familiar por mutación en APC, uno de ellos clásica y, otro atenuada. Fueron diagnosticados, fundamentalmente, por sus antecedentes personales al encontrarnos múltiples pólipos al diagnóstico. Sin embargo, los datos referentes al número, tipo de pólipos, edad de aparición de los pólipos, etc., en la historia familiar de los pacientes no estaba recogida. Por tanto, aunque en aquellos pacientes que presentan criterios clínicos de SL se les estudió el gen MYH, no están estudiados en base a criterios de poliposis y, además, existen otros genes asociados a poliposis que pueden no estar estudiados.

Respecto a los métodos técnicos utilizados tenemos que reseñar lo siguiente:

- IHQ MMR: se han obtenido algunos resultados no valorables en la tinción IHQ, hecho que puede estar asociado con la curva de aprendizaje por dos motivos; el primero de ellos es que el mayor número de resultados no valorables se encontraron en el primer año de estudio y, el segundo podría estar en relación con la técnica IHQ utilizada, encontramos más resultados no valorables en MLH1 ya que para la tinción de MLH1 se utiliza un anticuerpo monoclonal que hay que diluir en oposición a MSH2 y MSH6 que ya están prediluidos.
- Test genético en línea germinal de genes reparadores: se ha utilizado como método diagnóstico, principalmente, la secuenciación directa por el método de

Sanger; pero en algunos pacientes, los primeros incluidos en el estudio, el test genético utilizado fue el heterodúplex que, es menos sensible que la secuenciación directa.

- Test genético en línea germinal de MYH: solamente se estudiaron las dos mutaciones más frecuentes del gen MYH, pero se han descrito otros cambios del gen MYH asociados con la poliposis atenuada que, nosotros no hemos analizado salvo en el caso donde encontramos una mutación en heterocigosis.
- Análisis de la mutación V600E de BRAF: se ha llevado a cabo en todos los pacientes que presentaban IHQ ausente de alguna de las proteínas del sistema MMR, sin embargo, no ha sido posible realizar dicho estudio en toda la población de estudio; algo que, sin duda, nos hubiese aportado más datos en relación a las características clínico-moleculares del CCR. No obstante, nuestro estudio muestra los datos en una población seleccionada donde, sin duda, el estudio de BRAF es fundamental. Por otra parte, de los 42 pacientes seleccionado para el estudio de BRAF, sólo pudimos hacer el análisis en 38, el resto de muestras no estuvieron disponibles, hecho que también limita nuestros datos.

Nuestro estudio contribuye a profundizar en el conocimiento de las bases clínicas y moleculares del cáncer colorrectal. La determinación de tumores con inestabilidad de microsatélites está siendo fundamental a la hora de clasificar el CCR; es, en nuestros días, el único subtipo molecular de consenso que es posible definir con los medios que tenemos a nuestro alcance.

Esta clasificación molecular no había sido descrita cuando decidimos iniciar en este proyecto y, nos alegra conocer que nuestra investigación y nuestros datos están en consonancia con los datos del mayor trabajo de investigación en este campo, la clasificación molecular de consenso<sup>102</sup>.

Por tanto, desde nuestro punto de vista, la determinación de la inestabilidad de microsatélites medida por la expresión inmunohistoquímica de las proteínas que son codificadas por los genes reparadores del DNA y el análisis del estado mutacional de BRAF son claves para mejorar el conocimiento y el manejo de los pacientes con CCR, nuestros datos apoyan esta teoría y creemos que debería establecerse como rutina en todos los pacientes con CCR.

El cribado poblacional de síndrome de Lynch por medio de técnicas de IHQ es una estrategia rápida, sencilla y coste-efectiva como demuestra la literatura científica, pero además es posible realizarla de forma universal y debe de ser adoptada por toda la comunidad científica.

Sin embargo, no debemos de abandonar el uso de los criterios clínicos de SL que permiten identificar familias con agregación familiar de cáncer que representan un porcentaje importante de casos (20-25% de casos según la literatura, en nuestro estudio representan un 31%). En estos casos y sus familias son importantes las medidas de prevención primaria y secundaria acorde a la historia personal y familiar, precisando un seguimiento endoscópico más intensivo que en población general.

En resumen, a pesar de ser una muestra relativamente pequeña y de un solo centro, el estudio de los pacientes y sus tumores en base a la expresión IHQ de los genes del sistema MMR en estos, muestra datos muy interesantes a la hora de clasificar el CCR y a la hora de establecer una estrategia universal de cribado de SL. Nuestros datos parecen suficientemente robustos para poder extraer conclusiones ya que el análisis de la literatura muestra resultados en la misma dirección.

# **CONCLUSIONES**



---

## **CONCLUSIONES:**

El análisis de los resultados de este estudio nos ha permitido, a nuestro juicio, formular las siguientes conclusiones:

- 1º- Los tumores con ausencia de expresión de proteínas del sistema MMR son de predominio en colon derecho, con elevada frecuencia de histología mucinosa y pobremente diferenciados, y es mayor el porcentaje de pacientes que cumple criterios clínicos de SL, a diferencia de lo que ocurre en los tumores con expresión IHQ conservada; por lo que la expresión IHQ de proteínas reparadoras del DNA define un subgrupo de CCR.
- 2º- La ausencia de expresión IHQ de proteínas reparadoras del DNA sólo se corresponde con mutación germinal del gen afecto en un 14% de los casos. Este porcentaje es del 100% cuando el gen que no se expresa es MSH2. Estos datos sugieren que los tumores sin expresión de MSH2 pueden ser diagnósticos de Síndrome de Lynch, no siendo así cuando la alteración IHQ aparece en otra proteína del sistema MMR.
- 3º- El Síndrome de Lynch es responsable de 1.4% de los tumores colorrectales de nuestro estudio. Todos los pacientes con diagnóstico de síndrome de Lynch cumplían algún criterio clínico de Bethesda y/o Ámsterdam, lo que sugiere que la agregación familiar de cáncer sigue siendo importante en el estudio del CCR hereditario.
- 4º- Los criterios clínicos de síndrome de Lynch no sirven para cribar poliposis asociada al gen MYH. Los pacientes con IHQ de genes MMR conservada que presentaban algún criterio clínico de SL, no presentaban alteraciones en el gen MYH.
- 5º- La mutación dominante AA en la posición -93 del gen MLH1 representa un incremento del riesgo de cáncer colorrectal esporádico, lo que sugiere que puede ser útil su incorporación al estudio de riesgo de CCR esporádico.
- 6º- La incorporación de la determinación de la mutación V600E de BRAF al diagnóstico del CCR podría definir un subgrupo de tumores con características clínico-biológicas diferenciadas; siendo los tumores con mutación de BRAF más indiferenciados, localizados casi exclusivamente en colon derecho, y se desarrollan a edad más avanzada que los tumores BRAF nativo.



# **BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA:**

- 1- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. (<http://globocan.iarc.fr>, accessed on 24.8.2014)
- 2- Causas de mortalidad en España, 2012 ([www.ine.es](http://www.ine.es)).
- 3- E. Fonseca, L.M. Navarro: Cáncer de colon y recto. En: Cruz Hernández JJ, Rodríguez Sánchez CA, del Barco Morillo E: Oncología Clínica, 5ª Ed. Aula médica. Madrid 2012; pp 461-77.
- 4- Boyle P y Langman LS. ABC of colorectal cancer. *Epidemiology. Br Med J* 2000; 321:805-808.
- 5- Libutti SK, Saltz LB and Willet CG and Levine RA: Cancer of the Colon. En: De Vita VT, Hellman S and Rosenberg SA: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 10<sup>th</sup> Ed. Wolters Kluwer Health. Philadelphia 2015; pp 768-812.
- 6- Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, et al. Cancer mortality in the European Union, 1970-2003, with a joinpoint analysis. *Ann Oncol* 2008; 19:631-40.
- 7- Ferlay J, Autier P, Boniol M et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18:581-92.
- 8- Ferlay J, Parkin DM and Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46:765-81.
- 9- Cabanes A, Vidal E, Aragonés N et al. Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 3:iii14-20.
- 10- Esteve J, Benhamou E, Raymond L. *Statistical methods in cancer research, vol IV: Descriptive Epidemiology*. Lyon: IARC Scientific Publ No 128, 1994.
- 11- De Angelis R, Sant M, Coleman MP et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5 – a population-based study. *Lancet Oncol* 2014; 15:23-34.
- 12- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *Ca Cancer J Clin* 2010; 60:277-300.
- 13- Hartz A, He T, Ross JJ. Risk factors for colon cancer in 150.912 postmenopausal women. *Cancer Causes Control* 2012; 23:1599-1605.
- 14- Beresford SA, Johnson KC, Ritenbaugh C, et al. Low-fat dietary pattern and risk of colorectal cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA* 2006; 295-643.
- 15- IARC: International Agency for Research on Cancer ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)).
- 16- Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol* 2015; 16:1599-600.
- 17- Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort Studies. *JAMA* 2005; 294-2849-57.
- 18- Asano T, McLeod RS. Dietary fibre for the prevention of colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; CD003430.
- 19- Koushik A, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort Studies. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:1471-83.
- 20- Bamia C, Lajiou P, Buckland G, et al. Mediterranean diet and colorectal cancer risk: results from a European cohort. *Eur J Epidemiol* 2013; 28:317-28.
- 21- Orlich MJ, Singh PN, Sabaté J, et al. Vegetarian dietary patterns and the risk of colorectal cancers. *JAMA Intern Med* 2015; 175:767-76.

- 22- Aune D, Lau R, Chan DS, et al. Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Ann Oncol* 2012; 23:37-45.
- 23- Shaukat A, Scouras N, Schünemann HJ. Role of supplemental calcium in the recurrence of colorectal adenomas: a metaanalysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:390-4.
- 24- Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2006; 354:684-96.
- 25- Baron JA, Barry EL, Mott LA, et al. A trial of calcium and vitamina D for the prevention on colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2015; 373:1519-30.
- 26- Choi SV, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000;130:129-32.
- 27- Lee JE; Willett WC, Fuchs CS, et al. Folate intake and risk of colorectal cancer and adenoma: modification by time. *Am J Clin Nutr* 2011;93:817-25.
- 28- Cole BF, Baron JA, Sandler RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA* 2007; 297:2351-9.
- 29- Chen CG, Pang Z, Liu QF. Magnesium intake and risk colorectal cancer: a meta-analysis of prospective Studies. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66:1182-1186.
- 30- Guercio BJ, Sato K, Niedzwiecki D, et al. Coffee intake, recurrence, and mortality in stage III colon cancer: results from CALGB 89803 (Alliance). *J Clin Oncol* 2015; 33:3598-607.
- 31- Sinha R, Cross AJ, Daniel CR, et al. Caffeinated and decaffeinated coffee and tea intakes and risk of colorectal cancer in a large prospective study. *Am J Clin Nutr* 2012; 96:374-81.
- 32- Wu S, Feng B, Li K, et al. Fish consumption and colorectal cancer risk in humans: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2012; 125:551-9.
- 33- Ngo SN, Williams DB, Cobiac L, et al. Does garlic reduce risk of colorectal cancer? A systematic review. *J Nutr* 2007; 137:2264-9.
- 34- Hu JY, Hu YW, Zhou JJ, et al. Consumption of garlic and risk of colorectal cancer: an updated meta-analysis of prospective studies. *World J Gastroenterol* 2014; 20:15413-22.
- 35- Boyle T, Keegel T, Bull F, et al. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104:1548-61.
- 36- Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2015; 181:832-45.
- 37- Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, et al. Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:920-31.
- 38- Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, et al. Smoking and colorrectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2008;300:2765-78.
- 39- Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol* 2011; 22:1958-72.
- 40- Henderson TO, Oeffinger KC, Whitton J, et al. Secondary gastrointestinal cancer in childhood cancer survivors: a cohort study. *Ann Intern Med* 2012; 156:757-66.

- 41- Nottage K, McFarlane J, Krasin MJ, et al. Secondary colorectal carcinoma after childhood cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30:2552-8.
- 42- Baxter NN, Tepper JE, Durham SB, et al. Increased risk of rectal cancer after prostate radiation: a population-based study. *Gastroenterology* 2005;128:819-24.
- 43- De Brujin KM, Arends LR, Hansen BE, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer. *Br J Surg* 2013; 100:1421-9.
- 44- Guraya SY. Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis and systematic review. *World J Gastroenterol* 2015; 21:6026-31.
- 45- Yin S, Bai H, Jing D. Insulin therapy and colorectal cancer risk among type 2 diabetes mellitus patients: a systematic review and meta-analysis. *Diagn Pathol* 2014; 9:91.
- 46- Deng L, Gui Z, Zhao L, et al. Diabetes mellitus and the incidence of colorectal cancer: an update systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2012; 57:1576-85.
- 47- Singh S, Singh H, Singh PP, et al. Antidiabetic medications and the risk of colorectal cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22:2258-68.
- 48- Safaeian M, Robbins HA, Berndt SI, et al. Risk of colorectal cancer after solid organ transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2016; 16:960-7.
- 49- Kato T, Kakuta Y, Abe T, et al. The benefits of cancer screening in kidney transplant recipients: a single-center experience. *Cancer Med* 2016; 5:153-8.
- 50- Calderon MD, Delgado E, García Campos F. Acromegaly and associated tumours: what should gastroenterologists know? *Gastroenterol Hepatol* 2016; S0210-5705(16)00027-3.
- 51- Burn J, Gerdes AM, Macrae F, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet* 2011; 378:2081-7.
- 52- Burn J, Bishop DT, Chapman PD, et al. A randomized placebo-controlled prevention trial of aspirin and/or resistant starch in young people with familial adenomatous polyposis. *Cancer Prev Res* 2011; 4:655-65.
- 53- Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010; 376:1741-50.
- 54- Rothwell PM, Fowkes Gr, Belch JJ, et al. Long term effect of aspirin on deaths due to cancer: pooled analysis of data from randomised controlled trials. *Lancet* 2011; 377:31-41.
- 55- Rothwell PM, Price JF, Fowkes FG, et al. Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials. *Lancet* 2012; 379:1602-12.
- 56- Rothwell PM, Wilson M, Price J, et al. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled studies. *Lancet* 2012; 379:1591-601.
- 57- Thun MJ, Jacobs EJ, Patrono C. The role of aspirin in cancer prevention. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9:259-67.
- 58- Bibbins-Domingo K; U.S. Preventive Services Task Force. Aspirin use for the primary prevention of cardiovascular disease and colorectal cancer: U.S.

- Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med* 2016. doi: 10.7326/M16-0577.
- 59- Gillessen S, Templeton A, Marra G, et al. Risk of colorectal cancer in men on long-term androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:1760-70.
- 60- Lin JH, Giovannucci E. Sex hormones and colorectal cancer: what have we learned so far? *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:1746-7.
- 61- Lavasani S, Chlebowski RT, Prentice RL, et al. Estrogen and colorectal cancer incidence and mortality. *Cancer* 2015; 121:3261-71.
- 62- Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, et al. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004; 350:991-1004.
- 63- Simon MS, Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, et al. Estrogen plus progestin and colorectal cancer incidence and mortality. *J Clin Oncol* 2012; 30:3983-90.
- 64- Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 352:2184-92.
- 65- Lytras T, Nikolopoulos G, Bonovas S. Statins and the risk of colorectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis of 40 studies. *World J Gastroenterol* 2014; 20:1858-70.
- 66- Cai H, Zhang G, Wang Z, et al. Relationship between the use of statins and patient survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015; 10:e0126944.
- 67- Singh S, Singh AG, Murad MH, et al. Bisphosphonates are associated with reduced risk colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:232-9.
- 68- Thosani N, Thosani SN, Kumar S, et al. Reduced risk of colorectal cancer with use of oral bisphosphonates: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2013; 31:623-30.
- 69- Makar GA, Holmes JH, Yang YX. Angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106:djt374.
- 70- T. Martín, E. del Barco y JJ. Cruz: Epidemiología del cáncer. Factores de riesgo. En: Cruz Hernández JJ, Rodríguez Sánchez CA, del Barco Morillo E: *Oncología Clínica*, 5ª Ed. Aula médica. Madrid 2012; pp 37-58.
- 71- P. Pérez Segura: Alteraciones moleculares en CCHNP. En: Alonso MA, Balmaña J, Benavides M, et al, Eds. *Cáncer Hereditario II Ed*. SEOM 2010; pp. 479-497.
- 72- Libutti SK, Saltz LB and Willet CG and Levine RA: Cancer of the Rectum. En: De Vita VT, Hellman S and Rosenberg SA: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 10<sup>th</sup> Ed. Wolters Kluwer Health. Philadelphia 2015; pp 823-41.
- 73- NCCN Guidelines: Colon Cancer ([www.nccn.org](http://www.nccn.org))
- 74- Maurel J, Gravalos C, Rivera F, et al. SEOM clinical guidelines for the adjuvant treatment of colorectal cancer 2013. *Clin Transl Oncol* 2013; 15:991-5.
- 75- Jass JR, Sobin LH. *Histological typing of intestinal tumours*. 2nd ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1989.
- 76- Warschkow R, Tarantino I, Huttner FJ, et al. Predictive value of mucinous histology in colon cancer: a population-based, propensity score matched analysis. *Br J Cancer* 2016 ;114:1027-32.
- 77- Psathakis D, Schiedeck TH, Krug F, et al. Ordinary colorectal adenocarcinoma vs. primary colorectal signet-ring cell carcinoma: study matched for age, gender, grade, and stage. *Dis Colon Rectum* 1999; 42:1618-25.

- 78- Pyo JS, Sohn JH, Kang G. Medullary carcinoma in the colorectum: a systematic review and meta-analysis. *Hum Pathol* 2016; doi: 10.1016/j.humpath.2016.02.018.
- 79- Shivdasani RA: Molecular biology of colorectal cancer. En: De Vita VT, Hellman S and Rosenberg SA: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 10<sup>th</sup> Ed. Wolters Kluwer Health. Philadelphia 2015; pp 757-67.
- 80- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-32.
- 81- Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139:846-52.
- 82- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al (Eds): *AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual*, 7th Ed. Springer. New York 2010; pp 173-206.
- 83- Kuijpers CC, Sluijter CE, Von der Thüsen JH, et al. Interlaboratory variability in the histologic grading of colorectal adenocarcinomas in a nationwide cohort. *Am J Surg Pathol* 2016; 2016 Mar 11. [Epub ahead of print].
- 84- Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: *WHO Classification of tumours of the digestive system*, 4<sup>th</sup> ed, Bosman FT, Carneiro R, Hruban RH, Theise ND (eds), International Agency for Research on Cancer, Lyon 2010. pp. 134-46.
- 85- Labianca R, Nordinger B, Beretta GD, et al. Early Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2013; 24:vi64-vi72.
- 86- Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology recommendation on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:3408-19.
- 87- Saha S, Wiese D, Badin J, et al. Technical details of sentinel lymph node mapping in colorectal cancer and its impact on staging. *Ann Surg Oncol* 2000; 7:120-124.
- 88- Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer* 2012; 118:628-38.
- 89- Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344:1196-1206.
- 90- Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC, et al. Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013; 31:3664-72.
- 91- Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA, et al. Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2012; 18:890-900.
- 92- Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; 369:1023-34.
- 93- Chen KH, Lin YL, Liao JY, et al. BRAF mutation may have different prognostic implications in early- and late-stage colorectal cancer. *Med Oncol* 2016; 33:39.
- 94- Chen D, Huang JF, Liu K, et al. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Plos One* 2014; 9:e90607.
- 95- Morikawa T, Kuchiba A, Qian ZR, et al. Prognostic significance and molecular associations of tumor growth pattern in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19:1944-53.

- 96- Hase K, Shatney C, Johnson D, et al. Prognostic value of tumor “budding” in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993; 36:627-35.
- 97- Park IJ, Choi GS, Lim KH, et al. Serum carcinoembryonic antigen monitoring after curative resection for colorectal cancer: clinical significance of the preoperative level. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:3087-93.
- 98- Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlatos in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2008; 10:13-27.
- 99- Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualizad management? *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103:29-35.
- 100- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-9.
- 101- Martínez-Urueña N, Macias L, Perez-Carbonero L, et al. Incidence of -93 MLH1 promoter polymorphism in familial and sporadic colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2013; 15:e118-23.
- 102- Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015; 21:1350-6.
- 103- I. Blanco, A. Teulé, S. González: Aspectos clínicos de los síndromes polipósicos. En: Alonso MA, Balmaña J, Benavides M, et al, Eds. *Cáncer Hereditario II Ed. SEOM* 2010; pp. 559-90.
- 104- Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in th pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med* 1913; 12: 546-55.
- 105- Warthin AS. The further study of a cancer family. *J Cancer Res* 1925; 9:279-86.
- 106- Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, et al. Hereditary factors in cancer: study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966; 117:206-12.
- 107- Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34:424-5.
- 108- Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, et al. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 2009; 76:1-18.
- 109- Perea J, Cano JM, Rueda D, et al. Classifying early-onset colorectal cancer according to tumor location: new potencial subcategories to explore. *Am J Cancer Res* 2015; 5:2308-13.
- 110- Mork ME, You YN, Ying J, et al. High prevalence of hereditary cancer syndromes in adolescents and young adults with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33:3544-9.
- 111- Lynch HT and Chapelle de la A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:919-32.
- 112- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP and Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1999; 116:1453-6.
- 113- Rodriguez-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; 89:1758-62.
- 114- Pinol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of

- patients with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *JAMA* 2005; 293:1986-94.
- 115- 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; 96:261-8.
- 116- Castro E. Mecanismos de reparación del ADN. Aplicaciones en el tratamiento del cáncer. *FMC Oncología* 2012; 7:9-19.
- 117- Fukui K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids* 2010; doi: 10.4061/2010/260512.
- 118- Söreide D, Janssen EA, Söiland H, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93:395-406.
- 119- 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; 58:5248-57.
- 120- Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20:1043-8.
- 121- Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). *N Engl J Med* 2005; 352:1851-60.
- 122- Guillen-Ponce C, Serrano R, Sánchez-Heras, AB, et al. Clinical guideline SEOM: hereditary colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 2015; 17:962-71.
- 123- Balmaña J, Balager F, Cervantes A, et al. Familiar risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2013; 24: vi73-80.
- 124- Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002; 30:227-32.
- 125- Lindor NM. Hereditary colorectal cancer: MYH-associated polyposis and other newly identified disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23:75-87.
- 126- Bopari KS, Dekker E, Van Eeden S, et al. Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis. *Gastroenterology* 2008; 135:2014-8.
- 127- Khalaf R, Jones C, Strutt W, Williamson P. Colorectal cancer in a monoallelic MYH mutations carrier. *J Gastrointest Surg* 2013;17:1500-2.
- 128- Theodoratou E, Campbell H, Tenesa A, et al. A large-scale meta-analysis to refine colorectal cancer risk estimates associated with MUTYH variants. *Br J Cancer* 2010; 103:1875-84.
- 129- Aretz S, Uhlhaas S, Georgens H, et al. MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 2006; 119:807-14.
- 130- Bolocan A, Ion D, Stoian RV, Serban MB. Map syndrome (MYH associated polyposis) colorectal cancer, etiopathological connections. *J Med Life* 2011; 15:109-11.
- 131- Vogt S, Jones N, Christian D, et al. Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology* 2009; 137:1976-85.
- 132- Nielsen M, Franken PF, Reinards TH, et al. Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP). *J Med Genet* 2005;42:e54.

- 133- Barnetson RA, Devlin L, Miller J, et al. Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, MYH, in patients with endometrial cancer. *Clin Genet* 2007; 72:551-5.
- 134- David SS, Williams SD. Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in base-excision-repair. *Chem Rev* 1998; 98:1221-62.
- 135- Cheadle JP, Sampson JR. Exposing the MYtH about base escisión repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet* 2003; 2:R159-65.
- 136- Jones S, Emmerson P, Maynard J, et al. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C>T:A mutations. *Hum Mol Genet* 2002; 11:2961-7.
- 137- Jones S, Lambert S, Williams GT, et al. Increased frequency of the kras G12C mutation in MYH polyposis colorectal adenomas. *Br J Cancer* 2004; 90:1591-3.
- 138- Lefevre JH, Colas C, Coulet F, et al. MYH biallelic mutation can inactivate the two genetic pathways of colorectal cancer by APC or MLH1 transversions. *Fam Cancer* 2010; 9:589-94.
- 139- Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003; 348:791-9.
- 140- Boparai KS, Dekker E, Polak MM, et al. A serrated colorectal cancer pathway predominates over the classic WNT pathway in patients with hyperplastic polyposis syndrome. *Am J Pathol* 2011; 178:2700-7.
- 141- Venesio T, Balsamo A, D'Agostino VG, et al. MUTYH-associated polyposis (MAP), the syndrome implicating base escisión repair in inherited predisposition to colorectal tumors. *Front Oncol* 2012; 2:83.
- 142- Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004; 22:1209-14.
- 143- Armaroli P, Villain P, Suonio E, et al. European Code against Cancer, 4<sup>th</sup> Edition: Cancer screening. *Cancer Epidemiol* 2015; 39:S139-52.
- 144- Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:1408-17.
- 145- Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33:692-700.
- 146- Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010; 28:4697-705.
- 147- Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; 369:1023-34.
- 148- Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372:2509-20.
- 149- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10:472-84.
- 150- Van Krieken JH, Rouleau E, Ligtenberg MJ, et al. RAS testing in mestastatic colorectal cancer: advances in Europe. *Virchows Arch* 2016; 468:383-96.
- 151- Genetic counselling. *Am J Hum Genet* 1975; 27:240-2.

- 152- Perez-Villamil B, Romera-Lopez A, Hernandez-Prieto S, et al. Colon cancer molecular subtypes identified by expression profiling and associated to stroma, mucinous type and different clinical behaviour. *BMC Cancer* 2012; 12:260.
- 153- Nejda N, Iglesias D, Moreno Azcoita M, et al. A MLH1 polymorphism that increases cancer risk is associated with better outcome in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 193:71-7.
- 154- Boland CR, Shike M. Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138:2197.e1-7.
- 155- Moreira L, Balaguer F, Lindor N, et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA* 2012; 308:1555-65.
- 156- Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, et al. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* 2012; 49:151-7.
- 157- Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch* 2013; 463:613-21.
- 158- Vasen HF, Blanco I, Aktan-Collan K, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 2013; 62:812-23.
- 159- Syngal S, Brand RE, Church JM, et al. ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* 2015; 110:223-62.
- 160- Loughrey MB, Waring PM, Tan A, et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Familial Cancer* 2007; 6:301-310.
- 161- Garre P, Briceño V, Xicola RM, et al. Analysis of the oxidative damage repair genes NUDT1, OGG1, and MUTYH in patients from mismatch repair proficient HNPCC families (MSS-HNPCC). *Clin Cancer Res* 2011; 17:1701-12.



**ANEXOS**



**ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO UTILIZADO EN LA UNIDAD DE CONSEJO GENÉTICO- SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA- CAUSA.**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ESTUDIO GENÉTICO EN INDIVIDUOS QUE CUMPLEN CRITERIOS CLÍNICOS DE CÁNCER COLON HEREDITARIO NO POLIPÓSICO.**

Yo,  
He escuchado la información que se me ha aportado.  
He podido hacer preguntas y aclarar todas las dudas.

He recibido suficiente información, tanto oralmente como por escrito, sobre las características, beneficios y problemas que plantea el estudio genético en el cáncer.

He hablado con .

Comprendo que mi participación es voluntaria.  
Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mi atención médica

Por lo anterior, **OTORGO LIBREMENTE MI CONSENTIMIENTO** para que se proceda al estudio de factores genéticos predisponentes *al cáncer de colon hereditario no polipósico*.

SALAMANCA a de de 201

Fecha

Firma del participante

SALAMANCA a de de 201

Fecha

Firma del médico

**AUTORIZO** para que las **personas abajo indicadas** puedan ser informadas sobre los resultados e implicaciones del estudio.

Nombres y apellidos:

Teléfonos:

Fecha:

**REVOCACIÓN:**

En el ejercicio del derecho que tengo de anular el consentimiento prestado, manifiesto mi voluntad de revocarlo y solicito la destrucción de las muestras de sangre obtenidas y de la información que se haya derivado de las mismas.

Firma

Fecha



**ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN**

**HOSPITAL  
UNIVERSITARIO  
DE SALAMANCA**  
Paseo de San Vicente, 58-182  
37007 Salamanca

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Apellidos \_\_\_\_\_ :

Nombre \_\_\_\_\_ :

**UTILIZACIÓN DE SANGRE, LÍQUIDOS BIOLÓGICOS Y  
TEJIDOS PARA IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS QUE  
MANTIENEN Y PROPAGAN EL CÁNCER HUMANO**

- A lo largo de la evolución de su enfermedad deberemos obtener muestras de sangre, líquidos biológicos o tejidos.
- Estas muestras son necesarias para establecer el diagnóstico y valorar la respuesta al tratamiento.
- Para establecer dicho diagnóstico y valorar la respuesta no suele ser necesario emplear todo el material obtenido, y la parte de las muestras no utilizada es almacenada o destruida.
- Para un adecuado avance en la Investigación Biomédica es fundamental el poder estudiar muestras de sangre, líquidos biológicos y tejidos de pacientes con diversas enfermedades. Por ello, sería de gran utilidad que nos permitiera una pequeña cantidad extra , aproximadamente 10cc, para el estudio o parte del tejido que se le va a extirpar.
- En caso de autorizarnos podemos garantizarle que:
  1. Todo el material se tratará con la mayor confidencialidad posible.
  2. Nunca se le someterá a punciones o biopsias con la única finalidad de obtener material para la investigación; se empleará únicamente el material sobrante.
  3. En todo momento nos ajustaremos a la legislación vigente sobre la materia.

**UTILIZACIÓN DE  
SANGRE, LÍQUIDOS BIOLÓGICOS Y TEJIDOS PARA  
IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS QUE MANTIENEN Y  
PROPAGAN EL CÁNCER HUMANO**

**Declaración del Paciente**

Yo, \_\_\_\_\_  
diagnosticado de \_\_\_\_\_, a la edad de  
\_\_\_\_\_ certifico que:

- He hablado con el investigador, \_\_\_\_\_,  
el cual me ha informado sobre :
  - La finalidad de los estudios a realizar con las muestras de  
sangre, líquidos biológicos y tejidos de mi obtenidos.
  - Las garantías que se me ofrecen para asegurar su correcta  
utilización.
  - Que en cualquier momento puedo revocar mi  
consentimiento.
- He comprendido la información recibida y podido formular todas las  
preguntas que he creído oportunas.

Firma del paciente \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Firma del Investigador \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**Declaración del familiar, persona allegada o representante legal, en su caso,  
de que han recibido la información por incapacidad del paciente.**

Firma : \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**Declaración de testigo, en su caso**

Firma : \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

## **ANEXO 3: GLOSARIO**

- **5FU** 5-Fluorouracilo.
- **ADC** Adenocarcinoma.
- **ADO** Antidiabético Oral.
- **AINE** Anti-Inflamatorio No Esteroideo.
- **AJCC** "American Joint Committee on Cancer".
- **APC** "Adenomatous poliposis coli". Gen supresor de tumores.
- **ASCO** "American Society of Clinical Oncology".
- **BER** "Base excision repair". Mecanismo de reparación del DNA por escisión de bases.
- **CAUSA** Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.
- **CCHNP** Cáncer de Colon Hereditario no polipósico.
- **CCR** Cancer colorrectal.
- **CEA** Antígeno Carcinoembrionario.
- **CIMP** "CpG Island Methylator Phenotype".
- **CIN** Inestabilidad Cromosómica.
- **CMS** "Consensus Molecular Subtypes".
- **CSGE** Electroforesis en gen sensible a la conformación.
- **DM** Diabetes Melitus.
- **DNA** Ácido desoxirribonucleico.
- **ESMO** "European Society for Medical Oncology".
- **EUROCARE** "European Cancer Registry Based Study on Survival and Care of Cancer Patients".
- **IARC** "International Agency for Research on Cancer".
- **IHQ** Inmunohistoquímica.
- **IMC** Índice de Masa Corporal.
- **INE** Instituto Nacional de Estadística.
- **MAP** Poliposis Adenomatosa asociada a MYH.
- **MLH1** "MutL homolog 1". Proteína implicada en la ruta de reparación de desapareamientos del DNA en organismos eucariotas.
- **MMR** "Mismatch Repair". Mecanismo de reparación de desapareamientos del DNA.
- **MSH2** "MutS homolog 2". Proteína implicada en la ruta de reparación de desapareamientos del DNA en organismos eucariotas.
- **MSH6** "MutS homolog 6". Proteína implicada en la ruta de reparación de desapareamientos del DNA en organismos eucariotas.
- **MSI** Inestabilidad de microsatélites.
- **MSI-H** Alta inestabilidad de microsatélites.
- **MSI-L** Baja inestabilidad de microsatélites.
- **MSS** Estabilidad de microsatélites.
- **MutH** Proteína implicada en la ruta de reparación de desapareamientos de DNA en organismos procariotas.
- **MutL** Proteína implicada en la ruta de reparación de desapareamientos de DNA en organismos procariotas.
- **MutL $\alpha$**  Complejo heterodimérico formado por proteínas de la ruta de reparación de desapareamientos del DNA en organismos eucariotas.
- **MutL $\beta$**  Complejo heterodimérico formado por proteínas de la ruta de reparación de desapareamientos del DNA en organismos eucariotas.
- **MutS** Proteína implicada en la ruta de reparación de desapareamientos de DNA en organismos procariotas.
- **MutS $\alpha$**  Complejo heterodimérico formado por proteínas de la ruta de reparación de desapareamientos del DNA en organismos eucariotas.

- **MutS $\beta$**  Complejo heterodimérico formado por proteínas de la ruta de reparación de desapareamientos del DNA en organismos eucariotas.
- **MYH** Homólogo de MutY. Implicado en la ruta de reparación del DNA por escisión de bases.
- **NCCN** "National Comprehensive Cancer Network".
- **NER** "Nucleotide excision repair". Mecanismo de reparación del DNA por escisión de nucleótidos.
- **OMS** Organización Mundial de la Salud.
- **p53** (TP53 "Tumor protein 53"). Proteína supresora de tumores que regula en ciclo celular.
- **PAF** Poliposis Adenomatosa Familiar.
- **PAFA** Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada.
- **PCR** "Polymerase chain reaction": Reacción en cadena de la polimerasa.
- **PMS1** "Postmeiotic segregation increased 1". Proteína implicada en la ruta de reparación de desapareamientos del DNA en organismos eucariotas.
- **PMS2** "Postmeiotic segregation increased 2". Proteína implicada en la ruta de reparación de desapareamientos del DNA en organismos eucariotas.
- **RER** "Replication Error".
- **RT** Radioterapia.
- **SEER** "Surveillance, Epidemiology, and End Results Program": Programa Americano de información estadística del cáncer.
- **SEOM** Sociedad Española de Oncología Médica.
- **SG** Supervivencia global.
- **SL** Síndrome de Lynch.
- **SLP** Supervivencia libre de progresión.
- **SNP** "Single nucleotide polymorphism". Variación en la secuencia del DNA que afecta a un solo nucleótido.
- **SPJ** Síndrome de Peutz-Jeghers.
- **TGF- $\beta$**  "Transforming growth factor beta".
- **THS** Terapia Hormonal Sustitutiva.
- **TNM** Sistema de clasificación y estadiaje basado en la situación del tumor (T), ganglios ("node":N) y metástasis (M).

## ANEXO 4: COMUNICACIONES EN CONGRESOS

### 1- INCORPORACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN LA DETECCIÓN DE FENOTIPO MUTADOR EN CÁNCER COLORRECTAL. Presentado en el I Simposium Nacional SEOM, celebrado en Madrid en Octubre de 2010.

#### INCORPORACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN LA DETECCIÓN DE FENOTIPO MUTADOR EN CÁNCER COLORRECTAL

##### AUTORES

R. Vidal Tocino, I. Martín García\*, R. Seijas Tamayo, A. Amores Martín, C. López Ordoñez, L. López Bernal, T. Martín Gómez, E. del Barco Morillo, R. González Sarmiento, JJ. Cruz Hernández.

Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca.

\*Servicio de Radiodiagnóstico. Hospital Virgen de la Concha. Zamora.

##### INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) representa el 15% de los diagnósticos de cáncer, siendo el tumor maligno más frecuente en nuestro país.

Las mutaciones o cambios epigenéticos en los genes que forman parte del sistema Mismatch Repair (MMR) provocan la aparición del denominado fenotipo mutador (RER+) y, son responsables del desarrollo de cáncer colorrectal (hereditario o esporádico), con implicaciones pronósticas y predictivas.

##### OBJETIVOS

- Detectar ausencia de expresión de los genes MLH1, MSH2 y MSH6, por medio de técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), en pacientes diagnosticados de CCR durante un año en el Hospital Universitario de Salamanca.
- Analizar características clínico-patológicas de los pacientes RER+.

##### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza análisis molecular por IHQ de la expresión proteica de los genes MMR a los pacientes con diagnóstico de CCR.

Se realiza una búsqueda de características clínico-patológicas de pacientes RER+ detectado por IHQ.

##### RESULTADOS

Se incluyen 110 pacientes, con una mediana de edad de 72,5 años y 54,5% varones.

El 18,8% presenta fenotipo mutador, RER+. Figura 1.

La edad mediana fue 72,5 años. 45% varones.

La localización proximal representa el 75%. El adenocarcinoma entérico predomina con 16 casos. 9 pacientes presentan grado 2. Un paciente presentó tumores sincrónicos en sigma. Se encontraron 19 alteraciones MLH1 frente a una MSH6.

Dos pacientes presentaron criterios clínicos de Síndrome de Lynch según Ámsterdam y uno más de Ámsterdam modificados. Criterios de Bethesda cumplían 8 pacientes. Figura 2.

##### CONCLUSIONES

1. El 18,8% presenta fenotipo mutador, RER+ detectado por técnicas de IHQ.
2. Predominantemente son ADC tipo entérico en colon proximal moderadamente diferenciado. Predomina ligeramente el sexo femenino, de edad mediana 72,5 años. El 40% presenta criterios clínicos de Síndrome de Lynch.

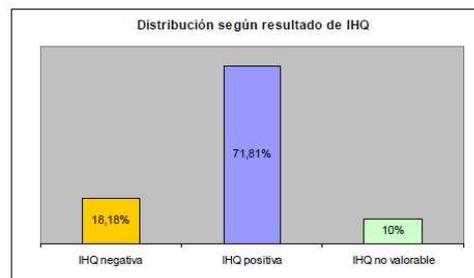


Figura 1

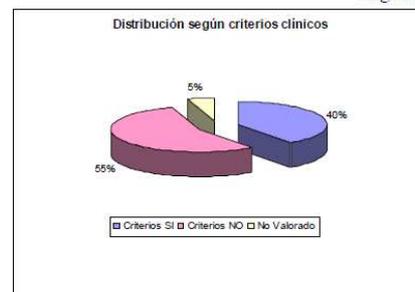


Figura 2



## 2- ANÁLISIS GENÉTICO DE SL EN UN MUESTRA DE PACIENTES CON CCR SELECCIONADA POR IHQ DE MMR. Presentado en el XIV Congreso Nacional SEOM, celebrado en Salamanca en Octubre de 2013.

### ANÁLISIS GENÉTICO DE SL EN UN MUESTRA DE PACIENTES CON CCR SELECCIONADA POR IHQ DE MMR

Rosario Vidal Tocino<sup>1,3</sup>; J. Pérez García<sup>2,3</sup>; E.M. Sánchez Tapia<sup>2,3</sup>; T. Martín Gómez<sup>1,3</sup>; L. Álvarez Macías<sup>2,3</sup>; R. González-Sarmiento<sup>2,3</sup>; J.J. Cruz Hernández<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitario de Salamanca. Servicio de Oncología Médica <sup>2</sup>Laboratorio 14. Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca <sup>3</sup>Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)

#### INTRODUCCIÓN

El síndrome de Lynch (SL) (OMIM: 114500) es el síndrome hereditario más frecuente de predisposición al cáncer colorrectal (CCR). Se define mediante la identificación de mutación en línea germinal de genes del sistema *mismatch repair* (MMR) en sujetos seleccionados mediante los criterios clínicos de Ámsterdam y/o Bethesda.

#### OBJETIVO

Análisis de los genes reparadores del ADN (sistema MMR) en pacientes con CCR y pérdida de expresión, por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), de alguna de las proteínas codificantes.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó IHQ de genes MMR a pacientes diagnosticados de CCR de Mayo/08 a Diciembre/11 en el HUSA. Se seleccionaron los pacientes con pérdida de expresión de alguna proteína y se hizo el análisis genético correspondiente, mediante PCR y secuenciación directa.

#### RESULTADOS

- Se detectaron 41 pacientes con pérdida de expresión de alguna de las proteínas codificantes de los genes MMR
- Obtuvimos DNA de 35 de ellos
- Los resultados de la IHQ fueron:
  - Pérdida de MLH1: 37 pacientes
  - Pérdida de MSH2/MSH6: 4 pacientes
- En base a la presencia de criterios de Ámsterdam y/o Bethesda, se clasificaron en pacientes con sospecha o no de SL
- Las alteraciones moleculares encontradas se describen en la tabla 1.
- Encontramos mutaciones patogénicas en 19% de pacientes con IHQ alterada y criterios de SL; no encontramos ninguna en sujetos sin criterios de SL
- Observamos una mayor frecuencia del polimorfismo c.655A>G (exón 8, MLH1) en pacientes que no cumplen criterios de SL. Tabla 2.

	CRITERIOS (n=16)	NO CRITERIOS (n=19)
<b>MLH1</b>		
IHQ ALT	13 (81.3%)	18 (94.7%)
SNPs	8 (61.5%)	11 (61.1%)
MutPatog	1 (7.7%)	0
<b>MSH2/MSH6</b>		
IHQ ALT	3 (18.7%)	1 (5.3%)
SNPs	2 (66.6%)	1 (100%)
MutPatog	2 (66.6%)	0

Tabla 1: alteraciones moleculares

SNPs MLH1	CRITERIOS (n=18)	NO CRITERIOS (n=19)
c.655A>G (exón 8)	4 (25%)	9 (47.4%)
c.678-65C>T (exón 9)	1 (6.3%)	2 (10.5%)
c.1558+14G>A (exón 13)	1 (6.3%)	1 (5.3%)
c.1668-19A>G (exón 15)	5 (31.3%)	5 (26.3%)
c.1732-59C>T (exón 16)	2 (12.5%)	1 (5.3%)

Tabla 2: análisis de polimorfismos



#### CONCLUSIÓN

1. Encontramos un porcentaje mayor de mutaciones patogénicas en pacientes con criterios de SL (19%) que lo reflejado en la literatura (8-12%) en pacientes preseleccionados por IHQ.
2. Confirmamos que el polimorfismo c.655A>G (exón 8, MLH1) es más frecuente en pacientes con CCR esporádico, lo que, teniendo en cuenta los datos publicados (Nargisse N, 2009), puede conferir un aumento de riesgo de padecer CCR en sujetos que lo porten.



