

**Universidad de Salamanca**

Facultad de Medicina.

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, MOLECULAR E  
INMUNOFENOTÍPICA DEL CÁNCER COLORRECTAL  
EN MENORES DE 45 AÑOS

Tesis doctoral presentada por José Perea García,  
licenciado en Medicina y Cirugía, para optar al grado de Doctor.

Salamanca, 2009.



Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Hospital Universitario Gregorio Marañón, de Madrid, y en el Hospital General de Segovia, con la colaboración del grupo de Genética Humana y en la Unidad de Cáncer Familiar del Programa de Genética del Cáncer Humana del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), bajo la dirección del doctor Miguel Urioste Azcorra, y la tutela del doctor Rogelio González Sarmiento, Director del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca.



A todos aquellos que me han enseñado a saborear  
los infinitos latidos de la vida.



# ÍNDICE.

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| ÍNDICE.....              | vii   |
| AGRADECIMIENTOS.....     | xiii  |
| ABREVIATURAS.....        | xv    |
| RELACIÓN DE TABLAS.....  | xix   |
| RELACIÓN DE FIGURAS..... | xxi   |
| RESUMEN.....             | xxiii |
| RESUMEN EN INGLÉS.....   | xxv   |

## I. INTRODUCCIÓN.....3

### 1. EL CÁNCER, UNA ENFERMEDAD GENÉTICA. EL CÁNCER FAMILIAR.....5

### 2. EL CÁNCER COLORRECTAL. GENERALIDADES.....7

|  |    |
|--|----|
| 2.1. Epidemiología.....  | 7  |
| 2.2. Etiología.....  | 9  |
| 2.3. Fisiopatología del Cáncer Colorrectal.....                | 10 |
| 2.3.1. Anatomía e histología del colon.....                    | 10 |
| 2.3.2. Mecanismo de generación del Cáncer Colorrectal.....     | 11 |
| 2.4. Secuencia adenoma-carcinoma. Pólipos colónicos.....       | 13 |
| 2.5. Diagnóstico.....  | 16 |
| 2.5.1. Diagnóstico en sujetos con sospecha clínica de CCR..... | 16 |
| 2.5.2. Cribado del CCR en nuestro medio.....                   | 19 |
| 2.6. Clasificación por estadios. Definiciones.....             | 19 |
| 2.7. Tratamiento.....  | 23 |
| 2.7.1. Tratamiento quirúrgico.....                             | 23 |
| 2.7.2. Tratamiento adyuvante.....                              | 26 |
| 2.7.3. Tratamiento paliativo.....                              | 28 |
| 2.8. Seguimiento.....  | 28 |

### 3. EL CÁNCER COLORRECTAL FAMILIAR.....30

|  |    |
|--|----|
| 3.1. Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP)..... | 30 |
| 3.1.1. Concepto y variantes.....                               | 30 |
| 3.1.2. Características clínicas.....                           | 31 |
| 3.1.3. Criterios clínicos.....                                 | 32 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1.4. Bases genéticas.....  | 35        |
| 3.1.4.1. Genes de reparación de los errores de emparejamiento del ADN..... | 35        |
| 3.1.4.2. Inestabilidad de microsatélites.....                              | 36        |
| 3.1.4.3. Diagnóstico molecular.....  | 38        |
| 3.1.5. Cribado del CCHNP.....  | 39        |
| 3.1.6. Tratamiento quirúrgico.....   | 39        |
| 3.2. Poliposis Adenomatosa Familiar.....                                   | 40        |
| 3.2.1. Concepto y variantes.....   | 40        |
| 3.2.2. Cribado de la Poliposis Adenomatosa Familiar.....                   | 41        |
| 3.2.3. Tratamiento de la afectación colorrectal.....                       | 42        |
| 3.3. Otros síndromes.....  | 42        |
| <br>   |           |
| <b>4. CÁNCER COLORRECTAL EN EL ADULTO JOVEN.....</b>                       | <b>43</b> |
| 4.1. Características clínicas.....   | 43        |
| 4.2. Características moleculares.....                                      | 44        |
| <br>   |           |
| <b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>                                  | <b>47</b> |
| <br>   |           |
| <b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>  | <b>51</b> |
| <br>   |           |
| <b>1. SUJETOS DEL ESTUDIO.....</b>   | <b>53</b> |
| 1.1. Procedencia.....  | 53        |
| 1.2. Información recogida.....   | 53        |
| 1.2.1. Información clínica.....  | 53        |
| 1.2.2. Información familiar.....   | 54        |
| <br>   |           |
| <b>2. MUESTRAS.....</b>  | <b>55</b> |
| 2.1. Líquidos biológicos.....  | 55        |
| 2.1.1. Sangre periférica.....  | 55        |
| 2.1.1.1. Extracción manual.....  | 56        |
| 2.1.1.2. Extracción automática.....  | 57        |
| 2.2. Tejido incluido en parafina.....                                      | 58        |
| 2.2.1. Tinción hematoxilina-eosina.....                                    | 58        |
| 2.2.2. Extracción de ADN.....  | 59        |
| <br>   |           |
| <b>3. VALORACIÓN DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN.....</b>                 | <b>60</b> |



|   |            |
|---|------------|
| <b>4. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TEJIDO TUMORAL...</b>   | <b>61</b>  |
| 4.1. Microsatélite BAT26.....   | 61         |
| 4.1.1. Reacción de PCR.....   | 61         |
| 4.1.2. Visualización.....   | 63         |
| <b>5. ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES DE REPARACIÓN DE LOS ERRORES DE EMPAREJAMIENTO DEL ADN (<i>MLH1</i>, <i>MSH2</i>).....</b> | <b>64</b>  |
| 5.1. Análisis de mutaciones en <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> .....  | 64         |
| 5.2. Análisis de grandes deleciones genómicas.....  | 69         |
| <b>6. CONSTRUCCIÓN DE MICROMATRICES DE TEJIDO.....</b>  | <b>73</b>  |
| <b>7. INMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>   | <b>75.</b> |
| 7.1. Selección de marcadores.....   | 77         |
| 7.1.1. Proteínas del sistema de reparación: Mlh1, Msh2, Msh6.....   | 78         |
| 7.1.2. Marcadores de ciclo celular, adhesión, proliferación, apoptosis, y otros.....  | 78         |
| 7.1.3. Valoración.....  | 78         |
| <b>8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>   | <b>84</b>  |
| <b>IV. RESULTADOS.....</b>  | <b>87</b>  |
| <b>1. RESULTADOS GLOBALES.....</b>  | <b>89</b>  |
| 1.1. Características anatómo-clínicas.....  | 89         |
| 1.2. Características familiares.....  | 98         |
| 1.3. Características moleculares.....   | 103        |
| 1.3.1. Inestabilidad de microsatélites.....   | 103        |
| 1.3.2. Análisis de los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> .....  | 104        |
| 1.3.3. Análisis inmunohistoquímico.....   | 106        |
| 1.3.3.1. Proteínas del sistema de reparación.....   | 106        |
| 1.3.3.2. Otros marcadores.....  | 108        |
| 1.4. Factores pronóstico. Análisis de supervivencia.....  | 111        |
| 1.4.1. Factores pronóstico.....   | 111        |
| 1.4.2. Análisis de supervivencia.....   | 114        |

|  |     |
|--|-----|
| <b>2. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS TUMORES ESTABLES (EMS) E INESTABLES (IMS)</b> .....      | 116 |
| 2.1. Características anatómo-clínicas.....   | 117 |
| 2.2. Características familiares.....   | 122 |
| 2.3. Características moleculares.....  | 126 |
| 2.3.1. Análisis inmunohistoquímico.....  | 126 |
| 2.3.1.1. Proteínas del sistema de reparación.....  | 127 |
| 2.3.1.2. Proteínas del ciclo celular.....  | 128 |
| 2.3.1.3. Otras proteínas.....  | 130 |
| 2.4. Factores pronóstico. Análisis de supervivencia.....                                     | 132 |
| 2.4.1. Tumores con IMS.....  | 132 |
| a) Factores pronóstico.....  | 132 |
| b) Análisis de supervivencia.....  | 134 |
| 2.4.2. Tumores con EMS.....  | 137 |
| a) Factores pronóstico.....  | 137 |
| b) Análisis de supervivencia.....  | 138 |
| <br>   |     |
| <b>3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS TUMORES PROCEDENTES DE MADRID Y LOS DE SEGOVIA</b> ..... | 139 |
| 3.1. Características anatómo-clínicas y familiares.....                                      | 139 |
| 3.2. Características moleculares.....  | 141 |
| <br>   |     |
| <b>V. DISCUSIÓN</b> .....  | 145 |
| <br>   |     |
| <b>1. EL CÁNCER COLORRECTAL EN EL ADULTO JOVEN</b> .....                                     | 147 |
| <br>   |     |
| <b>2. CARACTERÍSTICAS GLOBALES DEL CCR EN MENORES DE 45 AÑOS</b> .....                       | 149 |
| 2.1. Características anatómo-clínicas.....   | 149 |
| 2.1.1. Características clínicas.....   | 149 |
| 2.1.2. Características anatómo-patológicas.....  | 150 |
| 2.1.3. Estadificación tumoral.....   | 151 |
| 2.1.4. Seguimiento.....  | 153 |
| 2.1.5. Presencia de pólipos colónicos.....   | 154 |
| 2.1.6. Neoplasias sincrónicas y metacrónicas.....  | 155 |
| 2.2. Características familiares.....   | 156 |
| 2.3. Características moleculares.....  | 160 |
| 2.3.1. Inestabilidad de microsatélites (IMS).....  | 160 |

|   |            |
|---|------------|
| 2.3.2. Análisis de los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> .....  | 162        |
| 2.3.3 Análisis inmunohistoquímico.....  | 165        |
| a) Proteínas del sistema de reparación.....   | 165        |
| b) Otros marcadores.....  | 166        |
| 2.4. Factores pronóstico. Análisis de supervivencia.....  | 169        |
| <br>  |            |
| <b>3. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS CÁNCERES<br/>COLORRECTALES SEGÚN LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (IMS). ...</b> | <b>171</b> |
| 3.1. Características anatómo-clínicas.....  | 172        |
| 3.2. Características familiares.....  | 175        |
| 3.3. Características moleculares.....   | 176        |
| 3.4. Factores pronóstico.....   | 179        |
| 3.5. Resumen de las características diferenciales entre los tumores IMSy EMS en el adulto<br>joven.....                               | 182        |
| <br>  |            |
| <b>4. DIFERENCIAS GEOGRÁFICAS ENTRE LOS CÁNCERES COLORRECTALES.....</b>   | <b>183</b> |
| <br>  |            |
| <b>VI. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>185</b> |
| <br>  |            |
| <b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>189</b> |
| <br>  |            |
| <b>VIII. ANEXOS.....</b>  | <b>213</b> |



# AGRADECIMIENTOS

No quisiera personalizar en exceso a través de estas palabras porque en realidad aquellas personas a las que agradezco la parte de su vida que me regalan sin pedir nada a cambio saben que lo que les debo es mucho más un simple y sencillo gracias. Pero al menos, desearía que estas líneas sirvan para dejar testimonio de la esencia de esas personas, que salpican mi vida con su corazón.

A todos los que desde el punto de vista profesional me rodean y caminan junto a mí, y que conocen que por lo que luchamos por llevar adelante es muchísimo más que una profesión.

A Miguel Urioste, mucho más que Director, amigo. Aquí sí que faltan palabras para expresar todo el agradecimiento que siento, entre otras cosas por su paciencia, dedicación, ilusión... Y a Rogelio González, que un día, un cirujano de Madrid se le presentó para pedirle ayuda, y supo ver, y valorar, mucho más que la mayoría de los que hasta entonces se habían cruzado en mi camino vital.

A mi familia, pasado, presente y futuro de una vida que siempre les tendrá en sus palabras o silencios.

A mis amigos, esenciales.

Y a ti, que al leer estas palabras, estés donde estés, sabes que siempre formarás parte de mi corazón.



# ABREVIATURAS

- A: Adenina.
- AAS: Acido Acetilsalicílico.
- Abs: Absorbancia.
- A-C: clasificación de la estadificación tumoral de Astler-Coller.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- AINES: Antiinflamatorios No Esteroideos.
- AJCC: Comité Americano Conjunto del Cáncer. *American Joint Committee on Cancer*.
- APC: Gen causal de la poliposis adenomatosa familiar. *Adenomatous Polyposis Coli*.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
- ASCO: American Society of Clinical Oncology.
- c: Codón.
- C: Citosina.
- CR: Cáncer de Recto.
- CCHNP: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico.
- CEA: Antígeno Carcinoembrionario.
- CK20: Citoqueratina 20.
- CIMP: Fenotipo mutador. CpG island methylator phenotype.
- cm: Centímetro.
- CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.
- DME: Medio de cultivo celular modificado del medio de Dulbecco. *Dulbecco's Modified Eagle*.
- dATP: Desoxiadenosina trifosfato.
- DCC: gen Delecionado en Cáncer de Colon.
- dCTP: Desoxicitidina trifosfato.
- DE: Desviación estándar.
- del: Delección
- dup: Duplicación

- dGTP: Desoxiguanosina trifosfato.
- dHPLC Cromatografía líquida de alto rendimiento. *Denaturing high performance liquid chromatography*.
- dNTP: Desoxirribotrinucleótido trifosfato.
- dTTP: Desoxitimidina trifosfato.
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- EEUU: Estados Unidos de América
- EMS: Estabilidad de microsátélites.
- ESMO: European Society of Medical Oncology.
- ETM: Exéresis del Mesorrecto.
- Fase G1: Fase *Gap1*. Periodo que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN.
- Fase G2: Fase *Gap2*. Segunda fase de crecimiento del ciclo celular en la que continúa la duplicación de proteínas y ARN.
- Fase M: Fase de mitosis o de división celular.
- Fase S: Fase de síntesis o replicación del ADN.
- g: gramo.
- G: Guanina.
- HE: Hematoxilina-eosina.
- HGM: Hospital Gregorio Marañón.
- HNPCC: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP). *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*.
- IHQ: Inmunohistoquímica.
- INC: Inestabilidad Cromosómica.
- INE: Instituto Nacional de Estadística.
- IMS: Inestabilidad de microsátélites.
- l: Litro.
- LV: Leucovorín.
- M: Molar.
- mM: Milimolar.



- ml: Mililitro.
- MLPA: PCR *multiplex* dependiente de ligación. *Multiplex ligation-dependent probe amplification*.
- MMR: Reparación de los errores de emparejamiento. *Mismatch Repair*.
- $\mu$ l: Microlitro.
- ng: Nanogramo.
- NCCN: National Comprehensive Cancer Network.
- NCI: National Cancer Institute.
- nm: Nanómetro.
- NS: No estadísticamente significativo.
- PAF: Poliposis adenomatosa familiar.
- pb: Pares de bases.
- PBS: Tampón fosfato salino. *Phosphate Buffered Saline*.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. *Polymerase chain reaction*.
- PET: Tomografía por Emisión de Positrones.
- RB: Proteína del Retinoblastoma.
- RB-P: Proteína del Retinoblastoma fosforilada.
- RNM: Resonancia Nuclear Magnética.
- rpm: Revoluciones por minuto.
- RR: Riesgo Relativo.
- RT: Radiografía de tórax.
- SDS: Sodio dodecil sulfato.
- SG: Supervivencia Global.
- SEG: Segovia.
- SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad.
- SOH: Sangre Oculta en Heces.
- T: Timina.
- TAC: Tomografía Axial Computerizada.
- TBE: Tris, ácido bórico y EDTA.
- TE: Tris-EDTA.

- TEAA: Acetato de trietilamonio.
- TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento tumoral beta. *Tumour growth factor*.
- U: Uracilo.
- 5-FU: 5-Fluorouracilo.
- W: Watio.

Tabla de abreviaturas de los aminoácidos

| Aminoácido      | Abreviatura de tres letras | Símbolo de una letra |
|-----------------|----------------------------|----------------------|
| Alanina         | Ala                        | A                    |
| Arginina        | Arg                        | R                    |
| Asparragina     | Asn                        | N                    |
| Ácido aspártico | Asp                        | D                    |
| Cisteína        | Cys                        | C                    |
| Glutamina       | Gln                        | Q                    |
| Ácido glutámico | Glu                        | E                    |
| Glicina         | Gly                        | G                    |
| Histidina       | His                        | H                    |
| Isoleucina      | Ile                        | I                    |
| Leucina         | Leu                        | L                    |
| Lisina          | Lys                        | K                    |
| Metionina       | Met                        | M                    |
| Fenilalanina    | Phe                        | F                    |
| Prolina         | Pro                        | P                    |
| Serina          | Ser                        | S                    |
| Treonina        | Thr                        | T                    |
| Triptófano      | Trp                        | W                    |
| Tirosina        | Tyr                        | Y                    |
| Valina          | Val                        | V                    |

# RELACIÓN DE TABLAS

|  |       |
|--|-------|
| <b>Tabla I.1.</b> Características diferenciadoras entre los CCR que presentan inestabilidad cromosómica e inestabilidad de microsatélites.   | p.13  |
| <b>Tabla I.2.</b> Clasificación de los pólipos gastrointestinales.   | p.15  |
| <b>Tabla I.3.</b> Clasificaciones para el CCR.   | p.22  |
| <b>Tabla I.4.</b> Protocolo de seguimiento del CCR.  | p.30  |
| <b>Tabla I.5.</b> Criterios clínicos del síndrome de Lynch.  | p.34  |
| <b>Tabla III.1.</b> Estudio de mutaciones del gen <i>MLH1</i> . Cebadores empleados para la amplificación de los exones y regiones intrónicas adyacentes, tamaños de los fragmentos amplificados en pares de bases y condiciones desnaturalizantes de los geles. | p.66  |
| <b>Tabla III.2.</b> Estudio de mutaciones del gen <i>MSH2</i> . Cebadores empleados para la amplificación de los exones y regiones intrónicas adyacentes, tamaños de los fragmentos amplificados en pares de bases y condiciones desnaturalizantes de los geles. | p.67  |
| <b>Tabla III.3.</b> Sondas utilizadas en el producto comercial de MLPA, SALSA P003 <i>MLH1/MSH2</i> , para la detección de grandes reordenamientos de los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> .  | p.70  |
| <b>Tabla III.4.</b> Anticuerpos utilizados, casas comerciales, clones y diluciones utilizadas para realizar la técnica de inmunohistoquímica en cortes de tejido incluido en parafina.   | p.77  |
| <b>Tabla III.5.</b> Marcadores moleculares relacionados con el ciclo celular seleccionados para el estudio inmunohistoquímico en las matrices de tejido.   | p.80  |
| <b>Tabla III.6.</b> Otros marcadores moleculares seleccionados para el estudio inmunohistoquímico en las matrices de tejido.   | p.82  |
| <b>Tabla IV.1.</b> Edad media al diagnóstico del CCR y distribución de sexos.  | p.89  |
| <b>Tabla IV.2.</b> Localización del CCR y técnicas quirúrgicas utilizadas.   | p.91  |
| <b>Tabla IV.3.</b> Características histológicas de los CCR.  | p.92  |
| <b>Tabla IV.4.</b> Estadificación tumoral. Afectación ganglionar y a distancia.  | p.93  |
| <b>Tabla IV.5.</b> Seguimiento de los pacientes.   | p.95  |
| <b>Tabla IV.6.</b> Presencia y tipos de pólipos detectados a lo largo de la evolución.   | p.97  |
| <b>Tabla IV.7.</b> Tabla resumen de las características generales y anatómicas.  | p.98  |
| <b>Tabla IV.8.</b> Relación de los diferentes tumores relacionados con el síndrome de Lynch, y su frecuencia de aparición en las diferentes familias.  | p.101 |
| <b>Tabla IV.9.</b> Relación de los diferentes tumores no asociados con el síndrome de Lynch, y su distribución en los diferentes tipos de familias.  | p.102 |
| <b>Tabla IV.10.</b> Distribución de los pacientes según la presencia de inestabilidad de microsatélites en el CCR.   | p.104 |
| <b>Tabla IV.11.</b> Mutaciones identificadas en los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> .  | p.106 |
| <b>Tabla IV.12.</b> Resultados del análisis inmunohistoquímico de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento.  | p.107 |
| <b>Tabla IV.13.</b> Resultados del análisis inmunohistoquímico de los marcadores de ciclo celular.   | p.108 |
| <b>Tabla IV.14.</b> Resultados del análisis inmunohistoquímico de los marcadores moleculares de adhesión, proliferación, apoptosis y otros procesos celulares.   | p.110 |

|  |       |
|--|-------|
| <b>Tabla IV.15.</b> Relación de variables discretas con posible valor pronóstico, en relación con la mortalidad y la aparición de recidiva tumoral.  | p.112 |
| <b>Tabla IV.16.</b> Relación de los estadios tumorales con la mortalidad y la aparición de recidiva tumoral.   | p.113 |
| <b>Tabla IV.17.</b> Edad media al diagnóstico del CCR y distribución por sexos.  | p.117 |
| <b>Tabla IV.18.</b> Localización del CCR e intención quirúrgica en los tumores IMS y EMS.  | p.118 |
| <b>Tabla IV.19.</b> Comparación de las características histopatológicas de los IMS y EMS.  | p.119 |
| <b>Tabla IV.20.</b> Estadificación tumoral de los tumores IMS y EMS.   | p.120 |
| <b>Tabla IV.21.</b> Seguimiento de los pacientes: Supervivencia, mortalidad, recidiva y tipo de recidiva.  | p.121 |
| <b>Tabla IV.22.</b> Tipos de pólipos detectados a lo largo de la evolución.  | p.122 |
| <b>Tabla IV.23.</b> Antecedentes oncológicos familiares.   | p.123 |
| <b>Tabla IV.24.</b> Relación de los diferentes tumores relacionados con el síndrome de Lynch aparecidos en familiares.   | p.124 |
| <b>Tabla IV.25.</b> Descripción de los diferentes tumores no asociados con el síndrome de Lynch que presentaron los familiares de los <i>probandi</i> con tumores IMS y EMS.   | p.125 |
| <b>Tabla IV.26.</b> Resumen de datos anatómico-clínicos y familiares en los grupos IMS y EMS.  | p.126 |
| <b>Tabla IV.27.</b> Resultados del análisis de la expresión inmunohistoquímica de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento (proteínas MMR).  | p.127 |
| <b>Tabla IV.28.</b> Estudio comparativo entre los tumores con IMS y EMS según la expresión de los marcadores de ciclo celular.   | p.129 |
| <b>Tabla IV.29.</b> Comparación de la expresión inmunohistoquímica de marcadores de adhesión, proliferación, apoptosis y otros procesos celulares, entre los tumores con IMS y con EMS.                                | p.131 |
| <b>Tabla IV.30.</b> Relación de variables discretas con posible valor pronóstico, en relación con la mortalidad y la aparición de recidiva tumoral, para los casos que presentaron IMS.                                | p.133 |
| <b>Tabla IV.31.</b> Relación de las variables discretas que presentan significación estadística en el análisis de supervivencia para los casos que presentaron IMS.  | p.134 |
| <b>Tabla IV.32.</b> Relación de variables discretas con posible valor pronóstico, en relación con la mortalidad y la aparición de recidiva tumoral, para los casos que presentaron EMS.                                | p.137 |
| <b>Tabla IV.33.</b> Relación de variables discretas que presentan significación estadística en el análisis de supervivencia.   | p.138 |
| <b>Tabla IV.34.</b> Resumen de la comparación de las características anatómico-clínicas y familiares entre los CCR del Hospital Gregorio Marañón (HGM), de Madrid, y del Hospital de Segovia (SEG).                    | p.140 |
| <b>Tabla IV.35.</b> Estudio comparativo de los tumores de Madrid (HGM) y de Segovia (SEG) teniendo en cuenta la expresión de los marcadores de ciclo celular analizados en el presente estudio.                        | p.141 |
| <b>Tabla IV.36.</b> Comparación de la expresión inmunohistoquímica de marcadores de adhesión, proliferación, apoptosis y otros procesos celulares, entre los tumores de las procedencias referidas en la tabla previa. | p.142 |

# RELACIÓN DE FIGURAS

|  |       |
|--|-------|
| <b>Figura I.1.</b> Principales procesos moleculares que intervienen en la carcinogénesis.  | p. 6  |
| <b>Figura I.2.</b> Incidencia de cáncer en la Unión Europea, año 2004.   | p. 8  |
| <b>Figura I.3.</b> Mortalidad estimada por cáncer en la Unión Europea, año 2004.   | p. 8  |
| <b>Figura I.4.</b> Esquema simplificado de la secuencia adenoma-carcinoma y de la acumulación de mutaciones más importantes.   | p.12  |
| <b>Figura I.5.</b> Imagen endoscópica de pólipo adenomatoso.   | p.14  |
| <b>Figura I.6.</b> Imagen del rectosigmoidoscopio.   | p.17  |
| <b>Figura I.7.</b> TAC abdominal, en el que se identifican las metástasis de un CCR.   | p.18  |
| <b>Figura I.8.</b> Estadificación sucesiva mediante ecografía endorrectal preoperatoria de diferentes cánceres de recto según el crecimiento en el espesor de la pared, desde uT0 hasta uT4, en que hay infiltración prostática. | p.18  |
| <b>Figura I.9.</b> Clasificación por estadios del CCR según la afectación de la pared del colon; ganglios y órganos a distancia.   | p.22  |
| <b>Figura I.10.</b> Consideraciones especiales de la cirugía del CR, como son el plexo sacro y los vasos iliacos, así como la excisión del mesorrecto.   | p.25  |
| <b>Figura I.11.</b> Mecanismo de acción del sistema de reparación de los errores de emparejamiento del ADN humano.   | p.35  |
| <b>Figura I.12.</b> Secuencia de microsatélites donde surge la alteración o no según el estado del sistema MMR.  | p.37  |
| <b>Figura III.1.</b> Resultado del estudio de IMS de BAT26 visualizado mediante <i>GeneScan 3.5</i> .  | p.63  |
| <b>Figura III.2.</b> Micromatriz de tejido.  | p.73  |
| <b>Figura III.3.</b> Tinción HE de una sección de una de las matrices de tejido incluida en el estudio.  | p.74  |
| <b>Figura IV.1.</b> Distribución de los CCR por edad de diagnóstico.   | p.90  |
| <b>Figura IV.2.</b> Árbol de una familia Ámsterdam I positiva.   | p.100 |
| <b>Figura IV.3.</b> Árbol de una familia con múltiples neoplasias no relacionadas con el síndrome de Lynch.  | p.103 |
| <b>Figura IV.4.</b> Resultado del estudio de los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> en los pacientes con tumores IMS  | p.105 |
| <b>Figura IV.5.</b> Curva de supervivencia en relación con la expresión de la $\beta$ -catenina.   | p.115 |
| <b>Figura IV.6.</b> Curvas de supervivencia en relación a la estadificación del CCR.   | p.116 |
| <b>Figura IV.7.</b> Curvas de supervivencia en relación a la estadificación de los CCR que presentan IMS.  | p.135 |
| <b>Figura IV.8.</b> Curvas de supervivencia para las variables producción de moco y presencia o ausencia de ciclina D1.  | p.136 |



## RESUMEN

El Cáncer Colorrectal (CCR) de aparición precoz es relativamente infrecuente, con una incidencia del 2-8%. Este grupo de edad presenta un abanico heterogéneo de casos, desde aquellos con una agregación familiar importante para el CCR, hasta otros que son esporádicos. Parecen presentar características distintivas con respecto a aquellos que aparecen a edad más avanzadas, con una mayor frecuencia de localización en el colon derecho, bajo grado de diferenciación, mucinosos, presencia de tumores sincrónicos y metacrónicos, así como el estadio avanzado en el que suelen diagnosticarse. Una proporción de ellos presentan características similares a las de los CCR que suceden en el seno del síndrome de Lynch, manifestando a su vez la Inestabilidad de Microsatélites (IMS) en el tumor, siendo una parte importante de ellos portadores de mutaciones a nivel germinal en los genes del sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN (MMR). El segundo grupo, aquellos con Estabilidad de Microsatélites (EMS), poseerían un predominio de la vía de la Inestabilidad Cromosómica, equivalente a aquellos CCR esporádicos de edad más avanzada. Sin embargo, la caracterización del CCR en el adulto joven no está todavía del todo definida, tanto desde el punto de vista anatómico-clínico como molecular, siendo necesario caracterizarlos con respecto a aquellos CCR que aparecen en el síndrome de Lynch y frente al CCCR que aparece de forma esporádica en el anciano.

En el presente trabajo se han valorado 45 individuos que presentaron CCR a una edad igual o menor de 45 años, diagnosticados en dos instituciones hospitalarias diferentes de dos áreas geográficas distintas. En cuanto a las características del grupo en global, una proporción importante de los tumores se presentaron a nivel del colon derecho (44,4%), un predominio de tumores de moderado grado de diferenciación, pero con un porcentaje de tumores productores de moco a considerar (24,4%). Un tercio de ellos desarrollaron pólipos en su evolución. Destaca el diagnóstico tardío del CCR en este grupo de edad, con un 55,5% de los mismos que se presentaron en estadios avanzados de la enfermedad. El 40% de los casos mostró agregación familiar de CCR o neoplasias asociadas al síndrome de Lynch.

Llama la atención que más de la mitad de los casos fueron diagnosticados en estadios avanzados (55,5%), presentando este aspecto, el retraso en el diagnóstico, un peso importante en el pronóstico de los mismos. Otros aspectos parecen asociar también un mal pronóstico, como sería la localización izquierda a nivel del colon, o en principio, la activación de la ruta Wnt, o la falta de expresión de la ciclina E en los tumores.

Desde el punto de vista molecular, el 31% de los tumores presentó IMS, siendo el 61% de estos, consecuencia de mutaciones germinales en *MLH1* y *MSH2*. Estos tumores presentaron ciertas características diferenciales, como fueron la edad de diagnóstico es más precoz, o la presencia mayor número de antecedentes familiares neoplásicos. También parecen tener un mejor pronóstico, aunque en un subgrupo de ellos, esto no se cumple (aquellos con células en "anillo de sello" o con falta de expresión de p53).

Desde el punto de vista de la selección de los pacientes candidatos para el estudio de los genes de reparación, la inestabilidad de microsatélites con Bat26 y la inmunohistoquímica de las proteínas de reparación serían herramientas útiles.

A la hora de aplicar los hallazgos en este tipo de tumores en el manejo terapéutico y de seguimiento del CCR en este grupo de edad, hay que considerar la asociación de pólipos y como la frecuencia de neoplasias sincrónicas y metacrónicas (6,7%), y por tanto, condicionan la necesidad de un seguimiento especial, de igual modo que las técnicas quirúrgicas, que en algunos casos serán más extensas que las llevadas a cabo en el CCR esporádico en el anciano.



## SUMMARY

Early-onset colorectal cancer is not frequent, with an incidence rate of 2-8%. It is a very heterogeneous group: some of them are sporadic, and others are hereditary forms. They also have some characteristics which are different from the common forms of colorectal cancer, such as: proximal site at colon, a significant excess of synchronous and metachronous CRCs, more often poorly differentiated, with an excess of mucoid, and an advanced stage at diagnosis. Some of them have similar behaviour than Lynch syndrome's CRC, and microsatellite instability as their molecular basis the tumour too. A significant part of this group has a MMR germline mutation. There is another group with microsatellite stability, which shows chromosomal instability, a similar form of CRC as the CCR in older ages. Nevertheless, there are a lot of molecular, anatomical and clinical characteristics that must need to be studied, in order to classify them in a similar way as Lynch syndrome or as a non hereditary CRC forms.

We review 45 patients with CRC being diagnosed at 45 years old or younger, in two different hospitals, in two different geographic areas. The global characteristics were: a significant group has CRC in the right colon (44%), an important group with medium differentiated tumours, some of them had an excess of mucoid (24, 4%). The 33,3 % of them had polyps in their evolution. A very important fact, is that the 55,5% of them, had been diagnosed at an advanced stage. Some of them had hereditary familial cancer, or another cancer associated with Lynch syndrome (40%).

We found some items associated with a worst prognosis, such as: left location tumours, an advanced stage, the activation of the Wnt way, or the lack of expression of cyclin E in the tumours.

The 31% of the patients presents microsatellite instability, and the 61% of them had MMR germline mutations in *MLH1* and *MSH2*. These tumours had some different characteristics from the others: an early age of onset and a larger cancer history in family members. They seem to have a better prognosis, except the patients with signet-cell or an unexpression of p53.

In order to find out which patients are candidates of MMR germline mutations study, microsatellite instability with Bat 26 and the immunohistochemistry of the mismatch repair proteins are both useful tools to carry it out.

We must conclude that the behaviour of this CRC seem to be different, with more polyps in the evolution and more synchronous and metachronous tumours. Thus, we must follow up in a special way these patients, and perhaps, we may do a more extensive resective surgery.



# **I. INTRODUCCIÓN**



# I. INTRODUCCIÓN.

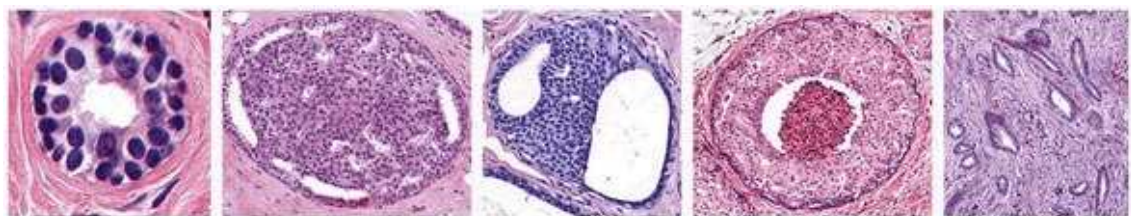
## 1. EL CÁNCER, UNA ENFERMEDAD GENÉTICA. EL CÁNCER FAMILIAR.

El cáncer se caracteriza por un crecimiento excesivo y descontrolado de un grupo de células que invaden y dañan tejidos y órganos. Es una de las causas más frecuentes de mortalidad, ocupando el segundo lugar en los países desarrollados detrás de las enfermedades cardiovasculares. El cáncer es el resultado de dos procesos: el aumento de la proliferación de células formando un tumor o neoplasia y la posterior adquisición por parte de éstas de la capacidad invasiva, lo que les permite migrar desde su lugar de origen a otros tejidos u órganos, dando lugar a las metástasis. La carcinogénesis es un proceso complejo que implica un gran número de alteraciones moleculares, dando como consecuencia la gran heterogeneidad y variabilidad morfológica y pronóstica de los tumores (Pharoah and Caldas 1999).

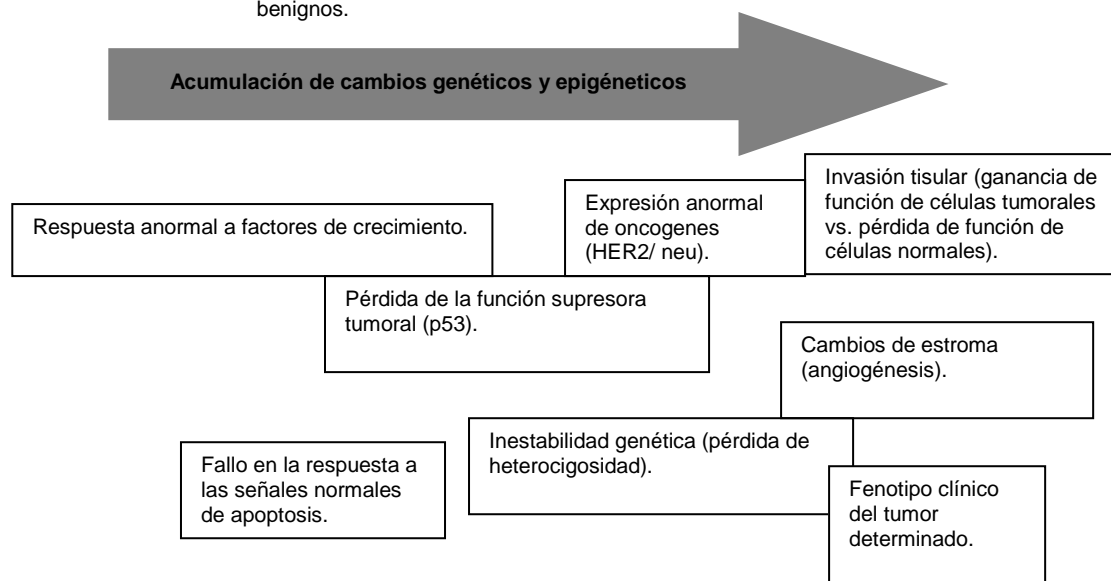
La formación de un tumor consiste en la acumulación de múltiples alteraciones en el genoma de las células que lo forman. Existen dos tipos de alteraciones: cambios en la secuencia del ADN y cambios epigenéticos que afectan a la expresión de los genes. Las alteraciones a nivel de la secuencia abarcan deleciones de regiones cromosómicas, que implican pérdida de genes que pueden estar relacionados con la regulación negativa del ciclo celular (genes supresores de tumores); mutaciones génicas que pueden activar o inactivar distintas proteínas; amplificaciones génicas que conllevan la sobreexpresión de genes específicos; e incluso pérdidas o ganancias de cromosomas enteros. En relación a las alteraciones epigenéticas se encuentran, entre otros, el silenciamiento de genes debido a hipermetilación de las islas CpG localizadas en sus promotores, como en casos del gen *MLH1* o el gen *BRCA1*. En la figura I.1 se representan algunos de los mecanismos moleculares asociados a la formación y progresión tumoral.

La mayoría de los cánceres son consecuencia de mutaciones a nivel somático, que ocurren en el tejido que da lugar a la neoplasia. Sin embargo, entre un 5 y un 10% de todos los cánceres tiene un componente hereditario cuyo origen son mutaciones germinales que contribuyen al inicio de la carcinogénesis (de la Chapelle 2004). El individuo que hereda la mutación la presentará en todas las células de su organismo y tendrá una alta probabilidad de desarrollar una neoplasia.

El desarrollo del cáncer es debido a dos clases diferentes de genes: oncogenes y genes supresores de tumores. Los primeros son variantes alteradas de genes principalmente implicados en el crecimiento y proliferación celular. Los genes supresores de tumores se clasifican a su vez en “porteros” (*gatekeepers*) y “guardianes” (*caretakers*). Los porteros son genes que inhiben el crecimiento celular o promueven la apoptosis. Los segundos, sin embargo, cuando se encuentran inactivos no intervienen directamente en el crecimiento del tumor sino que dan lugar a la inestabilidad genómica y, por lo tanto, a un aumento general de la velocidad de mutación y al desarrollo del cáncer (Kinzler and Vogelstein 1997). La existencia de cualquier alteración de algún gen de cualquiera de estos tres grupos da como consecuencia un incremento del riesgo de desarrollar uno o más cánceres (Offit 1998).



Luz glandular normal. Cambios proliferativos benignos. Hiperplasia atípica. Carcinoma in situ. Carcinoma invasor.



**Figura I.1:** Principales procesos moleculares que intervienen en la carcinogénesis. Modificado de Fearon y Vogelstein, 1990.

En el caso de los síndromes de cáncer hereditario, la mayoría de los genes cuyas mutaciones son las responsables de los mismos son genes supresores “porteros” (Knudson 2002). Tienen una penetrancia y un modo de transmisión variables, por lo

que su manejo clínico requiere la evaluación individual del riesgo para cada miembro de la familia afectada.

Las características diferenciadoras del cáncer hereditario, frente al que ocurre de forma esporádica son:

- una edad de aparición temprana,
- multifocalidad de los tumores o bilateralidad en caso de órganos pares,
- aparición de varios tumores primarios en el mismo individuo,
- antecedentes familiares de la misma neoplasia,
- alta incidencia de cáncer dentro de la familia,
- asociación con sobre-crecimiento corporal generalizado o asimétrico, dismorfias, malformaciones congénitas o retraso mental.

La aparición de alguna de las mencionadas características en la práctica clínica ha de servir para alertar sobre la posibilidad de un caso de cáncer hereditario y, por tanto, sobre la necesidad de remitir a la familia a un servicio de genética especializado en cáncer familiar. A este respecto, la edad temprana de aparición del cáncer es una de ellas, aunque no todos los tumores que aparecen en personas jóvenes van a tener un carácter hereditario.

## 2. EL CÁNCER COLORRECTAL. GENERALIDADES

### 2.1. Epidemiología.

El cáncer colorrectal (CCR) es la cuarta forma más común de cáncer en el mundo y la tercera causa de mortalidad por cáncer en los países desarrollados, mostrando un riesgo acumulado de un 2-6% en la población general. En personas con historia familiar de CCR este riesgo es mayor, en especial en aquellos que forman parte de familias con síndromes hereditarios (Pinol et al. 2004). El CCR afecta prácticamente igual a hombres y a mujeres. Se estima que ocurren 394.000 muertes anuales por cáncer colorrectal en el mundo (Hobbs et al. 2001). En las Figuras I.2 y I.3, se presenta la incidencia de los distintos tipos de cáncer y la mortalidad estimada por cáncer, respectivamente, en la Unión Europea en el año 2004. Los últimos datos publicados, de 2006, recogen en Europa una incidencia de 217.000 en hombres y

195.000 en mujeres, ocupando el segundo lugar tanto en incidencia como en mortalidad por cáncer (Ferlay et al. 2007)

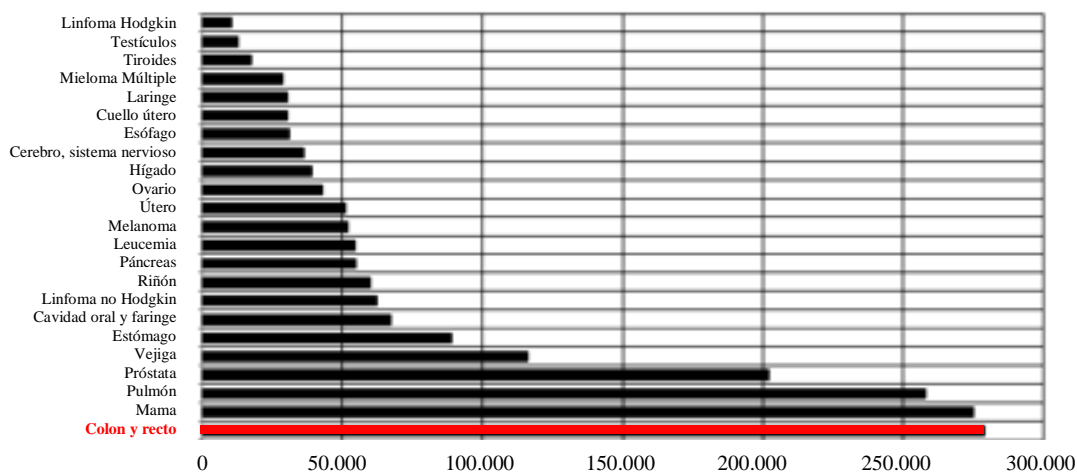


Figura I.2. Incidencia de cáncer en la Unión Europea, año 2004 (Boyle and Ferlay 2005).

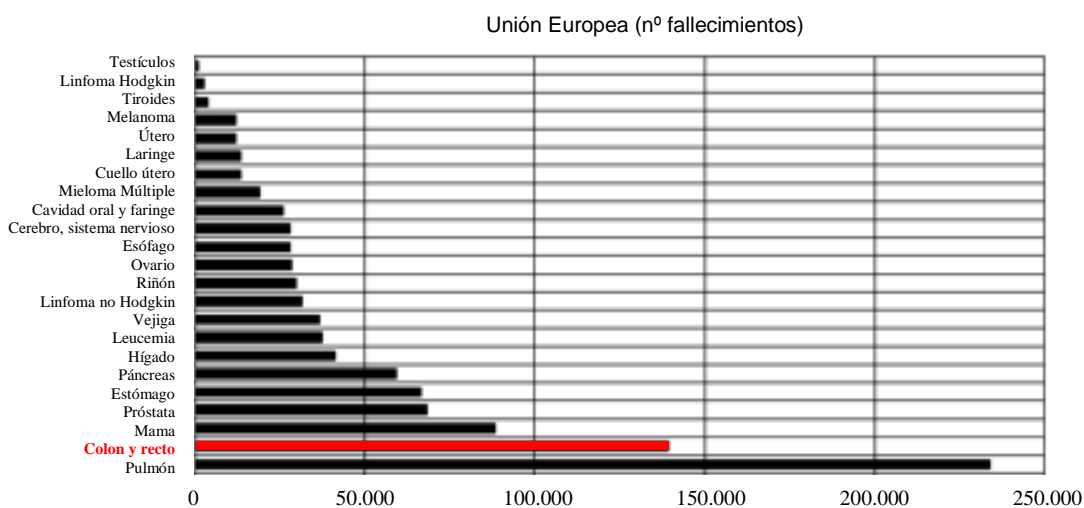


Figura I.3. Mortalidad estimada por cáncer en la Unión Europea, año 2004 (Boyle and Ferlay 2005).

En España, el número estimado de casos nuevos de CCR al año se sitúa en torno a los 21.000 entre ambos sexos, frente a las 11.900 defunciones. Fue el causante del 11% de las defunciones por cáncer en hombres y el 15% en mujeres, según datos de 2000 [WHO-IARC 2002]. Comparativamente con el resto de países de Europa, la mortalidad e incidencia en España es sustancialmente menor que en los países del norte de Europa, con unas tasas en 1999 menores que las tasas promedio de Europa, aunque con una tendencia temporal en aumento [WHO-IARC 2002]. En la Unión Europea las tasas más bajas de mortalidad corresponden a Grecia, Finlandia, Suecia, Italia y España y las más altas a Dinamarca, Alemania, Irlanda y Austria. La variabilidad provincial de la



mortalidad en España es muy baja y similar en ambos sexos (López-Abente et al. 2002). A pesar de todo lo dicho, la supervivencia parece haber aumentado, posiblemente debido a un diagnóstico precoz y a la mejora de las estrategias terapéuticas, así como en la identificación de grupos de riesgo para el CCR (López-Abente et al. 2002).

## **2.2. Etiología.**

El CCR es una enfermedad de base genética, en la que los factores ambientales tienen una influencia esencial en su aparición (Hobbs et al. 2001). Una confirmación de este último extremo la encontramos en el cambio de estilo de vida al que se ven sometidos algunos inmigrantes, que con el cambio geográfico a su vez también lo sufren en cuanto al riesgo de cáncer, perdiendo rápidamente el asociado al de la comunidad de origen, y adquiriendo el de la receptora.

La vertiente genética del CCR influye en parte en que el riesgo se vea aumentado conforme la edad avanza, al igual que en aquellas personas con historia personal o familiar de CCR. En este último caso, es más marcada la asociación en individuos que pertenecen a familias con síndromes hereditarios asociados al desarrollo de este tipo de neoplasias, como pueden ser la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF), el síndrome de Lynch, síndrome de Peutz-Jeghers, o la Poliposis juvenil.

Dentro de los factores ambientales poseen cierta relevancia los dietéticos, estando el riesgo aumentado en relación al bajo consumo de fibra. El incremento del riesgo también se ha asociado con el tabaco, el alcohol, escaso ejercicio físico, y un índice de masa corporal alto (Willett et al. 1990; Boyle 1995; Hobbs et al. 2001).

Sin embargo, los datos acerca de los factores ambientales como causa directa del CCR no tienen la suficiente consistencia como para fijar unas directrices claras sobre la prevención primaria del mismo. No obstante, se ha recomendado moderar el consumo de carne roja, procesada o cocinada muy hecha o en contacto con el fuego. Por su parte, una dieta rica en leche y otros productos lácteos pueden servir para la prevención del CCR; y las dietas ricas en fibra, vegetales y fruta actúan en la misma dirección. Sin embargo, no se recomienda la administración de folatos, calcio y vitamina D en la

prevención, ni tampoco betacarotenos, selenio, ni vitaminas A, B, C o E. En cuanto a los estilos de vida, se recomienda la realización de ejercicio físico, y evitar el sobrepeso y la obesidad, así como el consumo de alcohol y tabaco. La quimioprevención, como los AINES, o el AAS a dosis baja, no está admitida en la población general (Castells y Marzo 2004).

La enfermedad inflamatoria intestinal en sus dos variantes, la enfermedad de Crohn y la Colitis ulcerosa, también aumentan el riesgo de desarrollar CCR, en especial esta última.

## **2.3 Fisiopatología del Cáncer Colorrectal.**

### **2.3.1. Anatomía e histología del colon.**

El intestino grueso o colon se extiende desde el ciego hasta el ano, y su longitud es de aproximadamente 150 cm. Se divide clásicamente en varias partes: ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, sigma y recto. A excepción de la parte final del recto, que es extraperitoneal, el intestino grueso está situado en el peritoneo y en su disposición forma dos flexuras, hepática y esplénica, de casi 90°. En comparación con el intestino delgado, el grueso posee un diámetro mayor y la mucosa no forma pliegues, a excepción de la última porción del recto.

La mucosa es lisa y revestida de células mucosecretoras y células cilíndricas de absorción con microvellosidades en polo apical. Las glándulas de Lieberkühn son más profundas y en su parte inferior, criptas, contienen abundantes células caliciformes, argentafines e indiferenciadas o células madre. La lámina propia presenta linfocitos eosinófilos y células plasmáticas, y de forma dispersa aparecen folículos linfoides. La submucosa es similar a la del intestino delgado; grupos de neuronas y haces nerviosos forman el plexo submucoso de Meissner, y la muscular (músculo liso) difiere en la disposición de las fibras musculares de la capa externa, que, excepto en el recto, que mantiene su disposición continua, forman tres haces longitudinales llamadas tenias. Entre las fibras musculares se constituye el plexo mioentérico de Auerbach (Paz Bouza 1990).

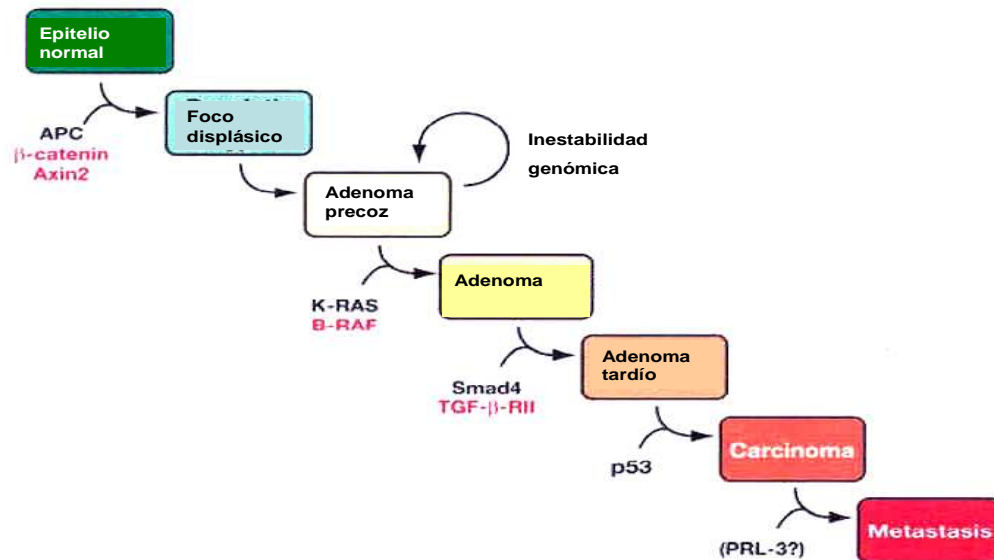
Las células madre o progenitores de las criptas se dividen a un ritmo muy alto, llegando a generar hasta 200 células al día. Al poseer un fenotipo indiferenciado, son capaces de producir de forma continuada todas las estirpes celulares así como mantener la capacidad de regeneración del intestino ante una lesión.

### 2.3.2 Mecanismo de generación del Cáncer Colorrectal.

El CCR es uno de los tumores más estudiados desde el punto de vista genético. La posibilidad que brinda la secuencia adenoma-carcinoma y su fácil accesibilidad endoscópica han permitido el estudio de los cambios genotípicos que van desde la mucosa normal y la hiperplasia mucosa hasta el cáncer invasor, pasando por los diversos tipos evolutivos del adenoma: tubular, túbulo-veloso y veloso. Partiendo de la base de que los adenomas y el CCR comparten algunos rasgos genéticos, como suele ser una mutación del gen *Ras* y pérdida alélica de los cromosomas 5 y 18, Fearon y Vogelstein postularon un modelo de tumorigénesis colorrectal (Fearon and Vogelstein 1990). Este modelo describía un proceso progresivo con cambios acumulados a lo largo del tiempo, y que adquirirían mayor prevalencia a medida que los pólipos aumentaban de tamaño. Los cambios genéticos de la mucosa colorrectal dan como resultado que ésta pase a hiperplasia, adenoma, carcinoma *in situ* y, finalmente, carcinoma invasor. En resumen, para que los CCR se generen se requieren mutaciones en varios genes, dando lugar tanto a la activación de oncogenes como a la inactivación de genes supresores de tumores. Las alteraciones genéticas suceden según una secuencia, cuya acumulación, y no su orden cronológico, determina las propiedades biológicas del tumor (Fearon and Vogelstein 1990) (Fig I.4.).

Las alteraciones más contrastadas en el CCR son de dos tipos: las mutaciones del oncogén *Ras* y activación del *c-myc* por una parte, y por otra, la inactivación de oncogenes supresores del crecimiento tumoral, que se expresan mediante deleciones de los cromosomas 5q (donde está situado el gen responsable de la PAF, el gen *APC*), 18q (gen *DCC* o “deleción en cáncer de colon”) y 17q (donde se localiza el gen *p53*) (Lledó 2000). Un tercer grupo de genes relacionados son los que se asocian al síndrome de Lynch o Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico (CCHNP), que son los llamados *mismatch repair genes* (MMR): genes que controlan las proteínas de

reparación de los errores de replicación de ADN, que se comentarán en un apartado especial.



**Figura I.4.** Esquema simplificado de la secuencia adenoma-carcinoma y de la acumulación de mutaciones más importantes. En negro, las relacionadas con la inestabilidad cromosómica, y en rosa, las relacionadas con la inestabilidad de microsatélites. Modificado de Fearon y Vogelstein, 1990.

La inestabilidad genómica es una característica de todas las neoplasias intestinales. Se han descrito dos vías implicadas en la producción y progresión del CCR: la inestabilidad cromosómica (INC) y la inestabilidad de microsatélites (IMS). Cada una de ellas muestra diferencias, tanto desde el punto de vista molecular e histopatológico, como incluso del pronóstico, como se aprecia en la Tabla I.1.

**Tabla I.1.** Características diferenciadoras entre los CCR que presentan inestabilidad cromosómica e inestabilidad de microsatélites (de la Chapelle 2003).

| <i>INESTABILIDAD CROMOSÓMICA</i>  | <i>INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES</i>  |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de heterocigosidad generalizada</li> <li>• Aneuploidía o poliploidía</li> <li>• Localización preferentemente izquierda</li> <li>• Características histológicas: bien diferenciados</li> <li>• No infiltración linfocítica</li> <li>• Raramente mucinosos</li> <li>• Peor pronóstico</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inestabilidad de microsatélites generalizada</li> <li>• Diploidía</li> <li>• Localización preferentemente derecha</li> <li>• Características histológicas: pobremente diferenciados</li> <li>• Infiltración linfocítica</li> <li>• Frecuentemente mucinosos</li> <li>• Mejor pronóstico</li> </ul> |

La inestabilidad cromosómica (INC) es la alteración más frecuente, ya que aparece en el 75-80% de los CCR, y la suelen presentar los casos esporádicos (Vogelstein et al. 1988; Fearon and Vogelstein 1990). Los cambios asociados conllevan la activación de proto-oncogenes, como *K-RAS* y *MYC*, y la inactivación de genes supresores como *APC*, *p53*, *DCC*, *SMAD2* y *4* (Fearon 1995; Fearon and Pierceall 1995; Cahill et al. 1998).

Los tumores con inestabilidad de microsatélites (IMS) son el 10-15% de todos los CCR, y es habitual en las formas hereditarias como el síndrome de Lynch. En estos tumores se acumulan mutaciones en las secuencias microsatélites de regiones codificantes de genes implicados en la progresión tumoral como *TGF-βRII*, *IGFIIR*, *MSH3* y *BAX* (Raut et al. 2004).

#### **2.4 Secuencia adenoma-carcinoma. Pólipos colónicos.**

Considerando que en muchos casos el origen del CCR viene determinado por la secuencia antes mencionada, partiendo de la mucosa colónica sana, pasando por adenoma o pólipo adenomatoso, hasta llegar al cáncer, y el consecuente acúmulo de alteraciones moleculares, es importante tener en cuenta la fase previa de dicha secuencia, tanto desde el punto de vista morfológico como clínico.

Los pólipos colónicos son crecimientos exofíticos o excrecencias de la mucosa del colon o del recto con tamaño, morfología y características variables. Los pólipos

adenomatosos o neoplásicos son los más frecuentes y los que mayor potencialidad maligna tienen, dependiendo ésta de la morfología, tamaño y grado de diferenciación histológica. La edad máxima de incidencia es la 5ª y 6ª décadas de la vida. La mayoría son pediculados, por lo que suelen ser fácilmente extirpables mediante la polipectomía endoscópica. Si son sesiles, la extirpación endoscópica conlleva el riesgo de perforación del colon o la resección incompleta, por lo que estaría indicada la cirugía (Lledó 2000).

El estudio histopatológico es el que determina la naturaleza neoplásica del pólipo. En la tabla I.2. se relacionan los distintos tipos de pólipos intestinales. El pólipo tendría un eje estrófico central que emerge de la lámina propia de la mucosa, su naturaleza es conjuntiva y tapizado por mucosa cólica normal a nivel del pedículo y que se va engrosando paulatinamente conforme se aleja de éste y adquiriendo una naturaleza papilar. Las transformaciones malignas suelen ocurrir en la superficie (Figura I.5.). La atipia leve se observa en aproximadamente el 60% de los pólipos, mientras que la moderada en alrededor del 30% y la severa a un 10%, debiéndose considerar éstos como equivalentes a carcinomas in situ. La incidencia del cáncer invasor se correlaciona con el tipo histológico del adenoma y el tamaño. Globalmente considerados, la incidencia está entre el 2.7-5%, mientras que en los adenomas vellosos mayores de 5 cm dicha incidencia se eleva hasta el 40%.



**Figura I.5.** Imagen endoscópica de pólipo adenomatoso.

**Tabla 1.2.** Clasificación de los pólipos gastrointestinales. (Bronner 2003).

| CLASIFICACIÓN DE LOS PÓLIPOS INTESTINALES   |
|---|
| <p>Pólipos Gastrointestinales.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Inflamatorios y postinflamatorios.</li><li>Hiperplásicos.</li><li>Linfoides.<ul style="list-style-type: none"><li>Hiperplasia reactiva linfoide.</li><li>Linfoma.</li></ul></li><li>Lipomatosis.</li><li>Angiomatosis.</li><li>Leiomiomatosis.</li><li>Neumatosis quística intestinal.</li><li>Síndrome de Cronkhite-Canadá.</li></ul> <p>Pólipos Gastrointestinales Hereditarios.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Poliposis Adenomasas familiares.<ul style="list-style-type: none"><li>Poliposis Adenomatosa Colónica.</li><li>Síndrome de Gardner, Síndrome de Turcot. Poliposis atenuada.</li></ul></li><li>Poliposis Hamartomasas.<ul style="list-style-type: none"><li>Síndrome de Peutz-Jeghers.</li><li>Poliposis juvenil familiar.</li><li>Síndrome de Cowden.</li><li>Ganglioneuromatosis intestinal.</li><li>Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba.</li><li>Esclerosis tuberosa.</li></ul></li></ul> |

La colonoscopia completa es el método más seguro y fiable en el diagnóstico de los pólipos colorrectales, pudiendo resear hasta el 70% de los pólipos. Las limitaciones

son de la propia técnica, y en función del tamaño y la forma del pólipo, en especial en los sesiles. Se indica la cirugía en los casos con criterios endoscópicos y anatomopatológicos de malignidad y/o resección incompleta. El tratamiento quirúrgico variará según la localización de los pólipos. En el colon consistirá en una colotomía y polipectomía quirúrgica, o bien, teniendo en cuenta la potencialidad maligna de aquellos de más de 2 cm de diámetro, la resección cólica con criterios oncológicos. Si los pólipos son múltiples, y exceptuando la Poliposis Adenomatosa Familiar, a la resección quirúrgica se le puede asociar extirpaciones endoscópicas o endoanales, y si existen criterios de malignidad en más de un pólipo se pueden llevar a cabo colectomías ampliadas o llegar a la proctocolectomía restauradora con reservorio ileal. En los pólipos localizados en el recto, a parte de la endoscopia y la biopsia, para el tratamiento quirúrgico la ecografía endoluminal ayudará a localizar y estadificar preoperatoriamente las posibles lesiones malignas. Con sospecha de benignidad o malignidad sin infiltración de la submucosa, las técnicas serán de resección local, mientras que si la biopsia informa de un cáncer invasor se debe proceder a una técnica más radical.

## **2.5. Diagnóstico.**

Como ya se ha indicado, la mayoría de los cánceres colorrectales se podrían prevenir mediante la detección y extirpación de los adenomas de colon premalignos. De la misma forma, conllevaría un beneficio considerable el diagnóstico del cáncer colorrectal en fases muy tempranas, cuando la enfermedad es curable con tratamiento quirúrgico. Estas consideraciones han llevado a sugerir exploraciones en la población general adulta a partir de los 50 años, y antes de esa edad, en personas con mayor riesgo, bien por historia familiar, bien por otros factores de predisposición (Smith et al. 2001; Schoen 2002; Castells y Marzo 2004).

### **2.5.1. Diagnóstico en sujeto con sospecha clínica de CCR.**

Las herramientas disponibles para la detección del CCR más utilizadas y eficaces son: la detección de sangre oculta en heces (SOH); visualización endoscópica de la porción terminal del colon a través de la sigmoidoscopia (sensibilidad 60%) (Figura I.6); visualización completa del colon por colonoscopia (sensibilidad 90%); o visualización



por rayos X, mediante enema de bario (Smith et al. 2001; Markowitz et al. 2002; Schoen 2002). Otros posibles métodos diagnósticos que están empezando a introducirse en el manejo del CCR son: la colonoscopia virtual, con una utilidad clara en los pacientes cuyo seguimiento ha de ser de por vida, como son aquellos CCR con componente hereditario; o la RNM, cuya aplicación se emplea en la estadificación del Cáncer de Recto (CR).

La exploración masiva poblacional por colonoscopia no se realiza debido al alto coste del procedimiento, la dificultad de la preparación y a la recuperación tras la exploración. Frente a esto, la posibilidad de detección de mutaciones específicas del cáncer de colon en ADN extraído a partir de las heces de pacientes con cáncer de colon abre una nueva puerta al desarrollo de una técnica no invasiva de detección molecular en población sana (Ahlquist and Shuber 2002; Traverso et al. 2002).

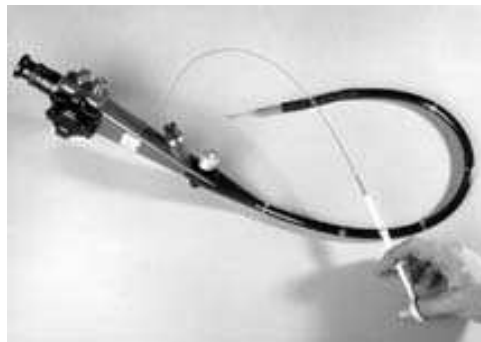


Figura 1.6. Imagen del Rectosigmoidoscopio.

En el caso de haber identificado ya un CCR, el estudio del colon debe ser completo para eliminar el riesgo de tumores sincrónicos (5%) y de pólipos asociados al tumor (28%) (Codina et al. 2003). En caso de no poder visualizar todo el colon se puede practicar un enema opaco o una colonoscopia intraoperatoria. Por supuesto, una vez que se ha visualizado la lesión neoplásica, la biopsia es mandatoria.

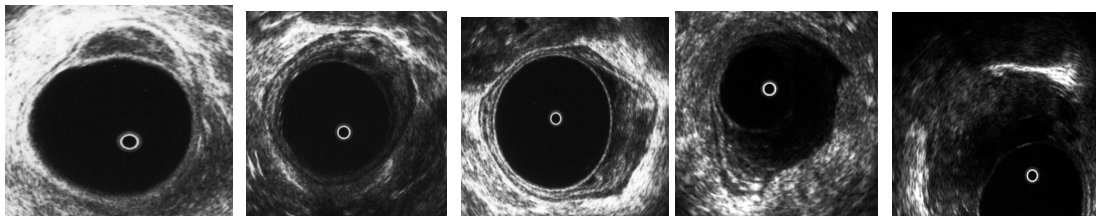
Posteriormente, se ha de realizar la estadificación preoperatoria, que tiene como objetivo determinar la extensión anatómica del tumor para establecer el pronóstico, planificar el tratamiento y evaluar sus resultados. Implica la realización de una evaluación clínica, radiológica y anatomopatológica con el objetivo final de la planificación de la técnica quirúrgica, puesto que puede evitar la realización de cirugía innecesaria en pacientes ancianos, con mal estado general y metástasis múltiples, o bien

planificar el tratamiento quirúrgico tanto del tumor primario como de las metástasis (Lledó 2000). Entre las pruebas de imagen, la ecografía, TAC (Figura I.7.) o RNM sirven para dicho propósito.



**Figura I.7.** TAC abdominal, en el que se identifican las metástasis de un CCR.

En el caso del cáncer de recto, el examen digital permite localizar y conocer la distancia respecto al margen anal, tamaño y número de cuadrantes afectados, grado de movilidad y aspecto macroscópico. Del mismo modo permite conocer el estado de los esfínteres y orientar sobre el tipo de cirugía. La estadificación, aparte de las pruebas complementarias referidas para el cáncer de colon, es importante la realización de rectoscopia para conocer el tamaño, la localización y la distancia del tumor respecto al margen anal. La ecografía endorrectal es la prueba diagnóstica de elección para determinar el grado de invasión del tumor a través de la pared rectal y la afectación de los ganglios y, por tanto, para definir la posibilidad de llevar a cabo un tratamiento neoadyuvante (Figura I.8).



**Figura I.8.** Estadificación sucesiva mediante ecografía endorrectal preoperatoria de diferentes cánceres de recto según el crecimiento en el espesor de la pared, desde uT0 hasta uT4, en que hay infiltración prostática.

### **2.5.2. Cribado del CCR en nuestro medio.**

Como se ha mencionado previamente, el cribado debería ofrecerse a todos los individuos sin factores de riesgo añadidos a partir de los 50 años de edad. Las recomendaciones para los diferentes métodos según la Sociedad Española de Gastroenterología son (Castells y Marzo 2004):

1.- La detección de SOH con periodicidad anual o bienal es eficaz. Con un intervalo de un año aumenta la sensibilidad.

2.- La sigmoidoscopia es eficaz en el cribado del CCR, siendo el intervalo recomendado de 5 años. Como se ha dicho previamente, si se detecta una neoplasia se ha de explorar endoscópicamente el resto del colon. La suma de esta prueba con la SOH no ha evidenciado mayor eficacia que ambas por separado.

3.- El papel del enema opaco no es eficaz en el cribado, aunque sí puede ayudar a la exploración completa del colon cuando la colonoscopia no es posible, como en el caso de un CCR estenosante que impide el paso del endoscopio.

4.- La colonoscopia es eficaz siendo el intervalo recomendado de 10 años.

El cribado del CCR es coste-efectivo, con independencia de la estrategia empleada, aunque se desconoce cuál de ellas lo es más. La elección del método depende, entre otros factores, de la aceptación por el paciente y la disponibilidad de los recursos. En poblaciones de riesgo, como es el caso del síndrome de Lynch, las recomendaciones de cribado se detallarán más adelante.

### **2.6. Clasificación por estadios. Definiciones.**

La clasificación de los tumores colorrectales por estadios viene determinada por el grado de diseminación locorregional, tanto en profundidad a nivel de la pared del colon como por vía linfática en los ganglios de drenaje del propio órgano, como por la posible extensión hematogena, alcanzando órganos a distancia. Esta clasificación tiene relieve en la medida en que el tratamiento viene determinado por la misma, y es en sí misma el factor pronóstico más importante en relación a la aparición de recidivas en los pacientes diagnosticados de un CCR.

Son varios sistemas los usados, aunque los más frecuentes son los de Dukes, Astler-Coller y AJCC/TNM. En 1932, Dukes propuso su clasificación, que se caracteriza por su sencillez y por su correspondencia con el pronóstico, en la que definía tres estadios, A, B y C, según el tumor invadiera la pared, sin alcanzar la subserosa; sí la revasara; o hubiera afectación de ganglios locorreionales, respectivamente. Posteriormente, de las múltiples modificaciones, sólo son válidas, una la que añadía la “D” en caso de presencia de metástasis a distancia (Turnbull 1967) y, más importante todavía, la llevada a cabo por Astler y Coller, en 1954, que diferenciaba los estadios B1 y B2, así como C1 y C2, según la afectación del espesor de la pared del colon. En el mismo año fue introducida la clasificación TNM.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que existen algunas limitaciones en la clasificación de Dukes. El CCR en estadios precoces, limitado a la submucosa, no puede identificarse de manera específica. De la misma manera, dicha clasificación no subdivide el estadio C en grupos en relación al número de ganglios o su localización.

El más utilizado actualmente es el establecido por el Comité Americano Conjunto en Cáncer (AJCC) en el año 2002 (<http://www.cancerstaging.org>), que utiliza a su vez la clasificación TNM. El sistema AJCC/TNM describe la extensión del tumor primario (T), la ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales (N), y la ausencia o presencia de metástasis a distancia (M).

#### Tumor primario (T):

Tx: El tumor primario no se puede evaluar.

T0: No hay evidencia de tumor primario.

Tis: Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia.

T1: El tumor invade la submucosa.

T2: El tumor invade la muscular propia.

T3: El tumor invade la subserosa o tejidos perirrectales.

T4: El tumor invade directamente otros órganos o estructuras y/o perfora el peritoneo visceral.

Ganglios linfáticos regionales (N):

NX: Los ganglios regionales no pueden ser evaluados.

N0: No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales.

N1: Metástasis en uno a tres ganglios linfáticos regionales.

N2: Metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos regionales.

N3: Metástasis en adenopatías en el curso de los vasos principales.

Metástasis a distancia (M):

MX: No se puede valorar la metástasis a distancia.

M0: No hay metástasis a distancia.

M1: Metástasis a distancia.

La etapa o estadio en la que se encuentra el tumor, que va desde el “0” hasta el “4” en números romanos, viene determinada por la combinación de las categorías T, N y M del paciente, como se observa en la Figura I.9 y en la Tabla I.3., en la que también se relacionan con la clasificación de Dukes modificada.

Tabla I.3. Clasificaciones para el CCR (Oates et al. 1997).

| AJCC/TNM             | Estadio | Dukes modificado |
|----------------------|---------|------------------|
| Tis N0 M0            | 0       |                  |
| T1 N0 M0<br>T2 N0 M0 | I       | A                |
| T3 N0 M0<br>T4 N0 M0 | II      | B                |
| T- N1-3 M0           | III     | C                |
| T- N- M1             | IV      | D                |

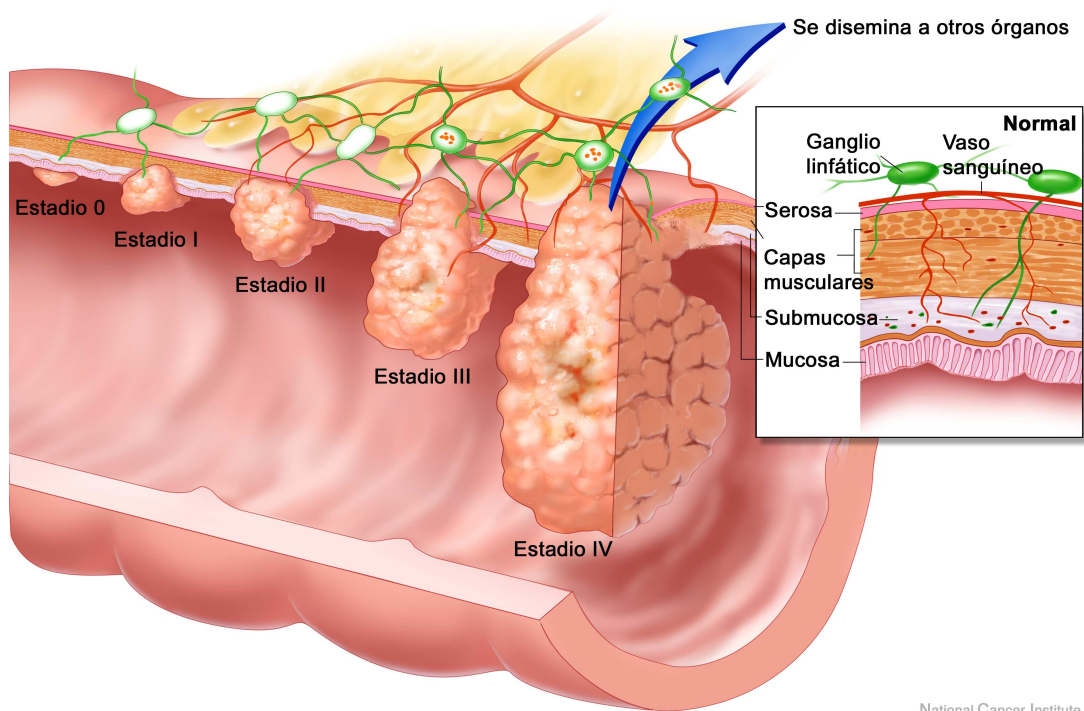


Figura I.9. Clasificación por estadios del CCR según la afectación de la pared del colon; ganglios y órganos a distancia. (Imagen tomada del Nacional Cancer Institute: [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov) ).

La importancia de la definición del estadio estriba en que el riesgo de recurrencia se relaciona directamente con él. La supervivencia global a los 5 años es del 85-95% en los estadios iniciales (T1-T2 o A-B1). Al aumentar el grado de afectación de la pared del colon (Estadio II o B2) o aparecer metástasis en los ganglios regionales (III o C), la supervivencia disminuye, llegando a ser inferior al 30% si se combinan varios factores pronóstico desfavorables. En caso de metástasis a distancia, la supervivencia global es inferior al 5% (Cohen et al. 1997), excepto en pacientes seleccionados tratados con resección de metástasis.

## **2.7. Tratamiento.**

El tratamiento del CCR depende de la localización de la neoplasia al igual que de la estadificación de la misma. La cirugía es, hoy en día, el tratamiento de elección cuando hablamos de intención curativa en el CCR, siendo complementada por la quimioterapia y la radioterapia según los casos, como se expone a continuación.

### **2.7.1 Tratamiento quirúrgico.**

La resección quirúrgica de la parte del colon afectada, que conlleva tanto el tumor primario como los ganglios locorreionales, es el tratamiento inicial para los cánceres de colon y para muchos de recto (Markowitz et al. 2002).

La importancia del acto quirúrgico de la resección primaria de un tumor de colon es tal que el pronóstico del paciente gravita directamente en relación con éste; el cirujano es una variable pronóstica de primera magnitud, tan sólo superada por la estadificación anatomopatológica. De esta forma, la cirugía oncológica radical previene la recidiva local en la mayor parte de los casos. (Harris et al. 2002). En este sentido es necesario destacar la mayor importancia de la exéresis linfoganglionar a la hora de definir la extensión de la resección cólica cuando se aborda con objetivos de curabilidad. En cualquier caso, el cirujano que trata el cáncer de colon ha de cumplir una serie de requisitos recomendados por las sociedades científicas, del mismo modo que el análisis de la pieza quirúrgica se ha de llevar a cabo de una forma sistemática con unos parámetros mínimos. Es así como se logra establecer correctamente el pronóstico de

estos pacientes, instaurar el tratamiento complementario más adecuado y lograr mejorar la supervivencia. (Roig et al. 2003)

Según la localización del cáncer, el tratamiento quirúrgico lo podemos dividir en:

Cáncer de colon derecho. Cirugía idéntica para las lesiones que asientan desde el ciego hasta la parte proximal del colon transverso, y consiste en la hemicolectomía derecha.

Cáncer de colon transverso. Resección de colon derecho o izquierdo ampliada.

Cáncer de ángulo esplénico. Hemicolectomía izquierda ampliada o derecha más ampliada.

Cáncer de colon descendente y sigmoide. Hemicolectomía izquierda, hasta el promontorio en el caso de colon izquierdo, y sigmoidectomía en el caso de cáncer de colon sigmoide.

Las dudas en relación al riesgo de efectuar un tratamiento peor, desde el punto de vista de los criterios oncológicos, mediante la cirugía laparoscópica respecto a la abierta han ido desapareciendo (Hazebroek et al. 2002).

En el caso de la Poliposis adenomatosa familiar, debido a que el riesgo de malignización es de un 100%, es necesaria la colectomía profiláctica. En el caso del Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico (CCHNP) o síndrome de Lynch, cuando una paciente presenta carcinoma de colon conocido y cumple criterios de Ámsterdam o Bethesda, se recomienda la realización de una colectomía total ante el riesgo aumentado de desarrollar CCR metacrónico (de Jong et al. 2004).

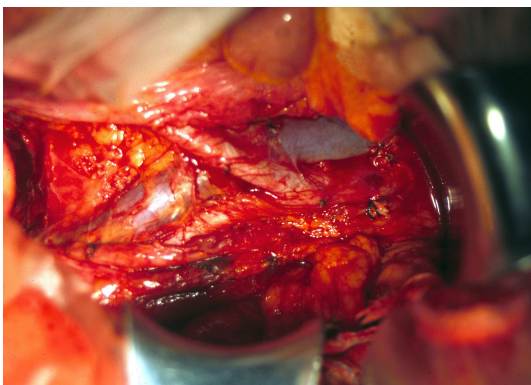
El tratamiento quirúrgico del Cáncer de Recto (CR) presenta consideraciones especiales (Fig I.10.). Se consideran tumores rectales los situados a menos de 15 cm del margen anal. Las diferentes técnicas quirúrgicas dependen de diferentes variables.

1.- Resección local. La resección local transanal surge como alternativa a los procedimientos radicales, aunque sólo el 5% de los tumores son susceptibles de la misma (RCSE and ACGBI 1996). Debe limitarse a aquellos tumores rectales situados por debajo de 8-10 cm del margen anal (Fazio 1991), que invaden la mucosa y submucosa (pT1), moderadamente o bien diferenciados y menores de 3 cm de diámetro, aunque, pese a todo, es una opción aún controvertida por la dificultad de la

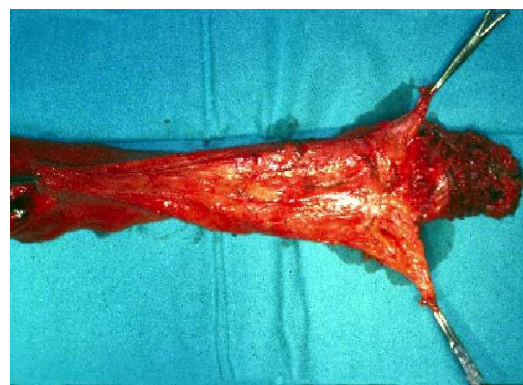


estaficación preoperatoria. En los casos que invaden la *muscularis propria* (pT2), sólo se indica el tratamiento local cuando son enfermos mayores o con enfermedades asociadas y riesgo quirúrgico elevado para el abordaje transabdominal. (Wexner and Rotholtz 2000) La técnica de microcirugía endoscópica transanal, desarrollada por Buess et al, facilita la exéresis de tumores rectales situados a más de 8-10 cm del margen anal.

2.- Resección anterior. Debe ser superior al 60% de todas las cirugías de CR (RCSE and ACGBI 1996). Actualmente el margen distal rectal se considera suficiente con 2 cm, pero el margen distal del mesorrecto posee hoy en día un mayor valor pronóstico, exigiéndose al menos 5 cm distales al tumor (Scott et al. 1995) En el caso del margen circunferencial, depende de la calidad de la exéresis mesorrectal (Quirke et al. 1986). En los tumores del tercio superior del recto (11-15 cm) se debe efectuar sigmoidectomía y exéresis subtotal del mesorrecto, equivalente a las resecciones anteriores altas o bajas según el nivel de la sección rectal. En aquellos situados en los dos tercios inferiores, la exéresis total del mesorrecto (ETM) es obligada, originando la denominada resección anterior ultrabaja. Existe evidencia científica de que la asociación de un reservorio cólico disminuye las secuelas funcionales de esta última técnica y mejora la calidad de vida de estos pacientes (Seow-Choen et al. 1995; Mortensen et al. 1995). También existe evidencia sobre la conveniencia de asociar una ileostomía de protección a la resección anterior ultrabaja y anastomosis coloanales con ETM, evitando así las fugas y sus consecuencias (RCSE and ACGBI 1996).



A



B

**Figura I.10.** Consideraciones especiales de la cirugía del CR, como son el plexo presacro y los vasos iliacos (A), así como la excisión del mesorrecto (B).

3.- Amputación abdominoperineal. Es una intervención en regresión, puesto que aproximadamente un 75% de los pacientes con CR inferior pueden someterse a una cirugía preservadora de esfínteres (Heald et al. 1997). Esta operación debe limitarse a los tumores que infiltran el aparato esfintérico. Las excepciones son los tumores diferenciados, en los que la invasión intramural puede alcanzar hasta 5 cm, o la existencia previa de incontinencia fecal, o pacientes muy ancianos o con enfermedades asociadas que supongan un alto riesgo de fracaso anastomótico o de incontinencia fecal grave. La administración de quimiorradioterapia preoperatoria permite la infraestadificación de los tumores, facilitando la disección pélvica, aunque no debe modificar la indicación de amputación si en el estudio preoperatorio existiera evidencia de afectación esfinteriana (Lavery et al. 1997).

4.- Intervención de Hartmann. Intervención aceptada en la cirugía curativa de cánceres del tercio medio e inferior en los que el factor paciente contraindique una anastomosis baja, y sea posible oncológicamente preservar el aparato esfinteriano tras obtener un margen distal correcto. También en casos de cáncer a menos de 10 cm del margen anal con enfermedad diseminada extensa en los que, a causa del mal pronóstico, se recomienda evitar la morbilidad asociada a una anastomosis rectal baja (Nicholls 1997).

La adopción y la correcta realización de la ETM ha determinado el importante progreso que ha tenido la cirugía del CR. Se considera ideal en el tratamiento quirúrgico del CR, con preservación esfinteriana para casi el 90% de los pacientes (Lledó et al. 2003), y su aplicación ha llevado a una reducción media de la recidivas locales del 19 al 6% (Wexner and Rotholtz. 2000).

#### 2.7.2 Tratamiento adyuvante.

Aproximadamente el 50% de los pacientes tratados con cirugía con intención curativa fallecerán por recurrencia del CCR. El tratamiento adyuvante se administra de forma complementaria a la cirugía con la intención de erradicar las posibles micrometástasis y aumentar la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) y la Supervivencia Global (SG), y de esta manera reducir el porcentaje mencionado. Está demostrada su eficacia en el estadio III del CCR, siendo controvertido en el estadio II, salvo en pacientes de alto riesgo (Laurie et al. 1989). La terapia neoadyuvante se aplica de manera preoperatoria

para transformar en resecable el tumor primario y/o las metástasis, permitiendo así la cirugía radical. Las dos indicaciones más claras de esta última las encontramos en la quimiorradioterapia preoperatoria en el cáncer de recto localmente avanzado y la quimioterapia en metástasis hepáticas irresecables de inicio.

Actualmente el 5-fluorouracilo (5-FU), citostático que en la célula se convierte en metabolitos que se unen a la timidilato sintetasa e inhiben la síntesis de timidina, y el leucovorín (LV) o ácido folínico, que es un modulador bioquímico del 5-FU, potenciando su acción citotóxica, administrado por vía intravenosa durante seis meses, se considera el régimen más adecuado (QUASAR Collaborative Group. 2000; Porschen et al. 2001).

La eficacia de nuevos citostáticos, como las fluoropirimidinas orales (UFT, capecitabina), raltitrexed, irinotecán y oxaliplatino, se está desarrollando en ensayos clínicos aleatorizados. La capecitabina, un precursor oral del 5-FU, ha mostrado en un amplio estudio aleatorizado tener al menos una eficacia equivalente al 5-FU y LV en relación con la SLE, mientras que el intervalo libre de enfermedad fue significativamente superior para la capecitabina, así como una mayor tolerancia en relación a los efectos adversos (Twelves et al. 2005). El UFT con Leucovorín fueron comparados con 5-FU y LV en bolo de forma prospectiva y randomizada, en un ensayo fase III con pacientes en estadio II y III, presentando resultados equivalentes en SLE y SG, con una toxicidad similar (Wolmark et al. 2004). Por otro lado, la inmunoterapia (bevacizumab y cetuximab) ha levantado grandes expectativas ante la posibilidad de que haga más eficaz la quimioterapia en el tratamiento del CCR.

Es importante destacar la importancia de nuevos factores pronóstico que se vayan identificando a partir de las diversas moléculas implicadas en la carcinogénesis, así como perfiles moleculares tumorales concretos que permitan seleccionar a subgrupos de pacientes con mayor riesgo que puedan necesitar terapias más agresivas, o bien, que vayan a responder mejor a tratamientos concretos.

### 2.7.3 Tratamiento paliativo.

Hasta hace pocos años, la única opción terapéutica para los pacientes con CCR y enfermedad metastásica era la quimioterapia con 5-FU en diferentes esquemas de administración, modulado o no con LV. El desarrollo de las nuevas fluoropirimidinas orales, raltitrexed, irinotecán y oxaliplatino ha cambiado la situación. La quimioterapia paliativa ha demostrado su capacidad para mejorar la supervivencia sin reducir la calidad de vida, y retrasando la aparición de enfermedad sintomática. La SG de los pacientes sin quimioterapia es de 5-6 meses y, con esquemas de 5-FU en monoterapia de 11 meses (Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group. 1992; Scheithauer et al. 1993). Sin embargo, esto era, como se ha referido, hasta hace unos años: Los nuevos esquemas de combinación han permitido duplicar la SG de la enfermedad metastásica e incrementan la tasa de repuestas, lo que ha llevado al desarrollo de la quimioterapia neoadyuvante con objeto de incrementar la cirugía radical de las metástasis hepáticas (Vibert et al. 2005). Otras técnicas, como radiofrecuencia, crioterapia y quimioterapia intraarterial, están contribuyendo a mejorar la supervivencia de los pacientes con metástasis hepáticas (García Alfonso et al. 2003).

La resección hepática es el tratamiento de elección de los pacientes con metástasis hepáticas de origen colorrectal, alcanzando índices de supervivencia del 25-40% a los 5 años (Nordlinger et al. 1996; Nakamura et al. 1997). Hoy en día la única premisa necesaria para indicar la cirugía es poder extirpar toda la enfermedad macroscópica con márgenes libres de enfermedad. El objetivo de mejorar los índices de supervivencia ha de basarse en un tratamiento multidisciplinario: oncológico, quirúrgico, radiológico, anatomopatológico, etc.

### **2.8. Seguimiento.**

Basándose en los pocos estudios aleatorios, y muchos no aleatorizados, publicados, la American Society of Clinical Oncology (ASCO) (Desch et al. 1999), la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (Engstrom et al. 1996) y la European Society of Medical Oncology (ESMO) (ESMO 2001) han elaborado unas guías clínicas para el seguimiento del CCR intervenido. Las tres sociedades recomiendan el seguimiento

intensivo centrado en los primeros dos a tres años, aunque con intervalos diferentes (de 3 a 6 meses).

En relación a las pruebas complementarias a realizar para la detección de la recidiva local, el hemograma o el test de sangre oculta en heces no se justifican de forma habitual (Ángstrom et al. 1996; Desch et al. 1999; ESMO 2001). La entrevista clínica y la exploración física son recomendadas con el fin de llevar a cabo tareas de medicina preventiva. El examen endoscópico tiene como objetivo no sólo identificar recidivas en la anastomosis, sino tumores metacrónicos. En el caso del CR, dada la reducción de las recidivas locales debido a la terapia neoadyuvante, se recomienda la realización de rectosigmoidoscopia en los pacientes sin radioterapia pélvica (Flamen et al. 2001). También la TAC pélvica en el mismo sentido, en ambos casos cuando exista alternativa terapéutica de rescate (Desch et al. 1999).

El seguimiento ha demostrado descubrir las recidivas en un estadio potencialmente curable. El análisis del Antígeno Carcinoembrionario (CEA) es el test que más frecuentemente detecta recurrencias y se recomienda su uso en el seguimiento de los estadios II y III cada dos a tres meses (Moertel et al. 1993; Desch et al. 1999; Bast et al. 2001). Se han propuesto los estudios que llevan a cabo exploraciones de imagen hepática (TC y/o ecografía) para detectar el 30% de recidivas con CEA negativo. En el CR pueden diseminarse directamente hacia el pulmón, por lo que se introduce además la radiografía de tórax, a pesar de no haber demostrado aumentar la incidencia de metástasis reseables quirúrgicamente (Desch et al. 1999). Hoy en día se empieza a valorar el uso de la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) como herramienta de seguimiento.

En la tabla I.4. se presenta un protocolo de seguimiento para el CCR intervenido (Navarro y Piulats 2003).

| T(M) | CEA | ECOGRAFÍA | RT | COLONOSCOPIA | TC ABDOMINAL |
|------|-----|-----------|----|--------------|--------------|
| 3    | X   |           |    | X            |              |
| 6    | X   | X         | X* |              |              |
| 9    | X   |           |    |              |              |
| 12   | X   | X         | X  |              | X*           |
| 15   | X   |           |    |              |              |
| 18   | X   | X         | X* |              |              |
| 21   | X   |           |    |              |              |
| 24   | X   | X         | X  | X*           | X*           |
| 28   | X   |           |    |              |              |
| 32   | X   |           |    |              |              |
| 36   | X   | X         | X  |              |              |
| 42   | X   |           |    |              |              |
| 48   | X   | X         | X  | X            |              |
| 54   | X   |           |    |              |              |
| 60   | X   | X         | X  |              |              |

**Tabla I.4.** Protocolo de seguimiento del CCR. \* Localización rectal. CEA: antígeno carcinoembrionario; RT: radiografía de tórax; TC: tomografía computerizada. T(m): tiempo en meses (Navarro y Piulats 2003).

### 3. EL CÁNCER COLORRECTAL FAMILIAR.

Dentro del CCR familiar, nos encontramos con pacientes con riesgo de desarrollar CCR debido a que en su familia existen dos o más familiares con la enfermedad. Alcanzan un 20-25% de todos los CCR. Existen otros casos que presentan un riesgo al ser portadores de una alteración genética concreta que les predispone al mismo, y que se hereda siguiendo un modelo mendeliano. En este último caso, el porcentaje disminuye hasta el 5-10% de los CCR. Del último grupo, el CCR hereditario, a continuación se describen los más frecuentes.

#### 3.1. Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP).

##### 3.1.1. Concepto y variantes.

El Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico (CCHNP) o Síndrome de Lynch es el CCR hereditario más frecuente, englobando entre un 1-6% de todos los CCR (Aaltonen et al. 1998; Samowitz et al. 2001a). Se debe a una mutación en los genes de reparación

de bases desapareadas (Mismatch Repair Genes, MMR) del ADN: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, y *PMS2* (Peltomaki and Vasen 2004). Más del 90% de las familias con CCHNP genéticamente caracterizado son debidas a mutaciones en los dos primeros genes, *MSH2* (38%) y *MLH1* (59%) (Lynch and de la Chapelle 2003; Chung and Rustgi 2003). El defecto de estos genes lleva a múltiples errores en las secuencias repetitivas del ADN (microsatélites) en todo el genoma de los tumores; esta forma de inestabilidad genómica se denomina inestabilidad de microsatélites (IMS), siendo una de las características principales de este síndrome. Como se describirá más adelante, también se caracteriza por el desarrollo de CCR con predominio del colon derecho; otro tipo de tumores extracolónicos; elevada tasa de CCR, tanto sincrónicos como metacrónicos; y la edad temprana de aparición de las neoplasias.

Una variante del síndrome de Lynch es el síndrome de Muir-Torre, en el que, aparte del CCR, aparece tumores cutáneos (adenomas sebáceos, adenocarcinomas sebáceos o queratoacantomas) (Schwartz and Torre 1995). El síndrome de Turcot es otra variante en el que aparecen a su vez tumores del sistema nervioso central, principalmente gliomas. El síndrome de Turcot se asocia a mutaciones en *MLH1*, *MSH2* y *PMS2*, pero también en *APC*, como se comentará más adelante (Hamilton et al. 1995; Lucci-Cordisco et al. 2003)

### 3.1.2. Características clínicas.

#### - *Cánceres asociados.*

Aparte del CCR, el cáncer de endometrio es la segunda neoplasia más común, con un riesgo de desarrollarlo a lo largo de la vida del 30-60% (Watson et al. 1994; Aarnio et al. 1999). Otros tumores con una mayor incidencia en individuos que presentan este síndrome son: cáncer de ovario, estómago, vías urinarias, intestino delgado y tracto hepatobiliar (Watson and Lynch 1994).

La variación de expresión del espectro de neoplasia del síndrome de Lynch entre diferentes zonas geográficas, e incluso relacionada con la variable “tiempo”, hacen pensar en que los factores medioambientales desempeñan un papel importante en la carcinogénesis de este síndrome.

- *Edad temprana de inicio.*

El riesgo de desarrollar CCR a lo largo de su vida de los pacientes con CCHNP es del 80% (Aarnio et al. 1999), siendo la edad media al diagnóstico del CCR de 46 años.

- *Presentación de neoplasias primarias múltiples.*

En una serie de 477 pacientes con CCR en familias con mutación conocida, el 18% padecía un CCR sincrónico o metacrónico (de Jong et al. 2004), aunque estos últimos pueden alcanzar porcentajes mayores (Jass and Stewart 1992). El riesgo de padecer CCR metacrónico condiciona que algunos autores recomienden la colectomía subtotal para aquellos individuos con CCR de familias con síndrome de Lynch (de Vos tot Nederveen Cappel et al. 2003).

- *Características del Adenoma / CCR.*

En comparación con los adenomas de la población general, aquellos asociados al síndrome de Lynch surgen a edad más tempranas, son de mayor tamaño, y muestran un mayor número de características histológicas asociadas a un alto riesgo de degeneración maligna, tales como alto índice de displasia y la presencia de arquitectura vellosa más extendida, con una progresión a la malignización más rápida (Lynch et al. 1988; Vasen et al. 1993; Jass et al. 1994; de Jong et al. 2004).

Los adenomas y CCR se sitúan en el colon proximal sobre todo. A partir del Registro Holandés de CCHNP se ha podido determinar la historia natural de este síndrome (Vasen et al. 1995). Así, se desarrollaría el primer adenoma a una media de edad de 43 años, y el CCR a los 46 años. De esta forma se aprecia una aceleración de la secuencia adenoma-carcinoma, que puede ser en este caso menor de 3 años, en comparación con los 10 a 15 años del CCR esporádico. El CCR asociado al síndrome de Lynch suele ser diploide, suele ser mucinoso, y con mayor frecuencia de reacción tipo Crohn y de linfocitos alrededor del tumor (Jass et al. 2002)

3.1.3. **Criterios clínicos.**

Hace algo más de diez años, el diagnóstico del síndrome de Lynch era difícil debido a la ausencia de características clínicas patognomónicas, como ocurre en el caso de la PAF.



El diagnóstico se basaba en la historia personal y familiar del paciente, y la definición del síndrome era heterogénea (Vasen 2005). En 1990 el Grupo Colaborativo Internacional sobre CCHNP (ahora la Sociedad Internacional de Tumores Gastrointestinales Hereditarios – INSIGHT) propuso los “criterios de Ámsterdam”, con el fin de permitir estudios internacionales colaborativos y promover una terminología uniforme (Tabla I.5.). Posteriormente, en 1999, debido a lo estricto de estos criterios y no tomar en consideración los cánceres extracolónicos, se planteó un segundo grupo de criterios “Ámsterdam II”, que incluían las neoplasias extracolónicas (Tabla I.5.) (Vasen et al. 1999). Los criterios más utilizados en la actualidad son los llamados criterios de Bethesda, propuestos en 1996, con posteriores modificaciones (Rodríguez-Bigas et al. 1997a; American Gastroenterological Association 2001). En ellos se describen prácticamente todas las condiciones clínicas en las que se puede sospechar la existencia de un síndrome de Lynch. En tal caso, está indicado llevar a cabo estudios moleculares adicionales (IMS, inmunohistoquímica de las proteínas de reparación), cuyos resultados determinan la necesidad del consiguiente análisis de las mutaciones (Pinol et al. 2005). A partir de los resultados de dichos estudios y la jornada de trabajo sobre IMS organizadas por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), celebrada en 2002 en Bethesda, los criterios han sido actualizados recientemente (Criterios de Bethesda revisados, Umar et al. 2004) (Tabla I.5.).

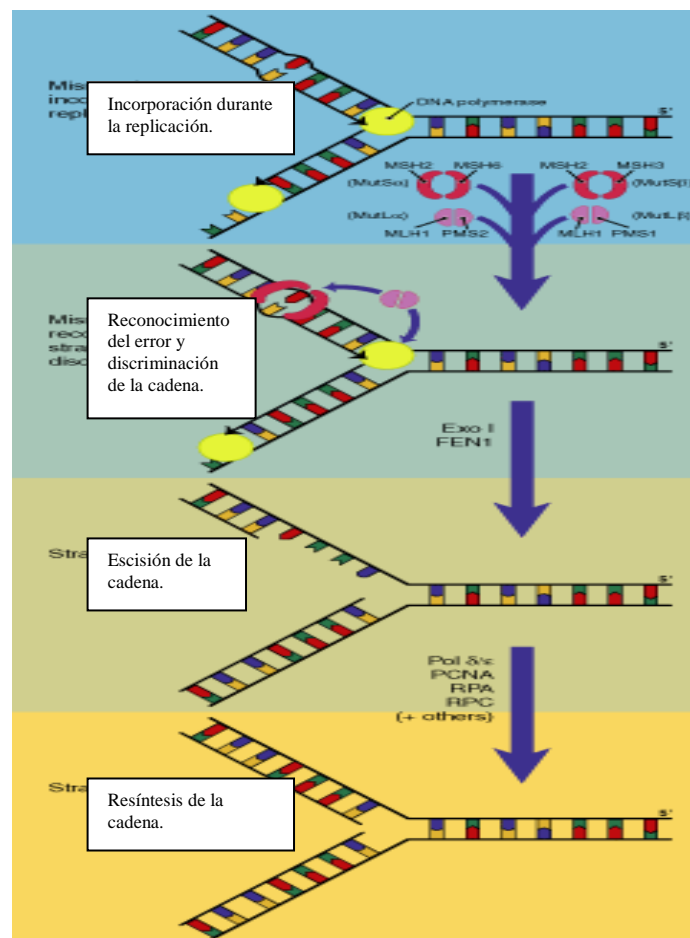
**Tabla I.5.** Criterios clínicos del síndrome de Lynch.

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>Ámsterdam I</b>       | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tres o más familiares con CCR confirmado histológicamente, uno de los cuales ha de ser familiar de primer grado de los otros dos, descartada la PAF.</li> <li>2. Al menos han de estar afectadas dos generaciones consecutivas.</li> <li>3. Uno o más casos de cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años.</li> </ol>   |
| <b>Ámsterdam II</b>      | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tres o más familiares con un cáncer asociado al CCHNP, confirmados histológicamente, (colorrectal, endometrio, intestino delgado, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro, tracto hepatobiliar, tumores sebáceos de piel), uno de los cuales es familiar de primer grado de los otros dos, descartada la PAF.</li> <li>2. Los cánceres han de aparecer al menos en dos generaciones sucesivas.</li> <li>3. Uno de los tumores ha de ser diagnosticado antes de los 50 años.</li> <li>4. Se debe descartar la Poliposis adenomatosa familiar.</li> </ol>  |
| <b>Bethesda I</b>        | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pacientes con CCR que pertenecen a familias con criterios de Ámsterdam.</li> <li>2. Individuos con dos cánceres asociados al CCHNP, incluyendo CCR sincrónico y metacrónico o cánceres extracolónicos (endometrio, ovario, gástrico, tracto biliar, intestino delgado, tracto urinario, páncreas, cerebro y glándula sebácea).</li> <li>3. Individuos con CCR y un familiar de primer grado con CCR y/o un cáncer extracolónico asociado al CCHNP y/o un adenoma colorrectal; uno de los cánceres diagnosticado antes de los 45 años y el adenoma antes de los 40.</li> <li>4. CCR o cáncer de endometrio diagnosticado antes de los 45 años.</li> <li>5. CCR en colon derecho con patrón indiferenciado diagnosticado antes de los 45 años.</li> <li>6. CCR de células en anillo de sello (más del 50%), diagnosticado antes de los 45 años.</li> <li>7. Adenoma colorrectal diagnosticado antes de los 40 años.</li> </ol> |
| <b>Bethesda II</b>       | <p>Criterios de Bethesda I, modificando la edad de diagnóstico, que de 45 años pasa a 50, manteniendo la edad de 40 años en los puntos 3 y 7.</p>  |
| <b>Bethesda revisado</b> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. CCR diagnosticado en un paciente menor de 50 años.</li> <li>2. CCR sincrónicos, metacrónicos, u otros tumores asociados al CCHNP, independientemente de la edad.</li> <li>3. CCR con hallazgos histológicos de linfocitos infiltrantes, reacción linfocitaria tipo Crohn, diferenciación mucinosa /anillo de sello o patrón de crecimiento medular (histología IMS-H), diagnosticado antes de los 60 años.</li> <li>4. Pacientes con CCR y un pariente de primer grado que presenta un tumor asociado al síndrome de Lynch, y con uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años.</li> <li>5. Pacientes con CCR, con dos o más parientes de primer o segundo grado, con un tumor asociado al síndrome de Lynch, independientemente de la edad.</li> </ol>   |

### 3.1.4. Bases genéticas.

#### 3.1.4.1. Genes de reparación de los errores de emparejamiento del ADN.

La vía de reparación de bases desapareadas (mismatch repair pathway) requiere de un mínimo de seis proteínas distintas, codificadas a partir de sus correspondientes genes, de reparación de bases en el ADN humano y es crucial para la estabilidad genómica (Figura I.11.). La proteína Msh2 se une a Msh6, formando el heterodímero hMutS $\alpha$ , esencial en el reconocimiento de la concordancia entre bases. El heterodímero hMutS $\beta$ , que incluye a *MSH2* y *MSH3*, reconoce el bucle inserción-delección. Mlh1 se une a Pms2 para dar lugar a hMutL $\alpha$ . Esto coordina la interacción del complejo de reconocimiento de bases desapareadas y los otros miembros de la vía de reparación (Harfe and Links-Robertson 2000). La deficiencia de esta vía incrementa la tasa de mutación, denominándose “fenotipo mutador” (Perucho 1996).



**Figura I.11.** Mecanismo de acción del sistema de reparación de los errores de emparejamiento del ADN humano. Modificado de [www.rndsystems.com](http://www.rndsystems.com). DNA damage response.

De todos los genes del sistema de reparación, el *MLH1* y *MSH2* son responsables de más del 90% de los casos con alteración genética identificada. Su espectro mutacional es amplio y heterogéneo, por lo que su estudio es largo y costoso. Se han identificado tanto mutaciones puntuales como, en menor proporción, grandes deleciones genómicas. No existen diferencias de expresividad entre las mutaciones de ambos genes. La tasa de mutaciones patogénicas identificadas en familias con agrupaciones familiares de CCR del 26% (Wijnen et al. 1998). Esta proporción alcanza el 50-70% cuando las familias cumplen los criterios de Ámsterdam I. Una proporción de sujetos en los que no se identifica ninguna mutación podría estar en relación con una epimutación (silenciamiento epigénético de un gen) de los mismos (Suter et al. 2004). La proporción restante continúa siendo alta, y recientemente se ha apuntado la posibilidad de otros genes diferentes a los del sistema MMR podrían estar implicados en la carcinogénesis del CCR en sujetos de familias que cumplen los criterios de Ámsterdam I, y que a su vez presentan estabilidad de microsatélites en el tumor (Valle et al. 2007).

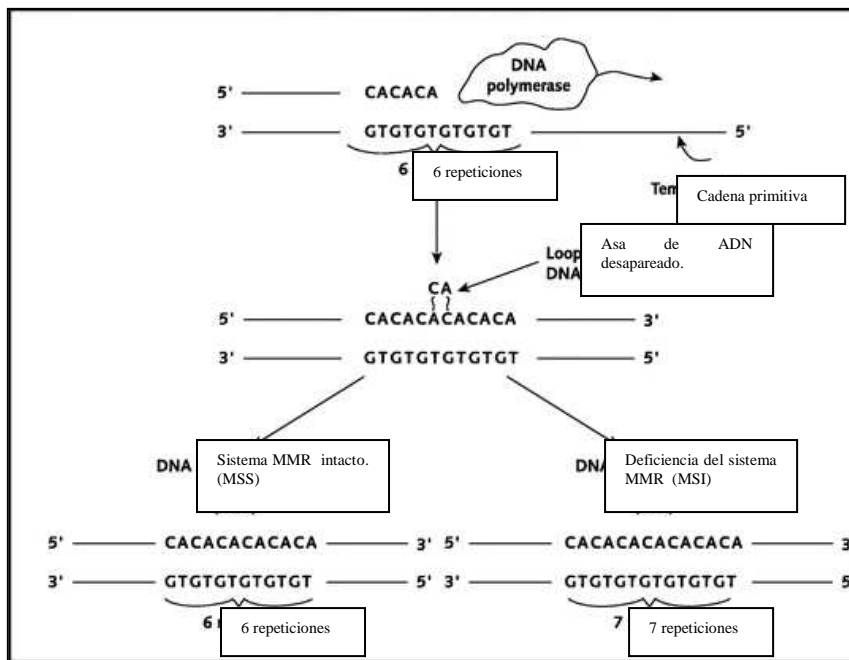
La alteración de *MSH6* es muy baja, y da como resultado una atenuación de la expresividad del síndrome, con una edad de aparición del cáncer más avanzada (Miyaki et al. 1997), así como una mayor frecuencia de neoplasia uterinas (Marsischky et al. 1999; Wijnen et al. 1999; Wagner et al. 2001).

#### 3.1.4.2. Inestabilidad de microsatélites.

La inestabilidad de microsatélites (IMS) se debe a un fallo en el sistema de reparación de bases desapareadas en el ADN (Aaltonen et al. 1993). Los microsatélites son secuencias cortas y repetitivas en el ADN, que no tienen porqué codificar genes, que son más susceptibles de acumular errores cuando el sistema de reparación está alterado, como sucede en el síndrome de Lynch. En este caso manifiestan expansiones y contracciones, lo que se denomina IMS (Ionov et al. 1993; Peltomaki et al. 1993b; Thibodeau et al. 1993; Aaltonen et al. 1994) (Figura I.12.).

La IMS se utiliza como marcador de la deficiencia del sistema MMR, de tal manera que se recomienda el análisis de la misma en todos los CCR diagnosticados en pacientes

que cumplen los criterios de Bethesda (Umar et al. 2004). Así, más del 90% de los CCR de las familias con criterios de Ámsterdam la presentan, aunque pese a esta sensibilidad, la especificidad no lo es tanto, ya que de todos los CCR con IMS, la mayoría son esporádicos (Jass et al. 2002). Un 15% de los CCR esporádicos la presentan, y en la mayor parte de estos casos la IMS se debe a hipermetilación somática del promotor de *MLH1*, que ocasiona su silenciamiento (Herman et al. 1998; Kuismanen et al. 2000).



**Figura I.12.** Secuencia de microsatélites donde surge la alteración o no según el estado del sistema MMR.

En 1997 se planteó la utilización de un panel de cinco marcadores de microsatélites para la evaluación del ADN, denominado “panel de Bethesda”: BAT25; BAT26; D2S123; D5S346 y D17S250 (Boland et al. 1998). Si dos de los cinco son inestables, el tumor se describe como de alta IMS; si sólo uno, de baja IMS; y si no presenta se considera estable (EMS). Existen varios estudios que plantean el uso exclusivo del BAT26 para el estudio de la IMS (Hoang et al. 1997; Aaltonen et al. 1998; Zhou et al. 1998), tanto por su alta sensibilidad como por su ínfima variación inter e intraindividuos (Dietamaier et al. 1997; Hoang et al. 1997).

Los CCR con alta IMS muestran características diferenciadoras. Entre ellas cabe destacar: patrón de diferenciación histológica pobre, localización predominante proximal al ángulo esplénico, mayor invasión parietal y menor frecuencia de extensión ganglionar y hematogena. Además, estos tumores presentan un mejor pronóstico tras cirugía, una peor respuesta al fluorouracilo y su frecuente asociación con tumores sincrónicos y/o metacrónicos (Thibodeau et al. 1993; Gryfe et al. 2000; Hemminki et al. 2000; Wright et al. 2000; Watanabe et al. 2001; Greenson et al. 2003; Jeong et al. 2003; Ribic et al. 2003; Storojeva et al. 2005).

#### 3.1.4.3. Diagnóstico molecular.

Actualmente se utilizan los criterios clínicos, el análisis de IMS y el estudio de expresión de las proteínas de reparación de bases desapareadas mediante inmunohistoquímica, para seleccionar las familias susceptibles de estudio de los genes del sistema MMR.

En caso de cumplir los criterios de Bethesda, el tumor debe ser analizado mediante IMS y/o inmunohistoquímica. No obstante, éste último no ha de sustituir al primero mientras no se hayan esclarecido el papel de otros supuestos genes que intervendrían en el síndrome de Lynch. Existen protocolos que de inicio recomiendan el estudio de IMS, y si ésta es baja o alta, a continuación realizar la inmunohistoquímica con objeto de orientar el análisis del gen cuya expresividad para la proteína se halle alterada. En caso de cumplir los criterios de Ámsterdam tal vez la inmunohistoquímica previa al estudio de la mutación del gen correspondiente sería una de las opciones, aunque no debemos olvidar la importancia de la IMS, tanto en lo relacionado al pronóstico y tratamiento, como en la posibilidad de una nueva vía de carcinogénesis, como se ha mencionado anteriormente, en aquellas familias Ámsterdam-I con EMS (Lindor et al. 2005; Llor et al. 2005; Valle et al. 2007).

Por todo ello, aún continúa la búsqueda de nuevos criterios o marcadores que sirvan para seleccionar, con una mayor sensibilidad y especificidad, las familias portadoras de mutación relacionada con el síndrome de Lynch.

### 3.1.5. Cribado del CCHNP.

Está dirigido a identificar y reseca los pólipos adenomatosos, así como la detección precoz de los CCR (Winawer et al. 2003) por medio de revisiones periódicas. Se considera para aquellos individuos portadores de mutaciones en los genes de reparación, o en los que, sin poseerla, sí tienen una evidencia familiar y clínica importante de CCHNP (Lynch and de la Chapelle 2003; Offit 2004).

Se recomienda la colonoscopia completa anual a partir de los 20-25 años, o 10 años antes de la edad de diagnóstico del CCR en el familiar afecto más joven, seleccionando la opción que antes se produzca (Giardiello et al. 2001; Dunlop 2002; Grady 2003). Un ensayo clínico en individuos de familia con CCHNP a lo largo de 15 años demostró la utilidad del cribado endoscópico, asociándose a una reducción del 62% en la incidencia de CCR y del 66% en la mortalidad global, al compararlo con la no realización del mismo (Jarvinen et al. 2000).

Dentro de las familias con mutación identificada o con alta sospecha de CCHNP, el riesgo de presentar una neoplasia extracolónica es mayor. A este respecto, se recomienda el cribado sistemático de la neoplasia extracolónica más frecuente de forma sistemática, de endometrio, a partir de los 25-35 años (Burke W et al. 1997; Smith et al. 2003), que consiste en la realización de una ecografía transvaginal (endometrial y ovárica) anual, aspirado endometrial y CA-125 (con estas pruebas también se engloba el cribado del cáncer de ovario). En aquellas familias en las que existe una mayor agregación de otra neoplasia extracolónica, se determina la necesidad de la realización del cribado periódico de la misma (Burke W et al. 1997).

### 3.1.6. Tratamiento quirúrgico.

Debido al riesgo de CCR metacrónicos, la progresión más rápida de adenoma a carcinoma y la posibilidad de lesiones planas precursoras, difíciles de tratar endoscópicamente, algunos grupos recomiendan la colectomía total o proctocolectomía para el tratamiento del CCR en pacientes portadores de mutación (Burke et al. 1997). La colectomía profiláctica en individuos a riesgo o portadores asintomáticos no se recomienda, y sólo podría considerarse en casos de posible incumplimiento del

seguimiento endoscópico (Lynch 1996; Lynch and de la Chapelle 1999; Mecklin and Jarvinen 2005). En mujeres afectas de CCHNP con carcinoma de endometrio se realiza la histerectomía y doble anexectomía; de igual manera, en las portadoras sanas no existen datos a favor ni en contra de la cirugía previa de forma profiláctica (Burke W et al. 1997).

La mitad de los pacientes sometidos a resección colónica segmentaria presentan un segundo CCR a los 10 años (Lynch and de la Chapelle. 2003). Esto, junto con la posibilidad de desarrollar un CR en el remanente preservado, que es del 12% tras un seguimiento de 12 años (Rodríguez-Bigas et al. 1997b), justifica una vigilancia endoscópica con una periodicidad de 1-3 años, según la edad, patología asociada y el tipo de resección realizada.

### **3.2. Poliposis Adenomatosa Familiar.**

#### **3.2.1. Concepto y variantes.**

La PAF es una enfermedad hereditaria autosómica dominante causada por mutaciones germinales en uno de los alelos del gen supresor *APC* (*adenomatous polyposis coli*), localizado en 5q21, con una penetrancia del 100% (Grodin et al. 1991). En el 80-90% de las familias que presentan la forma clásica se identifica una mutación en el gen *APC* (Powell et al. 1993).

Su incidencia es de 1 caso por 10.000-20.000 habitantes (Dunlop 2002). Se caracteriza por la presencia de múltiples pólipos adenomatosos (más de 100) distribuidos a lo largo de todo el intestino grueso. El desarrollo de los mismos suele iniciarse a partir de la pubertad, siendo a los 30-35 años cuando ocasionan sintomatología (Rustgi 1994). La PAF presenta un alto potencial de malignización ya que, sin cirugía, el 100% de los pacientes desarrollan CCR antes de los 50 años (Rustgi 1994; Bishop and Hall. 1994), estando dicho potencial relacionado con el número de pólipos (Fearnhead et al. 2001). Además pueden aparecer manifestaciones extracolónicas como son: hipertrofia congénita del epitelio retiniano pigmentado, tumores del tracto gastrointestinal superior, quistes epidermoides de piel, tumores osteoides benignos, hepatoblastoma, carcinoma



papilar de tiroides y tumores adrenocorticales. (Gardner 1962; Harned and Williams 1982; Diaz-Llopis and Menezo 1988; Jagelman et al. 1988; Hughes and Michels 1992)

La PAF atenuada es una variante que se caracteriza por un número menor de pólipos (20-100), con localización preferente en el colon derecho, y con una edad de presentación del CCR 10 años más tardía que en la PAF clásica (Lynch et al. 1995). Es debida a mutaciones en los extremos 5' y 3' del gen *APC* (Giardiello et al. 1997; Gardner et al. 1997; Brensinger et al. 1998; Soravia et al. 1998), aunque sólo un 10% de las familias presentan mutaciones en dicho gen (Lamlum et al. 2000). Las manifestaciones extracolónicas son más limitadas (Knudsen et al. 2003).

Es importante tener en cuenta que un porcentaje no desdeñable (30%) de las familias con adenomas múltiples (15-100) que no presentan mutación en el gen *APC* sí lo hacen de forma recesiva en el gen *MYH*. Este síndrome se conoce como Poliposis asociada a *MYH* (Strate and Syngal 2005).

El síndrome de Gardner también es una variante de la PAF en la que, además de adenomas y pólipos hiperplásicos gastroduodenales, existen tumores de partes blandas y osteomas, entre otros (Grady 2003).

Por último, en el síndrome de Turcot se desarrollan tumores del sistema nervioso central, generalmente gliomas malignos o meduloblastomas. Es debido a mutaciones en *APC*, aunque también se han descrito casos asociados a mutaciones en los genes reparadores del ADN (Hamilton et al. 1995).

### 3.2.2. **Cribado de la Poliposis Adenomatosa Familiar.**

El cribado de los casos de PAF asintomática en comparación con aquellos en que el diagnóstico del CCR se efectúa en fase sintomática reduce la mortalidad por la neoplasia (Giardiello et al. 2001; Dunlop 2002; 133; Grady 2003; Jarvinen 2003). A los familiares a riesgo se ha de ofrecer una sigmoidoscopia anual desde los 13-15 años hasta los 30-35 años, y después cada 5 años, hasta los 50-60 años (Giardiello et al. 2001; Dunlop 2002). Sólo si se sospecha una forma atenuada, el inicio se retrasa hasta

los 15-25 años, según la edad de presentación de los familiares, aunque en este caso la colonoscopia debe ser completa, por la tendencia a localizarse en el colon derecho.

### 3.2.3. Tratamiento de la afectación colorrectal.

En los pacientes afectos de PAF es necesaria una cirugía profiláctica antes de los 25 años de edad (Giardiello et al. 2001; Dunlop. 2002). La elección de la técnica quirúrgica (proctocolectomía con reservorio ileal y anastomosis ileoanal o colectomía con anastomosis ileorrectal) dependerán de la edad de diagnóstico, del fenotipo y de la historia familiar. El propio paciente también decidirá sobre la misma una vez que se le informe de forma exhaustiva de los riesgos y beneficios de cada una de ellas.

Una vez llevada a cabo la cirugía, se recomienda un seguimiento endoscópico, con una periodicidad de 6-12 meses para aquellos con remanente rectal, y 3-5 años para los portadores de reservorio ileal (Giardiello et al. 2001; Lynch and de la Chapelle 2003).

La administración de AINES (sulindaco, celecoxib) en la PAF sólo está aceptada como terapia adyuvante a la cirugía en pacientes con pólipos residuales y nunca como alternativa a ésta (Castells y Marzo 2004) .

### **3.3 Otros síndromes.**

Existen otros síndromes en los que el CCR es uno de los rasgos clínicos, como el Síndrome Peutz-Jeghers, autonómico dominante, en el que, aparte de pólipos hamartomatosos y pigmentación mucocutánea característica, existe riesgo de desarrollo de diferentes tumores. También se encuentra la Poliposis Juvenil Familiar y el síndrome PTEN-tumores hamartomatosos, entre otros, con riesgos variables de desarrollo de CCR, así como otras manifestaciones extracolónicas. Una detallada descripción de los mismos se puede encontrar en el libro “Cáncer Hereditario” (Alonso et al. 2006).

## 4. CÁNCER COLORRECTAL EN EL ADULTO JOVEN.

### 4.1 Características clínicas.

El CCR de aparición precoz es relativamente infrecuente, con una incidencia del 2-8% de todos los CCR (Parramore et al. 1998; Losi et al. 2005). Este grupo de pacientes representa un abanico heterogéneo, que engloba desde aquellos con una importante carga familiar de CCR (en algunos casos hasta el 50% de los menores de 40 años con CCR presentan al menos un familiar también afecto), hasta otros que son sólo casos esporádicos. La edad de corte para definir dicho grupo varía según los estudios, situándose especialmente entre los 40 y los 50 años de edad. También son diversas tanto las características anatomoclínicas como moleculares.

La historia natural y el pronóstico del CCR de inicio precoz son controvertidos. Existe controversia en la mayor parte de los aspectos anatómo-clínicos (Liang et al. 2003). Partiendo de esta premisa, existe un predominio de tumores de bajo grado de diferenciación, mucinosos, con un mayor porcentaje de tumores sincrónicos y/o metacrónicos. Cuando se suma la característica de IMS, en este subgrupo de CCR destaca también la proporción mayor de tumores a nivel del colon derecho y el diagnóstico a una edad más precoz (Chung et al. 1998; Guillem et al. 1999; Lynch and de la Chapelle. 1999; Gryfe et al. 2000; Liang et al. 2003; Chiang et al. 2003). En cambio, del grupo de CCR de inicio precoz que presenta EMS apenas existen datos. El pronóstico también es variable, ya que, mientras unas publicaciones apuntan a ser más favorable en los IMS (Gryfe et al. 2000) o con características de CCHNP (Guillem et al. 1999), otros indican que ya el factor “edad precoz” lleva intrínsecamente un peor pronóstico (Chung et al. 1998). En los CCR en adulto joven esporádicos, el pronóstico también empeora, y hay un menor porcentaje de CCR diagnosticados en fases más tempranas (Chiang et al. 2003).

Desde el punto de vista terapéutico, el manejo es similar al del CCR esporádico, aunque hay que tener en cuenta además que se recomienda la cirugía radical en aquellos pacientes con CCR de edad precoz al diagnóstico, y que asocien características moleculares y/o familiares de CCHNP, debido al riesgo importante de desarrollar tumores metacrónicos en la evolución futura (Guillen et al. 1999).

Pese a todo, la importancia de este tipo de tumor se demuestra en que a partir de un estudio basado en la experiencia de dos registros de cáncer de USA [el “National Program for Cancer Registries” (NPCR) y el “Surveillance, Epidemiology and End Results” (SEER)], se subraya el impacto sustancial que tiene el CCR en el adulto joven, ya que el CCR se halla entre los 10 cánceres más frecuentes que afectan a individuos entre 20 y 49 años de cualquier raza. Este estudio también insiste en la diferenciación clínico-patológica que existe con el CCR en el anciano (Fairley et al. 2006).

#### **4.2 Características moleculares.**

Esencialmente se han valorado dos vertientes de los aspectos moleculares de este tipo de neoplasias: la proporción de casos relacionados con el síndrome de Lynch y sus características (IMS); y ciertos marcadores moleculares relacionados con las vías de carcinogénesis del CCR asociada a la inestabilidad cromosómica (INC).

En el primer caso, relacionada con la vía de carcinogénesis del CCR que viene representada por la inestabilidad de microsatélites, la frecuencia de casos de CCHNP es mayor. Se estima que el 15-20% de todos los CCR poseen un componente familiar o hereditario. Este grupo posee como característica la edad precoz de desarrollo del CCR, siendo la media en algunas formas, como es el caso del síndrome de Lynch, de 46 años de edad (Vasen et al. 1995). Como ya se ha mencionado, dicho síndrome posee como base molecular una alteración hereditaria en los genes del sistema MMR, y la consiguiente IMS. En el CCR de aparición precoz, el intervalo de edad situado entre los 40-45 años llega a alcanzar el 15-20% de casos de CCHNP (Hall et al. 1994; Fante et al. 1997; Guillem et al. 1996). Más aún varios estudios muestran que en pacientes con CCR a una edad igual o menor de 40 años de edad, del 47 al 60% de ellos llegan a mostrar IMS positiva en los tumores, y una cuarta parte presentan mutaciones en los genes de reparación del ADN (Lukish et al. 1998; Dunlop et al. 1997; Liu et al. 1995). En estos casos el número de mutaciones no depende de la carga familiar de los sujetos.

En otro extremo se encuentran los tumores con predominio de la vía de la INC, que presentan EMS en el CCR. Al igual que en los casos esporádicos, se ven alterada la expresión de los genes del APC, la  $\beta$ -catenina y el *p53* (Losi et al. 2005). Sin embargo,

dentro de este subgrupo nos encontramos con que algunos tumores presentan aneuploidía (Georgiades et al. 1999; Hawkins et al. 2001), característica propia de la INC, mientras que otros, al contrario, muestran diploidía, que en principio se supone propia de la IMS (Boardman et al. 2007). Esta posible diferenciación de fenotipo de los tumores EMS en adulto joven en INC + e INC -, sugieren un mecanismo distinto de la EMS, que incluso se ha sugerido que podría definir un CCR hereditario dentro de la población de CCR diploides EMS de inicio precoz (Boardman et al. 2007a). Tal vez estas aseveraciones podrían entroncar con lo que se ha visto en estudios recientes, en los que se sugiere la existencia de un Nuevo síndrome de CCR hereditario, caracterizado por EMS, inmunohistoquímica normal para las proteínas del sistema de reparación, la presencia tan sólo de CCR en la familia, así como la ausencia de individuos con neoplasia primaria múltiple (Valle et al. 2007). Abdel-Rahman et al. (2005) a su vez apuntan la posibilidad de la existencia de una vía alternativa de carcinogénesis en los CCR con mutación negativa de los genes de reparación. A pesar de ello, no se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de los diferentes marcadores moleculares que intervienen en la carcinogénesis del CCR en adulto joven, ni de su influencia en la evolución de estos pacientes.

En resumen, existe la necesidad de llevar a cabo un estudio más exhaustivo del CCR en el adulto joven, en especial en España, ya que no existe ninguno en nuestra geografía hasta la fecha. Se trataría de definir características anatómo-clínicas y moleculares del CCR en este grupo de población, y además, poder contestar las cuestiones que surgen de lo antes descrito: ¿Las características del CCR en el adulto joven son semejantes al CCR esporádico, o al relacionado con el síndrome de Lynch? ¿O en realidad existen dos grupos bien diferenciados? Más aún, ¿es posible que al compararlos con un grupo más amplio de CCR, existieran características diferenciadoras del CCR de inicio precoz?



## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**





## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El Cáncer Colorrectal en el adulto joven, a pesar de ser relativamente infrecuente, posee un impacto relevante en la población diana a la que afecta. Además, los conocimientos que existen desde el punto de vista anatómico-clínico son limitados y contradictorios. Los aspectos moleculares, dejando aparte los relacionados con el síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP) – inestabilidad de microsatélites y mutaciones en los genes relacionados -, los son todavía menos. En nuestro medio no existe ningún estudio al respecto, ni de la vertiente anatómico-clínicas, ni de la molecular.

A través de este trabajo se han analizado datos clínicos, patológicos, familiares, inmunohistoquímicos y moleculares de dos series de pacientes pertenecientes al Hospital General Universitario Gregorio Marañón, de Madrid, y al Hospital General de Segovia, con un diagnóstico de Cáncer Colorrectal intervenido a una edad menor o igual de 45 años. Los objetivos que nos hemos propuestos son:

- 1.- Identificar las características clínicas, anatómico-patológicas, familiares, moleculares e inmunohistoquímicas de este subgrupo de población en nuestro medio.
- 2.- Identificar la proporción de sujetos con alteraciones moleculares relacionadas con el síndrome de Lynch, tanto la inestabilidad de microsatélites así como las alteraciones en los genes relacionados (*MLH1* y *MSH2*).
- 3.- Caracterización inmunohistoquímica de los CCR utilizando una serie de anticuerpos frente a proteínas importantes en la adhesión celular, proliferación, apoptosis, ciclo celular, y otras funciones celulares, en micromatrices de tejido.
- 4.- Valorar rasgos diferenciales entre los tumores que presentan IMS y EMS en este grupo de población.
- 5.- Valorar la existencia de diferencias intergeográficas entre los dos subgrupos de procedencia, un Área Sanitaria de Madrid, y de la provincia de Segovia.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. SUJETOS DEL ESTUDIO

##### 1.1. Procedencia.

Los sujetos del estudio tienen dos procedencias. Por un lado aquellos que fueron identificados a partir del Registro de Tumores del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, de Madrid, con el siguiente criterio de inclusión: intervenidos con el diagnóstico de CCR a una edad igual o inferior a 45 años. El periodo de tiempo estudiado en este primer caso fue desde Enero de 1996 a Diciembre de 1998. En el segundo, los sujetos fueron identificados a partir del Registro del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Segovia, con el mismo criterio de inclusión, aunque en el período de tiempo comprendido entre Enero de 2000 y Diciembre de 2005.

##### 1.2. Información recogida.

###### 1.2.1. Información clínica

De cada uno de los casos incluidos en el estudio se recogió tanto información relacionada con el tumor como del paciente:

- Datos clínicos:
  - Sexo.
  - Edad al diagnóstico.
  
- Datos anatómo-patológicos:
  - Localización del tumor colorrectal:
    - Derecha o proximal (desde el ciego hasta el ángulo esplénico).
    - Izquierda o distal (desde el colon descendente hasta el sigma).

Recto o unión recto-sigmoidea.

- Grado histológico de diferenciación: bien, moderado, pobre.
- Producción de moco (mucinoso; con células en anillo de sello).
- Estadio de Astler-Coller modificado.
- Clasificación TNM.
- Presencia de otros CCR sincrónicos o metacrónicos.
- Presencia de pólipos en colon, asociados, antes o después del CCR; tipo y número.

- Datos evolutivos:

- Supervivencia total.
- Supervivencia libre de enfermedad.
- Recidiva y tipo (locorregional y /o a distancia).
- Fallecimiento por cáncer.
- Presencia de neoplasias relacionadas con el CCHNP.
- Presencia de otras neoplasias no relacionadas.

- Datos de tratamiento:

- Únicamente tratamiento quirúrgico.
- Administración de tratamiento adyuvante: quimioterapia, radioterapia, etc.

### 1.2.2. Información familiar.

Se ha contactado con los sujetos incluidos en el estudio (*probandus* o caso índice) o, en caso de fallecimiento, con un familiar de primer grado de ellos. Se concertó una entrevista con varios objetivos. Por una parte, recoger los datos referentes a la estructura y antecedentes de la familia relacionados con enfermedades neoplásicas, tratando de recoger datos de al menos tres generaciones: número y relación de familiares, edades en el momento de la entrevista, fallecimientos y causa, ocurrencia de cánceres, edades al diagnóstico; por otra, se obtenía el consentimiento informado (Anexo 1), con objeto de poder estudiar inicialmente el tejido parafinado del CCR causa de la inclusión.

Más adelante, en los casos en los que, como se verá posteriormente, el estudio de la inestabilidad de microsatélites (IMS) resultaba positivo y/o cumpliera criterios clínicos de Ámsterdam II para el síndrome de Lynch, se volvía a contactar de nuevo con ellos para obtener una muestra de sangre periférica para el estudio de posibles mutaciones de los genes de reparación de errores en el ADN más frecuentes, *MLH1* y *MSH2*. En el caso de que el *probandus* hubiera fallecido, se recogía la muestra del familiar más cercano que hubiera desarrollado CCR o una neoplasia relacionada con el síndrome de Lynch a una edad más temprana, obteniendo a su vez el consentimiento para el mencionado estudio.

A partir de la información que proporciona el árbol genealógico se determina si la familia cumple o no los criterios clínicos de CCR familiar y/o hereditario. A partir de estos datos, se define al sujeto índice según sus antecedentes familiares como:

- Sospecha de síndrome de Lynch (CCHNP).
- Esporádico, en el caso de que sea el único individuo de la familia que haya presentado un CCR y no hay antecedentes familiares de cánceres asociados al síndrome de Lynch.
- Agregación familiar, en el caso intermedio de que no cumpla los criterios clínicos, pero que exista algún otro caso de CCR o cáncer relacionado con el CCHNP en la familia.

## 2. MUESTRAS

### 2.1. Líquidos biológicos.

#### 2.1.1. Sangre periférica.

Como se ha mencionado previamente, sólo en los casos en que la muestra del tumor presentaba IMS y/o la familia cumpliera criterios de Ámsterdam II, se obtuvo una muestra de sangre periférica (15 ml en EDTA) del probando afectado por cáncer colorrectal y/o por un cáncer asociado al síndrome de Lynch. En caso de fallecimiento del mismo, se identificaba al individuo de la familia con mayor probabilidad de ser

portador de mutación para el estudio de los genes relacionados con el síndrome de Lynch.

Para la extracción del ADN genómico de estas muestras se utilizaron protocolos manuales con modificaciones de otros previamente descritos, o protocolos automatizados de obtención de ADN genómico.

#### 2.1.1.1. Extracción manual.

- La sangre extraída se coloca en un tubo de 50 cc, a la que se añade suero fisiológico carbamilfosfato sintetasa hasta completar el volumen, y se agita para homogeneizar.
- Se coloca en centrifugadora a 3.000 revoluciones por minuto (rpm) y a 4°C a lo largo de 15 minutos. Concluido este periodo, se decanta el sobrenadante con el fin de obtener el sedimento de leucocitos.
- Se toma este sedimento y se le añade agua bidestilada estéril hasta completar de nuevo 50 cc, para luego agitar hasta conseguir el desprendimiento del botón de células del fondo del tubo.
- De nuevo se centrifuga a la velocidad, temperatura y tiempo previos, y se obtiene tan sólo el sedimento de leucocitos.
- Se vuelve a repetir la operación de añadir agua bidestilada, pero hasta alcanzar los 25 cc y se agita. Se centrifuga con los mismos parámetros previamente descritos.
- Tras decantar y, una vez obtenido el sedimento de leucocitos, se añade, según el botón de células, un volumen variable de tampón de lisis de leucocitos (4-7 cc), que consiste en 40 cc de NaCl 5M, 4 cc de EDTA (pH 8) 0'25 M, 2'5 cc de Tris 2 M pH 7'5 y agua destilada hasta alcanzar un volumen de 500 cc; 266-466 µl de sodio dodecil sulfato (SDS); y 666-1.166 µl de solución de Proteinasa K (10 mg/ml).
- Se agita con el fin de disgregar el botón de células, para a continuación colocar en incubadora toda la noche a 37°C.
- Se añaden 1'33-2'33 cc de NaCl según los volúmenes usados para la lisis, con el objetivo de precipitar el ADN. Posteriormente se agita y se centrifuga,



variando tan sólo el parámetro de tiempo, que de 15 minutos pasa a 30 minutos. Realizado esto, se sitúa el sobrenadante en un tubo distinto.

- Se añaden dos volúmenes de alcohol etílico absoluto respecto a la cantidad de tampón de lisis de leucocitos empleado, para luego agitar con suavidad, hasta lograr apreciar el ovillo de ADN.
- Con una pipeta Pasteur esterilizada con el extremo en forma de gancho, se coge el ovillo, y se pasa por dos tubos, uno después del otro, de etanol frío al 70%. Mediante esta maniobra se eliminan impurezas. Se deja secar unos instantes para eliminar los restos del etanol.
- Se resuspende en Tris-EDTA (TE) 1:0'1 a pH 8 (solución amortiguadora) o en agua destilada estéril. Se busca la correcta disolución del ADN, por lo que se agita con suavidad durante dos horas a 37°C.

#### 2.1.1.2. Extracción automática.

La extracción de ADN a través del sistema *MagNa Pure LC* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) se lleva a cabo a través de diferentes pasos automatizados:

Con un volumen de 1 cc de sangre periférica, el sistema añade:

- 0'115 cc de solución de Proteinasa K, que logra la digestión de proteínas.
- 0'84 cc de tampón lisis-unión, que ayuda a la lisis celular y consigue la situación salina idónea para luego lograr la retención del ADN.
- 0'54 cc del reactivo MGP, que logra la retención por medio de partículas magnéticas.
- 2'42 cc de tampón de lavado I, que elimina lo que no está unido a dichas partículas, como proteínas, membranas, heparina.
- 1'28 cc de tampón de lavado II, que retira restos celulares y reduce la concentración salina.
- 0,84 cc de tampón de lavado III, que elimina restos de etanol.

Por último, se resuspende el ADN purificado en 200 µl de tampón de disolución calentado.

## **2.2. Tejido incluido en parafina.**

Como se ha mencionado previamente, se recogió tejido tumoral conservado en parafina de cada uno de los *probandi*. Para la obtención de las mencionadas muestras, se contó con la colaboración de los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Gregorio Marañón, de Madrid, y del Hospital General de Segovia. De igual manera, con anterioridad a esto, también se logró el consentimiento informado para el estudio de las mismas.

Con este tejido se realizó el análisis de la IMS, así como la confección de micromatrices de tejido para el estudio inmunohistoquímico.

Es importante tener en cuenta que antes de la extracción de ADN del tejido parafinado, se debe evaluar la proporción de células tumorales y normales. Este paso se realiza mediante una tinción con hematoxilina-eosina. Cuando los tejidos presentaban una proporción de células tumorales inferior al 70%, se trata de separar el tejido tumoral del sano en dos bloques distintos.

### **2.2.1. Tinción hematoxilina-eosina.**

- Tomando el bloque de tejido incluido en parafina, se realiza un corte de 3  $\mu\text{m}$  con un microtomo.
- Se incuba a 70°C durante una hora.
- Se añade xilol a la muestra con objeto de desparafinar, durante 2 minutos, dos veces.
- Se hidrata la muestra con etanol en dos fases. La primera con etanol absoluto durante 2 minutos, y la segunda, al 95% durante el mismo período de tiempo.
- Se lava con agua destilada otros dos minutos.
- Durante 15 minutos se tiñe con hematoxilina de Mayer.
- Se vuelve a lavar mediante el mismo procedimiento previo.
- Se tiñe con eosina durante 2 minutos.
- Se añade etanol al 70% con el fin de eliminar los restos de eosina.

- Por medio de varios pasos sucesivos, se deshidrata la muestra, con etanol al 96% (30 segundos), absoluto (2 minutos), y xilol (2 minutos, dos veces).
- Por último, se monta el cubre con Eukitt o DPX.

### 2.2.2. Extracción de ADN.

- Se colocan tres cortes de 10 µm de tejido en un tubo de 1'5 cc.
- Mediante 1 cc de xilol, incubando 5 minutos a 65°C, se centrifuga a 12.000 rpm 10 minutos, con el fin de desparafinar. Después se retira el sobrenadante.
- Si todavía quedan restos, se repite el paso anterior.
- Se añade 1 cc de etanol absoluto y se incuba 5 minutos a 65°C.
- Se centrifuga con los mismos parámetros previos y se retira el sobrenadante.
- Se añade 1 cc de etanol, aunque ahora al 50%, y se incuba 5 minutos a 65°C.
- Se realiza la misma operación de centrifugado, retirando el sobrenadante, para posteriormente dejar secar hasta que no queden restos de etanol.
- Se añaden 400 µl de tampón (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 2'5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0'45% *Nonidet P40*, 4'5% *Tween 20*) y 40 µl (1/10 de volumen de tampón) de Proteinasa K (10 mg/ml).
- Se incuba a 55°C, el tiempo necesario hasta que no se observen restos de tejido.
- Si pese a los pasos previos, y tras varias horas de incubación, quedan restos sin digerir, se debe añadir cantidades equivalentes de tampón y Proteinasa K, o centrifugar brevemente y separar el sobrenadante.
- A continuación se coloca el sobrenadante en un tubo de purificación *Phase Lock Gel<sup>TM</sup> Light* (Eppendorf AG, Alemania) y se añade un volumen (440 µl) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
- Incubar en rotación durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar a 12.000 rpm, 5 minutos.
- Recuperar la fase acuosa (superior), pasarla a un tubo nuevo *Phase Lock Gel<sup>TM</sup> Light* y añadir un volumen (440 µl) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Una vez hecho esto, se incuba de nuevo en rotación de igual forma que la previa y después se centrifuga con los mismos parámetros que en el paso previo.

- De nuevo se recupera la fase acuosa en un tubo de 1'5 ml y se añade en esta ocasión un volumen (440 µl) de cloroformo. Por tercera vez se incuba en rotación y centrifuga, para luego recoger la fase acuosa en un tubo de 1'5 ml.
- Se suma 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto frío. A continuación se deja precipitar el ADN a -20°C durante toda la noche.
- Se centrifuga a 12.000 rpm, 15 minutos a 4°C y se retira el sobrenadante. Acto seguido se lava con 1 ml de etanol frío al 75%.
- Misma maniobra de centrifugación a 12.000 rpm, aunque ahora 10 minutos, a 4°C, retirando el sobrenadante y dejando secar con el fin de eliminar los restos de etanol.
- Por último, se resuspende el botón de ADN en TE (pH 8) o en agua destilada estéril.

### 3. VALORACIÓN DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN.

Una vez obtenido el ADN, es esencial la comprobación de la calidad y cantidad del mismo, mediante la electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1'2%. El proceso se describe a continuación:

- Se colocan 0'3 g de agarosa (Agarosa Media, Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid) y 30 cc de tampón TBE 1X (Tris, ácido bórico, EDTA) en un matraz de 250 cc de capacidad. Se lleva a ebullición en un microondas hasta que se funda la agarosa.
- Tras dejar que se atempere, se añaden 3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml).
- La disolución se dispersa en una bandeja, sellada por los extremos con cinta adhesiva, y luego se coloca un peine cerca del borde, donde quedarán los pocillos de carga. Una vez hecho esto, se deja que el gel solidifique.
- Se retiran la cinta adhesiva y el peine, para luego colocar el gel en una cubeta de electroforesis horizontal (Laboratorios Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña), cubriéndolo con TBE 1X.
- En lo pocillo del gel se cargan 2 µl de muestra junto con el tampón de carga (glicerol, azul de bromofenol, xilencianol), para acto seguido, conectar una fuente de alimentación a la cubeta y dejar migrar las muestras.

- El gel se visualiza en un transiluminador de luz ultravioleta (*GelDoc 2000*, Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña).

La concentración y grado de pureza del ADN se estima a través de un espectrofotómetro de luz ultravioleta *Beckman DU530* mediante el siguiente proceso:

- Se prepara una dilución 1:200 del ADN extraído (2 µl en un volumen final de agua destilada de 400 µl). Dicha dilución se coloca en una cubeta de cuarzo, recogiendo medidas con el espectrofotómetro de la densidad óptica a 260 nm y a 280 nm de longitud de onda.
- Se aplica la fórmula siguiente para el cálculo de la concentración:

$$C = \frac{\text{Abs}_{260} * 100 * \text{factor de dilución (200)}}{L}$$

C: la concentración (µg/ml); Abs<sub>260</sub>: absorbancia de la muestra a 260 nm;

L: coeficiente de extinción molar bicatenario (0'02 µg/ml).

- La pureza del ADN se estima por medio de la relación de absorbancia a 260 nm y a 280 nm. El rango óptimo se sitúa entre 1'8 y 2.

#### 4. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TEJIDO TUMORAL

##### 4.1. Microsatélite BAT26.

###### 4.1.1. Reacción de PCR.

Para el estudio de la IMS mediante el marcador BAT26 se lleva a cabo una reacción de PCR (Polimerasa Chain Reaction) con los cebadores y condiciones que se detallan en las siguientes líneas.

Los cebadores se adquirieron a través de *Sigma-Genosys Ltd* (Cambridgeshire, Gran Bretaña, <http://orders.sigma-genosys.eu.com/>). El cebador sentido está marcado en 5' con el fluorocromo TET (\*), siendo la secuencia de los mismos la siguiente:

Sentido: 5' - \*TGACTACTTTTGA CTTCAGCC - 3'

Antisentido 5' - AACCATTC AACATTTT TAACCC - 3'

La mezcla de PCR se prepara en un tubo de 0.2 ml con las siguientes cantidades:

- |   |        |
|---|--------|
| • Tampón PCR 10X con MgCl <sub>2</sub> (Roche)              | 2'5 µl |
| (KCl 50 mM, Tris 10 mM y 1'5 mM de MgCl <sub>2</sub> )      |        |
| • dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (1'25 mM)                  | 4 µl   |
| • Cebador sentido (10 mM)                                   | 0'7 µl |
| • Cebador antisentido (10 mM)                               | 0'7 µl |
| • ADN de tejido tumoral parafinado (100 ng)                 | X      |
| • ADN Taq polimerasa 5 U/µl (Roche)                         | 0'2 µl |
| • H <sub>2</sub> O destilada (hasta volumen final de 25 µl) | Y      |

Se considera X al volumen de la dilución de ADN necesario para obtener una cantidad de éste de 100 ng. El volumen de agua (Y) que se requiera para completar el volumen total hasta 25 µl, dependerá del valor de X.

Para las reacciones de amplificación se empleó un termociclador *GeneAmp® 9700* (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) con los siguientes parámetros:

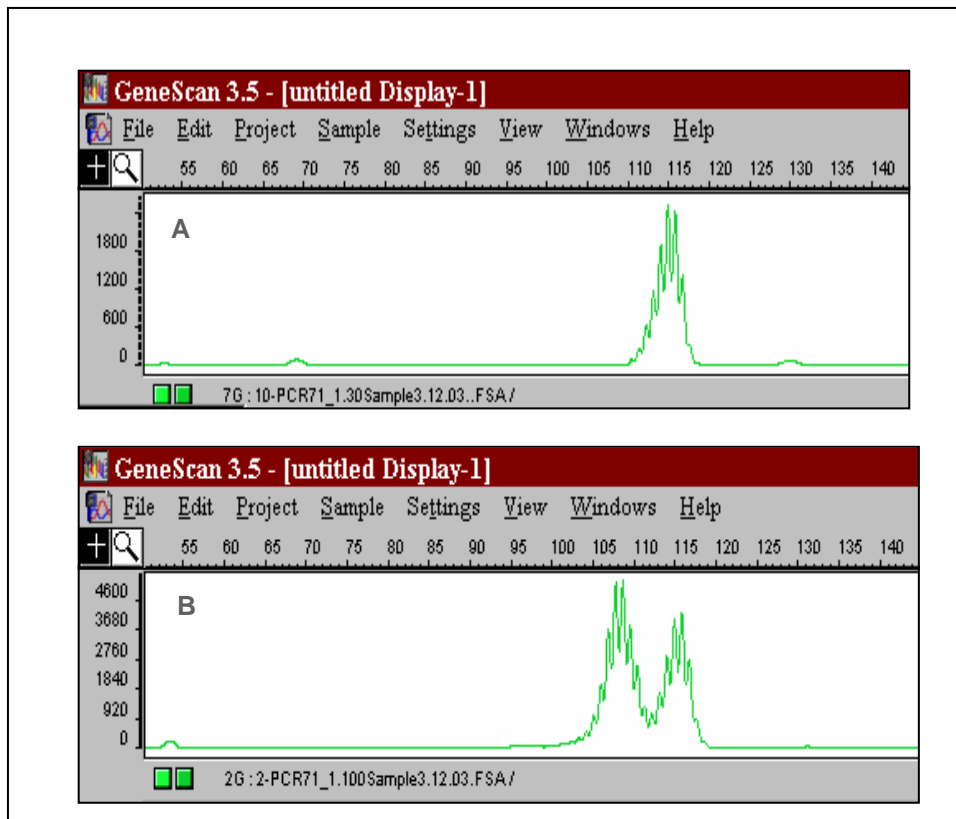
|                |             |
|----------------|-------------|
| 94°C.....5'    | } 35 ciclos |
| 94°C.....45"   |             |
| 56°C.....1'    |             |
| 72°C.....1'30" |             |
| 72°C.....7'    |             |

El producto resultante de la PCR es un fragmento de 116 pares de bases. Para confirmar que la reacción ha sido llevada a cabo de forma adecuada y que, por lo tanto, el ADN se ha amplificado y que el fragmento obtenido es el esperado, se realiza la siguiente comprobación: se cargan 5µl del producto obtenido en un gel de agarosa al 2'5% teñido

con bromuro de etidio y se dejan migrar, para visualizarlo posteriormente en un transiluminador de luz ultravioleta. Mediante este proceso, no sólo se consigue el objetivo buscado, sino que permite calcular la cantidad de producto de PCR. Anteriormente, la visualización de los productos de la reacción de PCR se hacía mediante geles de poliacrilamida, de mayor resolución, por lo que el proceso, el cálculo de dicha cantidad servía para llevar a término la visualización en los mencionados geles.

#### 4.1.2. Visualización.

El análisis de los productos de la PCR se realiza mediante un secuenciador automático *ABI Prism 3700* y el software de análisis es el *GeneScan* versión 3.5 (PE Applied Biosystems) (Figura III.1). Para cada muestra se preparan 15 µl de formamida desionizada, 0'1 µl del marcador de tamaño marcado fluorescentemente con TAMRA 500 y 1 µl de producto de PCR. Esta mezcla se analiza en el secuenciador *ABI Prism 3700*.



**Figura III.1.** Resultado del estudio de IMS de BAT26 mediante *GeneScan* 3.5.

A) Electroferograma de un fenotipo EMS. B) Electroferograma de un tumor que presenta IMS.

Se considera que la muestra presenta IMS cuando aparece un cambio de longitud del microsatélite de más de seis pares de bases, mientras que cuando no hay cambio o si existe, es menor de 6 pares de bases, se valora como EMS.

## 5. ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES DE REPARACIÓN DE LOS ERRORES DE EMPAREJAMIENTO DEL ADN (*MLH1*, *MSH2*)

### 5.1. Análisis de mutaciones en *MLH1* y *MSH2*.

El estudio de la secuencia de *MLH1* y *MSH2* se llevó a cabo en la Unidad de Genética del Hospital Virgen de la Arrixaca en Murcia (Dr. Pablo Carbonell), para las muestras correspondientes al Hospital General Universitario Gregorio Marañón, de Madrid. Las provenientes del Hospital General de Segovia fueron estudiadas en el Laboratorio del Dr. Rogelio González Sarmiento, del Centro de Investigaciones del Cáncer, de la Universidad de Salamanca.

La identificación de las mutaciones de los genes se llevó a cabo por medio de la electroforesis en geles en gradiente desnaturizante (Guldberg and Guttler 1993; Macek et al. 1997).

La PCR empleada es la descrita por Wijnen et al., con diversas modificaciones, tanto los cebadores y las condiciones de la PCR, como las de la electroforesis (Wijnen et al. 1995; Wijnen et al. 1996) (Tablas III.1 y III.2).

Es necesario destacar dos elementos que aparecen en la reacción de amplificación: Una “pinza CG”, que se une en el extremo 5' a uno de los cebadores con objeto de estabilizar la doble hebra de ADN, y evitar así la total desnaturización en el proceso de electroforesis; y en el otro cebador se añade una secuencia M13, que sirve como molde para secuenciar aquellos fragmentos con patrones anómalos de migración.



Las secuencias de la “pinza CG” y de M13 son las siguientes:

-Pinza CG:

5' - CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCC - 3'

-M13:

5' - GCCAGTCGACGTTGTAAAACGACG - 3'

**Tabla III.1.** Estudio de mutaciones del gen *MLH1*. Cebadores empleados para la amplificación de los exones y regiones intrónicas adyacentes, tamaños de los fragmentos amplificados en pares de bases y condiciones desnaturalizantes de los geles.

| Exón | Cebadores   | Tamaño (pb) | Gradiente desnaturalizante |
|------|---|-------------|----------------------------|
| 1    | (M13) 5' - AGACGTTTCCTTGGCTCTTC - 3'<br>(Pinza CG) 5' - CCGTTAAGTCGTAGCCCTTA - 3'           | 257         | 50-70%                     |
| 2    | (Pinza CG) 5' - TTTTCTGTTTGATTTGCCAG - 3'<br>(M13) 5' - CGCACAAACATCCTGCTACT - 3'           | 210         | 30-50%                     |
| 3    | (Pinza CG) 5' - TGGAAAAATGAGTAACATGATT - 3'<br>(M13) 5' - CAACAGGAGGATATTTTACACA - 3'       | 255         | 30-50%                     |
| 4    | (Pinza CG) 5' - TTCCTTTTTCTTTCAGTCTATTT - 3'<br>(M13) 5' - TGAATATATATGAGTAAAAGAAGTCAG - 3' | 207         | 30-50%                     |
| 5    | (Pinza CG) 5' - TCTCTCTACTGGATATTAATTTGTT - 3'<br>(M13) 5' - AAGCTTCAACAATTTACTCTCC - 3'    | 214         | 30-50%                     |
| 6    | (M13) 5' - CAAGAAAAATCAATCTTCTGTT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - ATGACAAATCTCAGAGACCC - 3'         | 223         | 30-50%                     |
| 7    | (M13) 5' - TCTAGTGTGTGTTTTTGGCA - 3'<br>(Pinza CG) 5' - AACAAAACCATCCCCATAA - 3'            | 194         | 30-50%                     |
| 8    | (M13) 5' - AATCCTTGTGTCTTCTGCTG - 3'<br>(Pinza CG) 5' - AAAGATTTTTTTATATAGGTTATCG - 3'      | 217         | 30-50%                     |
| 9    | (M13) 5' - CAAAAGCTTCAGAATCTCTTT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - TTTCCCATGTGGTTCTTTTT - 3'          | 233         | 30-50%                     |
| 10   | (M13) 5' - GGACAGTTTTGAACTGAGTTG - 3'<br>(Pinza CG) 5' - GTCTTGTTGAGGAGTTTGG - 3'           | 227         | 30-50%                     |
| 11   | (M13) 5' - AAGGTAATTGTTCTCTTATTTT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - CACAAGTAGCTGGATGAGAA - 3'         | 280         | 30-50%                     |
| 12   | (Pinza CG) 5' - TAATACAGACTTTGCTACCAGGA - 3'<br>(M13) 5' - GGTAGGCTGTACTTTTCCCA - 3'        | 473         | 30-50%                     |
| 13   | (Pinza CG) 5' - CTGCACTTCCTTTTCTTCAT - 3'<br>(M13) 5' - CCCTATGCATCCCAGGCA - 3'             | 270         | 30-50%                     |
| 14   | (Pinza CG) 5' - TGTTTTTGGTTTTATTTTTTG - 3'<br>(M13) 5' - TCTGCTTGTTCCACACTCA - 3'           | 232         | 30-50%                     |
| 15   | (Pinza CG) 5' - AATTCAGCTTTTCCTTAAAGTC - 3'<br>(M13) 5' - AAATTCAGAAGTAAAAGGA - 3'          | 200         | 30-50%                     |
| 16   | (M13) 5' - CTCCTTCATGTTCTTGCTTC - 3'<br>(Pinza CG) 5' - AGAAGTATAAGAATGGCTGTCA - 3'         | 280         | 30-50%                     |
| 17   | (Pinza CG) 5' - TTCCCTTGCCTTTTTCTCG - 3'<br>(M13) 5' - CATGTACCGAATGCTTAGTA - 3'            | 222         | 30-50%                     |
| 18   | (Pinza CG) 5' - TAAATTCGTACCTATTTTGAGG - 3'<br>(M13) 5' - CCTGGGGTGCCAGTGTGCAT - 3'         | 251         | 15-30%                     |
| 19   | (M13) 5' - GGAGGCTTATGACATCTAATG - 3'<br>(Pinza CG) 5' - AAGAACACATCCCACAGTGC - 3'          | 300         | 30-50%                     |

**Tabla III.2.** Estudio de mutaciones del gen *MSH2*. Cebadores empleados para la amplificación de los exones y regiones intrónicas adyacentes, tamaños de los fragmentos amplificados en pares de bases y condiciones desnaturalizantes de los geles.

| Exón | Cebadores  | Tamaño (pb) | Gradiente desnaturalizante |
|------|--|-------------|----------------------------|
| 1    | (M13) 5' - TCGCGCATTCTTCAACC - 3'<br>(Pinza CG) 5' - GTCCCTCCCCAGCACGC - 3'                  | 277         | 50-70%                     |
| 2    | (Pinza CG) 5' - TTGAACATGTAATATCTCAAATCTGT - 3'<br>(M13) 5' - AAAGGAAGATAATTACCTTATATGC - 3' | 283         | 15-50%                     |
| 3    | (M13) 5' - TCAAGAGTTTGTTAAATTTTTAAAA - 3'<br>(Pinza CG) 5' - CTAGGCCTGGAATCTCCTCT - 3'       | 421         | 30-50%                     |
| 4    | (Pinza CG) 5' - TTCCTTTTCTCATAGTAGTTTAAAC - 3'<br>(M13) 5' - TTGTAATTCACATTATAATCCATG - 3'   | 280         | 15-50%                     |
| 5    | (M13) 5' - CCAGATGGTATAGAAATCTTCG - 3'<br>(Pinza CG) 5' - CCATTCAACATTTTTAACCCCTT - 3'       | 308         | 15-30%                     |
| 6    | (M13) 5' - GCTTGCCATTCTTTCTATTTTATT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - GCAGGTTACATAAACTAACGAAAG - 3'    | 277         | 30-50%                     |
| 7    | (M13) 5' - CATTAAATCAAGTTAATTTATTTC - 3'<br>(Pinza CG) 5' - AAAACAAAATCACTTGTACCTTCA - 3'    | 309         | 30-50%                     |
| 8    | (M13) 5' - TGAGATCTTTTTATTTGTTTGT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - TTTGCTTTTTAAAAATACTACTGC - 3'      | 263         | 15-50%                     |
| 9    | (M13) 5' - GGATTTTGTCACTTTGTTCTGTT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - TCCAACCTCCAATGACCCAT - 3'         | 241         | 30-50%                     |
| 10   | (M13) 5' - TGGAATACTTTTTCTTTCTTCTT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - GCATTTAGGGAATTAATAAAGGG - 3'      | 298         | 30-40%                     |
| 11   | (Pinza CG) 5' - ATAAACTGTTATTTTCGATTTGCA - 3'<br>(M13) 5' - CCAGGTGACATTCAGAACATT - 3'       | 227         | 30-50%                     |
| 12   | (Pinza CG) 5' - TTATTATTCAGTATTCCTGTGTACA - 3'<br>(M13) 5' - CCCACAAAGCCCAAAACC - 3'         | 388         | 30-50%                     |
| 13   | (Pinza CG) 5' - ATAATTTGTTTTGTAGGCC - 3'<br>(M13) 5' - TTTCTATCTTCAAGGACTAGGAG - 3'          | 318         | 30-50%                     |
| 14   | (Pinza CG) 5' - CCACATTTATGTGATGGGAA - 3'<br>(M13) 5' - CCAATAGTACATACCTTTCTTACC - 3'        | 370         | 30-50%                     |
| 15   | (M13) 5' - GTCCCCTCACGCTTCCC - 3'<br>(Pinza CG) 5' - AACTATGAAAACAACTGACAAAC - 3'            | 295         | 30-50%                     |
| 16   | (M13) 5' - AATGGGACATTCACATGTGTT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - CCATGGGCACTGACAGTTAA - 3'           | 369         | 15-30%                     |

En todos los exones, los componentes y condiciones de la PCR son iguales, y se enuncian a continuación:

|  |        |
|--|--------|
| • Tampón PCR 10X (BioTaq)                                | 2'5 µl |
| • dNTPs (1'25 mM)  | 2 µl   |
| • Cebador sentido (10 µM)                                | 2'5 µl |
| • Cebador antisentido (10 µM)                            | 2'5 µl |
| • ADN (50 ng)  | X      |
| • ADN Taq polimerasa (1 U) (BioTaq)                      | 2 µl   |
| • H <sub>2</sub> O destilada (hasta volumen final 25 µl) | Y      |

El volumen de dilución de ADN que se necesita para obtener 50 ng de éste se considera X, mientras que Y es el volumen de agua que se requiere para alcanzar un volumen total de 25 µl, y por tanto, depende de X.

Las reacciones de amplificación se llevan a cabo con los siguientes parámetros:

|                |             |
|----------------|-------------|
| 94°C.....5'    |             |
| 94°C.....1'    | } 35 ciclos |
| 58°C.....1'30" |             |
| 72°C.....2'    |             |
| 72°C.....10'   |             |

Los productos de PCR se someten a una electroforesis vertical en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en un sistema *Dcode* (Bio-Rad). Una solución es 100% desnaturizante cuando presenta una concentración de urea 7 M y 40% de formamida. Se describen las condiciones desnaturizantes para cada exón de *MLH1* y *MSH2* en las Tablas III.1 y III.2, respectivamente.

La electroforesis vertical se realiza a temperatura constante de 65°C durante 18 horas con una intensidad de corriente de 17 mA. Finalizada la electroforesis, el gel se tiñe con

bromuro de etidio durante 15 minutos y se visualiza en un transiluminador de luz ultravioleta (*GelDoc 2000*, Bio-Rad).

Como se ha señalado con anterioridad, los fragmentos que manifiestan un patrón anómalo de migración se secuencian empleando como cebador la secuencia complementaria de M13.

La nomenclatura utilizada para la descripción de las variaciones de secuencia identificadas es la recomendada por den Dunnen y Antonarakis (2001), y se encuentra disponible en: [http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/docs//mut\\_nom.html](http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/docs//mut_nom.html).

## **5.2. Análisis de grandes deleciones genómicas.**

El estudio de grandes deleciones genómicas de los genes *MLH1* y *MSH2* se realiza mediante la técnica de amplificación por PCR *multiplex* dependiente de ligación (*MLPA*).

SALSA P003 *MLH1/MSH2* es la forma comercial de *MLPA* para el estudio completo de los exones de los genes *MLH1* y *MSH2* (MRC-Holland, Ámsterdam, Holanda). Presenta una mezcla de 42 sondas diferentes: una para cada uno de los 19 exones de *MLH1*, una para cada uno de los 16 exones de *MSH2* y 7 sondas que se utilizan como controles, y que corresponden a otros genes humanos localizados en distintos cromosomas (Tabla III.3).

**Tabla III.3.** Sondas utilizadas en el producto comercial de MLPA, SALSA P003 *MLH1/MSH2*, para la detección de grandes reordenamientos de los genes *MLH1* y *MSH2*. Se indica la longitud de cada sonda y el exón del gen en el que se localiza, así como las sondas control y su localización cromosómica.

| Longitud<br>(nucleótidos) | Sonda MLPA                          | Posición cromosómica |             |             |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------|-------------|
|                           |                                     | Control              | <i>MLH1</i> | <i>MSH2</i> |
| 94                        | Sonda control sintética             | 2q14                 |             |             |
| 130                       | Sonda control 0797-L0463            | 5q31                 |             |             |
| 136                       | Sonda control 0981-L0566            | 10p11                |             |             |
| <b>142</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0886-L0474</b> |                      | exón 1      |             |
| <b>148</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 1027-L0599</b> |                      |             | exón 1      |
| <b>154</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 1008-L0577</b> |                      | exón 2      |             |
| <b>160</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0906-L0494</b> |                      |             | exón 2      |
| <b>166</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0888-L0476</b> |                      | exón 3      |             |
| <b>172</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 1029-L0601</b> |                      |             | exón 3      |
| <b>178</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0889-L0477</b> |                      | exón 4      |             |
| <b>184</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0908-L0496</b> |                      |             | exón 4      |
| 193                       | Sonda control 0976-L0563            | 11p13                |             |             |
| <b>202</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0890-L0478</b> |                      | exón 5      |             |
| <b>211</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0909-L0497</b> |                      |             | exón 5      |
| <b>220</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0891-L0479</b> |                      | exón 6      |             |
| <b>229</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0910-L0498</b> |                      |             | exón 6      |
| <b>238</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0892-L0480</b> |                      | exón 7      |             |
| <b>247</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0911-L0499</b> |                      |             | exón 7      |
| <b>256</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0893-L0481</b> |                      | exón 8      |             |
| <b>265</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0912-L0582</b> |                      |             | exón 8      |
| <b>274</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0894-L0482</b> |                      | exón 9      |             |
| 283                       | Sonda control 0438-L0003            | 17q21                |             |             |
| <b>292</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0913-L0583</b> |                      |             | exón 9      |
| <b>301</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0895-L0483</b> |                      | exón 10     |             |
| <b>310</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0914-L0584</b> |                      |             | exón 10     |
| <b>319</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0896-L0484</b> |                      | exón 11     |             |
| <b>328</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0915-L0503</b> |                      |             | exón 11     |
| <b>337</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0897-L0485</b> |                      | exón 12     |             |
| <b>346</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0916-L0504</b> |                      |             | exón 12     |
| <b>355</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0898-L0486</b> |                      | exón 13     |             |
| <b>364</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 1013-L0575</b> |                      |             | exón 13     |
| 373                       | Sonda control 0681-L0154            | 4q25                 |             |             |
| <b>382</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0899-L0586</b> |                      | exón 14     |             |
| <b>391</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0918-L0506</b> |                      |             | exón 14     |
| <b>400</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0900-0488</b>  |                      | exón 15     |             |
| <b>409</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 0919-L0585</b> |                      |             | exón 15     |
| <b>418</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 1009-L0576</b> |                      | exón 16     |             |
| <b>427</b>                | <b>Sonda <i>MSH2</i> 1053-L0627</b> |                      |             | exón 16     |
| <b>436</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 1030-L0602</b> |                      | exón 17     |             |
| <b>445</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 1031-L0603</b> |                      | exón 18     |             |
| <b>454</b>                | <b>Sonda <i>MLH1</i> 0904-L0492</b> |                      | exón 19     |             |
| 463                       | Sonda control 0979-L0568            | 10p14                |             |             |
| 472                       | Sonda control 0980-L0567            | 11p12                |             |             |

El protocolo que se aplica presenta ligeras modificaciones frente al recomendado por el fabricante:

A- Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas:

- Se diluye el ADN (100 ng) con TE (10 mM Tris-HCl pH 8.2; 1 mM EDTA) hasta alcanzar un volumen de 5 µl.
- La mezcla se desnaturaliza en un termociclador a 98°C durante 5 minutos y atemperar a 25°C.
- Se añade posteriormente 1'5 µl de la mezcla de sondas SALSA y 1'5 µl del tampón MLPA.
- Por último, se mezcla e incuba a 95°C durante un minuto y posteriormente a 60°C, a lo largo de 16 horas.

B- Reacción de ligación:

- La mezcla de ligación se prepara en hielo con los siguientes componentes:
  - 3 µl de Tampón A de la Ligasa 65.
  - 3 µl de Tampón B de la Ligasa 65.
  - 25 µl de H<sub>2</sub>O destilada y estéril.
  - 1 µl de Ligasa 65.
- La temperatura del termociclador se lleva hasta 54°C y una vez alcanzada dicha temperatura, se añaden 32 µl de la mezcla a cada muestra.
- Por último, se incuban a 54°C durante 15 minutos y posteriormente a 98°C, tan sólo 5 minutos.

C- Reacción de PCR:

- La mezcla de PCR se prepara con los siguientes componentes:
  - 2 µl de Cebadores SALSA:
    - Sentido: 5' - \*GGGTTCCCTAAGGGTTGGA - 3'
    - Antisentido: 5' - GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA - 3'
    - \*Marcado con fluorocromo.
  - 2 µl de Tampón de Dilución de Enzima.
  - 5'5 µl de H<sub>2</sub>O destilada y estéril.
  - 0'5 µl de ADN Taq Polimerasa SALSA.

- En otros tubos de 0'2µl se añade:
  - 4 µl de Tampón SALSA de PCR 10X.
  - 26 µl de H<sub>2</sub>O destilada y estéril.
  - 10 µl de la reacción de ligación.
- Estos últimos tubos se colocan en el termociclador a 60°C y cuando estén a dicha temperatura, se añade a cada uno 10 µl de la mezcla de PCR.
- La reacción de PCR se inicia bajo las siguientes condiciones:
 

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| 95°C.....30'' | } | 33 ciclos |
| 60°C.....30'' |   |           |
| 72°C.....60'' |   |           |
| 72°C.....20'  |   |           |
- Por último, se cargan 6 µl de producto de PCR en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se visualiza directamente bajo luz UV (GelDoc 2.000, Bio-Rad).

#### D- Visualización:

Para cada una de las muestras se prepara la siguiente mezcla: 12 µl de formamida desionizada, 0'1 µl del marcador de tamaño marcado con TAMRA (TAMRA 500) y 1 µl del producto de PCR. La mezcla resultante se analiza en un secuenciador *ABI Prism 3700* (PE Applied Biosystems) y se visualizan los resultados mediante el software *GeneScan 3.5*.



## 6. CONSTRUCCIÓN DE MICROMATRICES DE TEJIDO.

La construcción de micromatrices de tejido fue realizada en la Unidad de Histología e inmunohistoquímica del CNIO (Dra. Lydia Sánchez y Ana Díez).

A partir de las muestras de tejido en parafina, se eligen los adecuados en relación a la profundidad tisular (más de 2 mm), y la correcta preservación antigénica tras el proceso de fijación. A partir de las tinciones con hematoxilina-eosina (HE) de cada bloque, se selecciona el área que posteriormente se incluye en la micromatriz.

Se obtienen dos cilindros de 1 mm de diámetro de cada muestra, y de distintas zonas, para luego transferirlos a un nuevo y único bloque de parafina por medio de una estación de trabajo de matrices de tejido (*Beecher Instruments*, Silver Spring, MD) (Kononen et al. 1998). Es necesario señalar que se incluyen cilindros controles, obtenidos de epitelio normal contiguo al tumor, así como uno de amígdala reactiva de referencia. En la Figura III.2 se muestra una matriz de tejido.

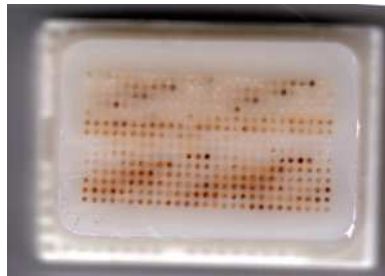


Figura III.2. Micromatriz de tejido. Tomado de <http://tissuearray.org/yale/tisarray.html>

Construida ya la matriz, a partir de ella se llevan a cabo secciones con microtomo, siendo utilizada una de ellas, por medio de una tinción HE, de confirmación de que todas las muestras incluidas se hallan en la matriz (Figura III.3). Los demás cortes sirven para las hibridaciones unmunohistoquímicas y los correspondientes estudios. En caso de que sobren se protegen con una capa de parafina para estudios ulteriores.



Figura III.3. Tinción HE de una sección de una de las matrices de tejido incluidas en el estudio.

Los tumores pertenecientes al Hospital General Universitario Gregorio Marañón han sido incluidos en un trabajo con muestras de varios hospitales de la Comunidad de Madrid llevado a cabo en el CNIO, y que fue la Tesis Doctoral de la Doctora Laura Valle, con el título: “CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, MOLECULAR E INMUNOFENOTÍPICA DE PACIENTES CON SOSPECHA DE SÍNDROME DE LYNCH”. En aquel trabajo se construyeron cuatro micromatrices de tejido. En el presente trabajo hemos utilizado estas mismas micromatrices para realizar el estudio inmunohistoquímico. A continuación se describen los contenidos de cada una de las cuatro micromatrices del trabajo previo de la Dra. Valle:

- Matriz con 69 tumores: 66 colorrectales, 2 gástricos y una metástasis de origen colorrectal, EMS y pertenecientes a familias con sospecha de CCHNP. Además, se añadieron tejidos normales adyacentes al tejido tumoral de 23 casos.
- Matriz con 76 tumores: 73 colorrectales, 2 endometriales y uno de intestino delgado, EMS y pertenecientes a familias con sospecha de CCHNP. Además, se añadieron tejidos normales adyacentes al tejido tumoral de 16 casos.
- Matriz con 65 tumores: 62 colorrectales, 2 gástricos y una metástasis de origen desconocido, IMS y pertenecientes a familias con sospecha de CCHNP. Además, se añadieron tejidos normales adyacentes al tejido tumoral de 33 casos.
- Matriz con 61 tumores: 57 colorrectales, 3 endometriales, una metástasis cerebral de origen desconocido, IMS y pertenecientes a familias con sospecha de CCHNP. Además, se añadieron tejidos normales adyacentes al tejido tumoral de 18 casos.

Es necesario destacar que, para evitar pérdidas o escasez de muestra de tejidos, todos los puntos correspondientes a cada muestra se hallan duplicados.

Los tumores de los pacientes pertenecientes al Hospital General de Segovia fueron incluidos en una micromatriz independiente, al ser procesados en un periodo de tiempo más tardío, una vez llevada a cabo el trabajo de las cuatro matrices descrito previamente.

## 7. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Las hibridaciones inmunohistoquímicas con los anticuerpos seleccionados se realizaron en la Unidad de Histología e Inmunohistoquímica del CNIO (Raquel Pajares y Dra. Lydia Sánchez).

El proceso consta de los siguientes pasos:

- Se desparafinan las secciones de 4  $\mu\text{m}$  de tejido fijado en formol e incluido en parafina durante 12 horas en la estufa a 36°C.
- Posteriormente se hidratan con sucesivos pases de alcoholes durante periodos de tiempo variable: 10 minutos en xileno (2 veces), 5 minutos en etanol al 100%, 5 minutos en etanol al 95%, 5 minutos en etanol al 70% y 2 minutos en agua destilada.
- Se lleva a cabo el desenmascaramiento antigénico por medio de una olla a presión en tampón de citrato sódico 10mmol/l a pH 5'6, durante 3 minutos.
- Se inactiva la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% (solución bloqueante S2023, DAKO, Glostrup, Dinamarca), durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Después se incuba el anticuerpo primario a la dilución adecuada.
- La inmunodetección se realiza con inmunoglobulinas anti-ratón (anticuerpo secundario), biotiniladas, para después realizar la adición de estreptavidina marcada con peroxidasa y de diaminobenzidina como sustrato. Todas las tinciones inmunohistoquímicas fueron llevadas a cabo mediante el robot automatizado *TechMate 500* (DAKO).

- Por último se contratiñen las secciones con hematoxilina de Harry, se lavan y deshidratan a través de sucesivos pases por alcoholes: 30" en etanol al 95%, 30" en etanol al 100%, 10 minutos en xileno y 1 hora en xileno.

Las características de los anticuerpos y las diluciones utilizadas en cada caso, se presentan en la Tabla III.4.

**Tabla III.4.** Anticuerpos utilizados, casas comerciales, clones y diluciones utilizadas para realizar la técnica de inmunohistoquímica en cortes de tejido incluido en parafina.

|  | <b>Marcador</b>    | <b>Clon</b>          | <b>Proveedor</b> |
|--|--------------------|----------------------|------------------|
| <b>Proteínas del Sistema de reparación</b> | <b>Mlh1</b>        | BD PharMingen        | G168-15          |
|  | <b>Msh2</b>        | Oncogene             | FE11             |
|  | <b>Msh6</b>        | BD Transduction Lab. | 44               |
| <b>Apoptosis</b>                           | <b>Bcl-2</b>       | DAKO                 | 124              |
| <b>Adhesión celular</b>                    | <b>β-catenina</b>  | BD Transduction Lab. | 14               |
|  | <b>E-cadherina</b> | Zymed                | 4A2C7            |
| <b>Marcadores de ciclo celular</b>         | <b>Chk2</b>        | Novocastra           | DCS 270.1        |
|  | <b>Ciclina A</b>   | Novocastra           | 6E6              |
|  | <b>Ciclina D1</b>  | NeoMarkers           | SP4 - rabbit     |
|  | <b>Ciclina D3</b>  | Novocastra           | DCS-22           |
|  | <b>Ciclina E</b>   | Novocastra           | 13A3             |
|  | <b>p16</b>         | Santa Cruz           | F-12             |
|  | <b>p21 (WAF1)</b>  | Oncogene             | EA10             |
|  | <b>p27</b>         | BD Transduction Lab. | 57               |
|  | <b>RB-P</b>        | Santa Cruz           | Poli-rabbit      |
|  | <b>Skp2</b>        | Zymed                | 1G12E9           |
|  | <b>Cdk2</b>        | NeoMarkers           | 8D4              |
| <b>Proliferación</b>                       | <b>p53</b>         | Novocastra           | DO-7             |
|  | <b>Ki-67</b>       | DAKO                 | MIB-1            |
| <b>Otros</b>                               | <b>CK 20</b>       | DAKO                 | Ks20.8           |
|  | <b>RAD50</b>       | Abcam                | 2C6              |
|  | <b>SMAD4</b>       | Santa Cruz           | B8               |

### 7.1. Selección de marcadores

La elección de marcadores para el estudio inmunohistoquímico se lleva a cabo de acuerdo a dos criterios. Por una parte tomando como referencia los datos descritos en la literatura, y por otra, debido al interés en relación con su implicación en rutas o procesos importantes en el desarrollo del CCR.

### 7.1.1. Proteínas del sistema de reparación: Mlh1, Msh2, Msh6.

Como se ha señalado previamente en la Introducción existen numerosos estudios que muestran que el análisis inmunohistoquímico utilizando anticuerpos para detectar las proteínas Mlh1, Msh2 y Msh6 es un método útil para identificar portadores de mutación en los genes de reparación (Berends et al. 2001; Muller et al. 2001; Christensen et al. 2002; Hendriks et al. 2003). De igual manera, también se ha indicado que esta técnica *per se* no es suficiente para la selección de casos para el estudio de los genes de reparación, siendo necesaria la utilización de otros estudios o criterios, como son la IMS y los criterios clínicos de Ámsterdam y Bethesda (Salahshor et al. 2001; Lindor et al. 2002; Wahlberg et al. 2002; Muller et al. 2004; Hampel et al. 2005).

### 7.1.2. Marcadores de ciclo celular, adhesión, proliferación, apoptosis, y otros.

En las Tablas III.5 y III.6, se presenta la función de cada marcador, así como el estado actual de los estudios de expresión en cáncer colorrectal, motivo por el cual han sido seleccionados e incluidos en el presente estudio. Las Tablas son modificaciones de las realizadas en la Tesis Doctoral de la Dra. Laura Valle.

### 7.1.3. Valoración.

El porcentaje de núcleos teñidos, independientemente de la intensidad, fue contabilizado para  $\beta$ -catenina, Cdk2, Ciclina A, Ciclina D1, Ciclina D3, Ciclina E, Ki-67, p16, p21, p27, p53, RAD50, RB-P y Skp2. En el caso de Bcl-2,  $\beta$ -catenina, Ciclina B1, Citoqueratina 20 y E-cadherina, lo que se contabilizó fue el porcentaje de células con tinción citoplasmática o de membrana.

A la hora de llevar a cabo los análisis categóricos, partiendo de los porcentajes de cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos, se calculó la mediana y se consideraron positivos aquellos valores superiores a ella y negativos los casos con porcentajes menores a la mediana.

En el caso de las proteínas de reparación del ADN, Mlh1, Msh2 y Msh6, los casos se consideraron positivos o negativos según la presencia o ausencia de expresión de dichas proteínas.

**Tabla III.5.** Marcadores moleculares relacionados con el ciclo celular seleccionados para el estudio inmunohistoquímico en las matrices de tejido. Se indica su función en los procesos celulares, la información que se conoce hasta la fecha sobre su implicación en el cáncer colorrectal.

| MARCADORES DE CICLO CELULAR           | PAPEL EN LOS PROCESOS CELULARES   | ESTUDIOS REALIZADOS EN CÁNCER COLORRECTAL   |
|---------------------------------------|---|---|
| <b>Cdk2-AP1 (p12<sup>DOC-1</sup>)</b> | Colabora con ciclina E en la entrada en la fase S del ciclo celular.  | Su sobre-expresión durante la carcinogénesis colorrectal desencadena la proliferación aberrante de las células (Li et al. 2001).  |
| <b>Ciclinas</b>                       |   |   |
| <b>A</b>                              | Marcador de la fase S (Scott et al. 2003). Transición G2/M.   | No existen datos coincidentes entre los distintos estudios en relación al pronóstico según su expresión (Handa et al. 1999; Li et al. 2002; Scott et al. 2003; Bahnassy et al. 2004; Bondi et al. 2005).  |
| <b>D1</b>                             | Transición fase G1/S.   | Idem que ciclina A en cuanto al pronóstico (Arber et al. 1996; McKay et al. 2002; Bahnassy et al. 2004).  |
| <b>D3</b>                             | Transición fase G1/S.   | Su sobre-expresión es posible que influya en la tumorogénesis del CCR, en concreto en las metástasis al hígado (Tanami et al. 2005). Sin embargo, otros estudios no encuentran correlación entre expresión y pronóstico (Bondi et al. 2005).  |
| <b>E</b>                              | Transición G1/S.  | En múltiples neoplasias, incluido el CCR, esta proteína está sobre-expresada (Keyomarsi et al. 1994; Yasui et al. 1996; Furihata et al. 1998; Yasui et al. 1999; Muller-Tidow et al. 2001; Sutter et al. 2002). Su sobre-expresión podría implicar buen pronóstico en el CCR (Yasui et al. 1996), pero existen estudios que no observan esta asociación (Sutter et al. 2002; Bondi et al. 2005).  |
| <b>p16<sup>INK4</sup></b>             | Inhibidor de Cdk4/6 (Sherr 1996; Ho and Dowdy 2002). Inhibe la fosforilación de RB (Goodrich et al. 1991; Lukas et al. 1995). | La sobre-expresión de p16 en CCR se ha asociado a un peor pronóstico (Dai et al. 2000; Tada et al. 2003; Xie et al. 2003; Cui et al. 2004). Por otro lado, su expresión reducida parece relacionarse con mayor potencial de infiltración linfática (Tada et al. 2003) y aparece de forma más frecuente en colon proximal (Schneider-Stock et al. 2003). En CCR, su silenciamiento es a través de la hipermetilación de su promotor (Toyota et al. 1999; Maekawa et al. 2001). |



| MARCADORES DE CICLO CELULAR     | PAPEL EN LOS PROCESOS CELULARES  | ESTUDIOS REALIZADOS EN CÁNCER COLORRECTAL  |
|---------------------------------|--|--|
| <b>p21</b> <sup>WAF1/Cip1</sup> | Activada por p53, inhibe a Cdk2, induciendo la parada del ciclo celular en la fase G1, para que se produzca la reparación del ADN o la apoptosis (Katsumata et al. 2003). Existe actividad de p21 independiente de p53 (Macleod et al. 1995; Katsumata et al. 2003). | En la mucosa colorrectal normal, p21 se expresa en el tercio superior de las criptas y se va reduciendo en los adenomas y carcinomas esporádicos a medida que progresa. Este hecho no ocurre en los casos hereditarios (Sinicrope et al. 1998; Edmonston et al. 2000).   |
| <b>p27</b>                      | Inhibidor de Cdk2. Induce la parada del ciclo en G1. Su nivel de expresión se regula post-transcripcionalmente a través del proteosoma (Loda et al. 1997).   | Se ha relacionado la expresión aumentada de p27 con una mayor supervivencia de los pacientes con CCR (Loda et al. 1997), y la pérdida de expresión con tumores más agresivos y de peor pronóstico (Thomas et al. 1998; Galizia et al. 2004). Sin embargo, otros estudios no han podido demostrar esta asociación (Rosati et al. 2004; Wu et al. 2005). |
| <b>RB fosforilado (RB-P)</b>    | La forma fosforilada de RB es forma inactiva de la proteína. Su forma activa actúa como regulador negativo de la transición G1/S.  | Los CCR muestran una expresión incrementada de RB y de RB-P (Gope and Gope 1992; Wagner and Roemer 2005). Este incremento es progresivo a lo largo del proceso de carcinogénesis colorrectal (Yamamoto et al. 1999)  |
| <b>Skp2</b>                     | Se une específicamente a p27 y dirige su degradación en el proteosoma. El nivel de Skp2 parece ser el regulador principal de la degradación de p27 (Hershko and Ciechanover 1998).   | En CCR agresivos se ha identificado que la disminución de los niveles de p27 es dependiente de Skp2 (Hershko et al. 2001). La sobre-expresión de Skp2 parece asociarse a mal pronóstico (Li et al. 2004; Shapira et al. 2005).   |
| <b>Chk2 (CHEK2, hCds1)</b>      | Enzima multifuncional crítica en la inducción parada del ciclo, en la apoptosis y en la reparación del ADN (Ahn et al. 2004; Craig and Hupp 2004).   | Mutaciones germinales en <i>Chk2</i> en síndromes hereditarios de CCR (Bartek and Lukas 2003). Mutaciones somáticas en el gen se han descrito también en CCR (Bartek and Lukas 2003).  |

Tabla III.6. Otros marcadores moleculares seleccionados para el estudio inmunohistoquímico en las matrices de tejido.

| OTROS MARCADORES                   | PAPEL  | ESTUDIOS REALIZADOS EN CÁNCER COLORRECTAL   |
|------------------------------------|--|---|
| <b>E-cadherina</b>                 | Glicoproteína de membrana crítica para el control de la adhesión celular y la polaridad de los epitelios. Unida al citoesqueleto se activa a través de interacciones con las cateninas (Takeichi 1995; Gumbiner 1996).   | La interrupción del complejo cadherina-catenina se ha observado en carcinomas de muchos tejidos, incluido el colon, y se ha correlacionado con la dediferenciación tumoral, el crecimiento infiltrante, la metástasis a ganglios linfáticos, y un peor pronóstico (Behrens 1999; Nollet et al. 1999; Van Aken et al. 2001). Mutaciones en línea germinal en el gen <i>CDH1</i> , que codifica esta proteína, se han identificado en el cáncer gástrico hereditario de tipo difuso, que en algunos casos aparece en asociación con CRR de aparición temprana (Gayther et al. 1998; Guilford et al. 1998).  |
| <b><math>\beta</math>-catenina</b> | Se localiza en la membrana citoplasmática, formando parte de un complejo con APC, axina y GSK-3 $\beta$ . Cuando el complejo no se forma correctamente, se activa la vía de Wnt y aumenta la cantidad de $\beta$ -catenina en el citoplasma, siendo transportada y acumulada en el núcleo (Morin et al. 1997). | La expresión nuclear de $\beta$ -catenina es un buen marcador de que la vía Wnt está activada (Iwamoto et al. 2000; Hinoi et al. 2001; Hao et al. 2002). La activación de la vía de señalización Wnt ocurre frecuentemente en tumores colorrectales EMS, así como en tumores IMS, incluyendo el CCHNP (Shimizu et al. 2002). En varios estudios se ha observado que la expresión de esta proteína está aumentada en un 90% de los CCR esporádicos y en un 65% de los relacionados con el CCHNP (Iwamoto et al. 2000; Hao et al. 2002; Abdel-Rahman et al. 2005; Kariola et al. 2005).   |
| <b>Ki-67</b>                       | Antígeno nuclear que está presente sólo en las células en proliferación (Gerdes et al. 1984; Verheijen et al. 1989).   | Varios estudios han observado que en CCR, un alto índice de proliferación Ki-67 está asociado a variables de mal pronóstico: etapas más avanzadas de la enfermedad, afectación de ganglios linfáticos, metástasis (Porschen et al. 1991; Kubota et al. 1992; Valera et al. 2005). Sin embargo, son muy pocos los que asocian los marcadores relacionados con proliferación con el pronóstico después de la resección quirúrgica (Shepherd et al. 1988; Suzuki et al. 1992; Saleh et al. 1999).  |
| <b>p53</b>                         | Regula la transcripción de numerosos genes y es crucial para el mantenimiento de la parada del ciclo celular, la regulación de la reparación del ADN, la diferenciación y la apoptosis (Roy et al. 1994; Xu and el-Gewely 2001).   | La acumulación intracelular de p53 es el resultado de una mutación en el gen. En general, en CCR, la incidencia de sobre-expresión de la proteína es similar a la incidencia de mutación del gen (Hao et al. 1997; Buglioni et al. 1999; Bukholm and Nesland 2000; Iacopetta 2003). La sobre-expresión de p53 en CCR está asociada a mal pronóstico (Starzynska et al. 1992; Harris and Hollstein 1993; Galizia et al. 2004; Paluszkievicz et al. 2004), aunque existe cierta contradicción, ya que algunos estudios no han encontrado asociación significativa y otros asocian la sobre-expresión a un mejor pronóstico (Petersen et al. 2001; Allegra et al. 2003). |

| OTROS MARCADORES               | PAPEL   | ESTUDIOS REALIZADOS EN CÁNCER COLORRECTAL  |
|--------------------------------|---|--|
| <b>Bcl-2</b>                   | Proteína de membrana intracelular capaz de inhibir la apoptosis.  | La expresión anómala de Bcl-2 se ha observado en varios tipos de tumores, incluido el CCR (Bendardaf et al. 2004). Bcl-2 se expresa normalmente en la parte media inferior de las criptas del colon, en el compartimento correspondiente a las células madre, donde Bcl-2 las protege de la apoptosis (Katsumata et al. 2003). Su sobre-expresión contribuye a la transición de epitelio hiperplásico a adenoma, aunque esta expresión se reduce gradualmente en el paso de adenoma a carcinoma (Kaklamanis et al. 1996; Hao et al. 1997; Yang et al. 1999). Los casos de CCR con expresión de Bcl-2 presentan una mejor supervivencia (Sinicrope et al. 1995; Buglioni et al. 1999; Edmonston et al. 2000), aunque algunos autores no han encontrado significación pronóstica (Tollenaar et al. 1998). El pronóstico desfavorable se ha observado principalmente en tumores p53+/Bcl2- (Buglioni et al. 1999; Manne et al. 2000; Schwandner et al. 2000; Fernebro et al. 2004). |
| <b>Citoqueratina 20 (CK20)</b> |   | Se expresa en el epitelio colorrectal normal y en la mayoría (70-100%) de los CCR, por lo que se emplea como indicador inmunohistoquímico de CCR, y de forma rutinaria para evaluar las metástasis de origen desconocido (Loy and Calaluze 1994; Tot 1999; Rubin et al. 2001).   |
| <b>RAD50</b>                   | Forma parte del complejo MRE11/NBS1/RAD50, implicado en la respuesta celular a roturas de doble cadena del ADN. Contribuye a la activación de los puntos de control del ciclo y a la reparación del ADN, por lo que favorece la estabilidad genómica (D'Amours and Jackson 2002). |  |
| <b>SMAD4</b>                   | Interviene en la vía de señalización de TGF- $\beta$ , suprimiendo el crecimiento epitelial.  | La falta de expresión de Smad4 se ha observado en CCR avanzados y se ha asociado con la aparición de metástasis (Miyaki et al. 1999b; Maitra et al. 2000; Salovaara et al. 2002; Tang et al. 2005). Esta falta de expresión también se ha correlacionado con peor supervivencia (Alazzouzi et al. 2005).   |

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

A la hora de realizar el estudio descriptivo, las variables cualitativas vienen expresadas por el número de casos (n), así como por el porcentaje respecto al total de casos de la variable en cuestión. En relación a las variables cuantitativas, vienen expresadas mediante la media y la desviación estándar.

Para comparar las características familiares, clínico-patológicas, genéticas e inmunohistoquímicas entre los distintos grupos, bien sea entre los casos IMS y EMS dentro de la muestra de CCR menores de 45 años, entre el grupo de casos provenientes del Hospital Gregorio Marañón de Madrid y los del Hospital General de Segovia, y por último entre los CCR en adulto joven con la muestra analizada de casos de CCR con componente familiar y/o hereditario, se utilizó la prueba de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson para variables categóricas. Cuando el número de observaciones esperado era menor a 5, se utilizó la prueba exacta de Fisher (test no paramétrico). Las medias de las edades de aparición de la enfermedad (variables continuas) se compararon mediante la prueba de T de Student para muestras independientes. Se realizó la prueba estadística de ANOVA (variables continuas) para conocer aquellos marcadores inmunohistoquímicos que mejor diferencian varios grupos. Para la realización de estas pruebas se utilizó el programa estadístico *SPSS v.11.5 para Windows* (Chicago, Illinois, EEUU).

Las distribuciones de supervivencia total (ST) y de supervivencia libre de enfermedad (SLE) se realizaron mediante el método de Kaplan-Meier, y para la comparación de las curvas de supervivencia generadas, el método de *Log-Rank* (Mantel Cox). La ST se definió como el tiempo pasado en meses desde el tratamiento quirúrgico hasta el fallecimiento o hasta la última revisión. La SLE se consideró el tiempo transcurrido (en meses) desde la fecha de la cirugía hasta la aparición de una recaída o metástasis después de una remisión completa, o hasta el fallecimiento como consecuencia del cáncer. El valor de la supervivencia libre de enfermedad se tomó como cero en aquellos casos en que el individuo no consiguió nunca la remisión completa de la enfermedad. Para los análisis de supervivencia se utilizó el programa *SPSS v11.5*.

Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de  $p$  asociado a la prueba estadística de contraste era menor de 0'05.



## **IV. RESULTADOS**





## IV. RESULTADOS

### 1. RESULTADOS GLOBALES.

#### 1.1. Características anatómico-clínicas.

Partimos del criterio de identificación principal de los sujetos del estudio, que es el de aquellos intervenidos de CCR a una edad igual o menor de 45 años en dos hospitales, el Hospital General Universitario Gregorio Marañón, de Madrid, y el Hospital General de Segovia. Se han identificado un total de 45 individuos que cumplían dicho criterio. De ellos, 31 pacientes pertenecían al Registro de Tumores del Hospital Universitario Gregorio Marañón en el período de tiempo comprendido entre Enero de 1996 y Diciembre de 1998, mientras que 14 corresponden al Registro del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Segovia en el período de Enero de 1999 a Diciembre de 2005.

En un siguiente paso se recogieron los datos de las variables de interés de los distintos *probandi*, utilizando para ello las historias clínicas de los archivos de ambos hospitales.

En la Tabla IV.1 se presenta la edad media al diagnóstico del CCR (edad del primer tumor en caso de haber CCR metacrónicos), junto con la desviación estándar, así como la proporción de sexos del conjunto de pacientes. El rango de edades va desde los 25 años como edad más precoz de diagnóstico, hasta los 45 años, en que se fija la edad de corte del estudio. En relación a la distribución por sexos, tan sólo destacar la práctica equivalencia entre mujeres y hombres. En la figura IV.1 se aprecia la distribución de CCR por edades de aparición. Existen dos picos de mayor incidencia, los 34-36 años, y los 43-45 años.

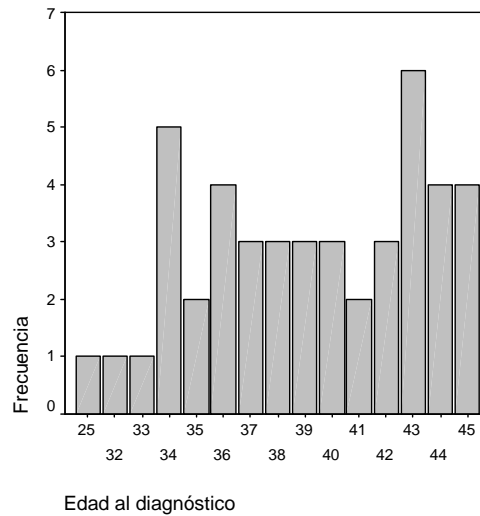
**Tabla IV.1.** Edad media al diagnóstico del CCR y distribución de sexos.

---

|  |   |
|--|---|
| <b><i>Edad media al diagnóstico.</i></b> | 39,07 años (DE: 4,4)                      |
| <b><i>(Rango)</i></b>                    | (25 – 45)                                 |
| <b><i>Sexo.</i></b>                      | Mujeres: 23 (51,1%) / Varones: 22 (48,9%) |

---

\* DE: Desviación estándar.



**Figura IV.1.** Distribución de los CCR por edad de diagnóstico.

En la Tabla IV.2 se presentan las diferentes localizaciones de los CCR. Es destacable la alta incidencia de CCR en el colon derecho respecto al izquierdo, recto y unión recto-sigmoidea, característica esencial tanto en los CCR con componente familiar como en estos con presentación a una edad precoz. En la misma Tabla se muestran además las técnicas quirúrgicas empleadas y la intención de la mismas (curativa o paliativa), dependiendo de la presencia o no de enfermedad a distancia en el momento de la intervención, y de existir, si aquella fue o no resecable. Las tres hemicolectomías derechas ampliadas se corresponden con CCR a nivel del colon transversal. Las intervenciones de Hartmann fueron realizadas en cirugías de urgencia, por perforaciones en colon no preparada; mientras que la colectomía segmentaria fue llevada a cabo en un paciente que presentaba un CCR estenosante avanzado con metástasis hepáticas múltiples no resecables, por lo que se decidió una cirugía meramente paliativa del tumor primario. En el caso de los CCR localizados a nivel del recto y unión rectosigmoidea se desglosan a su vez los diferentes tipos de técnicas empleadas, condicionadas según la distancia del tumor al margen anal o la penetración en el espesor de la pared rectal, a excepción de una de las intervenciones de Hartmann, que fue llevada a cabo de manera urgente por un cáncer de recto perforado, y ha sido computada en el epígrafe previo. A nivel del recto, sólo un CCR fue resecado mediante cirugía local (resección endoanal) al tratarse de un pólipo vellosito malignizado, con una estadificación preoperatoria mediante

ecografía endorrectal de uT1N0, que se confirmó en el estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica.

**Tabla IV.2.** Localización del CCR y técnicas quirúrgicas utilizadas.

---

**Localización.**

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| Colon derecho.                | 20 (44,4%) |
| Colon izquierdo.              | 15 (33,3%) |
| Recto y unión rectosigmoidea. | 10 (22,2%) |

**Técnica quirúrgica.**

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| Hemicolectomía derecha.          | 17 (37,8%) |
| Hemicolectomía derecha ampliada. | 3 (6,7%)   |
| Hemicolectomía izquierda.        | 4 (8,9%)   |
| Sigmoidectomía.                  | 9 (20,0%)  |
| Intervención de Hartmann.        | 2 (4,4%)   |
| Colectomía segmentaria.          | 1 (2,2%)   |

**Recto:**

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| Resección anterior baja.      | 5 (11,1%) |
| Amputación abdomino-perineal. | 3 (6,7%)  |
| Resección endoanal.           | 1 (2,2%)  |

**Intención de la cirugía.**

|                       |                         |
|-----------------------|-------------------------|
| Curativa / Paliativa. | 35 (77,8%) / 10 (22,2%) |
|-----------------------|-------------------------|

---

En relación con el estudio histológico de los especímenes quirúrgicos, todos fueron clasificados como adenocarcinomas y del total de 45 CCR, 4 (8,9%) resultaron ser pólipos vellosos malignizados.

Respecto al grado de diferenciación de las neoplasias, éste fue predominantemente de grado medio, con un total de 36 (80%), seguido de los tumores de bajo grado de diferenciación, con 7 (15,6%). La producción de moco de los tumores engloba tanto en la caracterización como “mucosecretoras”, como por la presencia de células en “anillo de sello”. Se ha descrito que ambas características son más frecuentes en los CCR que aparecen en los sujetos jóvenes, como comentaremos en el apartado de discusión. En la presente muestra, 11 resultaron ser mucosecretoras (24,4%), y 4 más (8,9%) CCR con presencia de células en “anillo de sello”, alcanzando un total de 15 neoplasias productoras de moco (33,3%). En la Tabla IV.3. se presentan los datos histológicos.

**Tabla IV.3.** Características histológicas de los CCR.

---

**Grado de diferenciación.**

|        |           |
|--------|-----------|
| Bajo.  | 7 (15,6%) |
| Medio. | 36 (80%)  |
| Alto.  | 2 (4,4%)  |

**Producción de moco.**

|                                       |                         |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Mucosecreción (SI / NO).              | 11 / 34 (24,4% / 75,6%) |
| Células en anillo de sello (SI / NO). | 4 / 41 (8,9% / 91,1%)   |
| Total de CCR productoras de moco:     | 15 (33,3%)              |

---

Dentro del estudio histológico también se incluye la estadificación del CCR según la afectación en profundidad de la pared del colon, así como la presencia o no de metástasis ganglionares y a distancia en el momento del diagnóstico. En la Tabla IV.4 se desglosan tanto la estadificación según el sistema AJCC/TNM en primer lugar, como la de Dukes / Astler-Coller modificada. Llama la atención la pequeña proporción de tumores que se diagnostican en estadios precoces (Estadio I o A de Dukes, respectivamente). En el mismo sentido también destaca la proporción importante de los CCR con afectación de ganglios locorregionales. Todo ello apunta hacia el hecho del posible retraso que tiene lugar en el diagnóstico de estos tumores en el grupo de población estudiada, con las consecuencias que ello conlleva de morbi-mortalidad, así como en el beneficio que implicaría el diagnóstico más precoz de los mismos.

**Tabla IV.4.** Estadificación tumoral. Afectación ganglionar y a distancia.

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Estadio</b>                               |           |
| I  | 6 (13,4)  |
| II   | 14 (31,1) |
| III  | 15 (33,3) |
| IV   | 10 (22,2) |
| <b>Clasificación de Dukes</b>                |           |
| A  | 3 (6,7)   |
| B  | 17 (37,8) |
| C  | 15 (33,3) |
| D  | 10 (22,2) |
| <b>Afectación de ganglios linfáticos</b>     |           |
| Sí   | 21 (46,6) |
| No   | 24 (53,4) |
| <b>Metástasis a distancia al diagnóstico</b> |           |
| Sí   | 10 (22,2) |
| No   | 35 (77,8) |

Con respecto al tratamiento quimioterápico recibido por los pacientes, no se realizó tratamiento adyuvante en 6 casos (13,4%), por presentar un estadio A, tras el estudio de la pieza quirúrgica. Del resto, 33 (73,3%) recibieron quimioterapia adyuvante estándar, mientras que los 6 restantes la recibieron específica al tratarse de CCR de localización rectal. En este grupo de neoplasias, cuatro de ellos recibieron quimiorradioterapia neoadyuvante, mientras que dos la recibieron de manera postoperatoria. Señalar que estos dos últimos casos se presentaron en el principio del período estudiado, antes de definirse la importancia de la terapia neoadyuvante en el control del CCR a nivel rectal, tanto desde el punto de vista de reducción del tamaño tumoral, y la consiguiente preservación de esfínteres, como por la mejoría del pronóstico de estos pacientes.

A la hora de definir el seguimiento de estos pacientes se determinan dos fechas diferentes, una para cada grupo de población. Por un lado, para aquellos cuyo origen era el Hospital Gregorio Marañón fue Diciembre de 2004, mientras que para aquellos provenientes del Hospital General de Segovia fue la de Diciembre de 2006. Según se observa en la Tabla IV.5., la Supervivencia Total (ST) presentó una media de 50,56 meses, mientras que la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) fue de 42,4 meses. Si se excluyen aquellos pacientes que presentaban en el momento del diagnóstico enfermedad a distancia (10), la SLE asciende hasta 54,51 meses, con una ST de 61,12 meses. Dejando aparte los casos con enfermedad a distancia, de los 35 pacientes restantes, 8 (22,9%) presentaron recidiva tumoral. De ellos, 1 caso (12,5%) fue a nivel locorregional; 5 (62,5%), a distancia; y 2 (25%), ambas. Todos los datos de seguimiento y supervivencia, junto con la distribución de las diferentes localizaciones de las metástasis se recogen en la Tabla IV.5. Tres de los cinco pacientes con metástasis a distancia lo hicieron en el hígado; uno a nivel de los ganglios del retroperitoneo; y en el paciente restante fueron pulmonares.

Sólo dos de las recidivas (25%) fueron susceptibles de cirugía de rescate. La primera de ellas fue intervenida por afectación pulmonar, con resección en cuña en dos ocasiones diferentes, por afectaciones aisladas distintas, estando libre de enfermedad en el momento de la última revisión. Dicho paciente presentó un período libre de enfermedad de 33 meses hasta la primera recidiva, con un seguimiento total de 87 meses. El segundo paciente resultó ser de la recidiva locorregional aislada, que presentó a los 3 años de la primera cirugía, practicándosele una amputación abdomino-perineal. Posteriormente volvió a presentar nueva recidiva locorregional, aunque en esta ocasión no se pudo llevar a cabo cirugía de rescate, colocándole

en ese momento una endoprótesis como paliación a la obstrucción del tránsito intestinal, y falleciendo a los 79 meses del primer diagnóstico.

**Tabla IV.5.** Seguimiento de los pacientes: supervivencia, recidiva tumoral, tipo de recidiva, localización de la metástasis y mortalidad global.

---

|                                      |                              |
|--------------------------------------|------------------------------|
| <b>ST</b>                            | 50,56 meses (28,62) [3-101]  |
| <b>SLE.</b>                          | 42,40 meses (31,80) [0-101]  |
| <b>ST *.</b>                         | 61,12 meses (23,07) [12-101] |
| <b>SLE *.</b>                        | 54,51 meses (25,08) [12-101] |
| <b>Recidiva tumoral * (SI / NO).</b> | 8 / 27 (22,9% / 77,1%)       |
| <b>Tipo de recidiva.</b>             |                              |
| <i>Locorregional.</i>                | 1 (12,5%)                    |
| <i>A distancia.</i>                  | 5 (62,5%)                    |
| <i>Ambas.</i>                        | 2 (25%)                      |
| <b>Metástasis a distancia.</b>       |                              |
| <i>Hepáticas.</i>                    | 5 (62,5%)                    |
| <i>Pulmón.</i>                       | 3 (37,5%)                    |
| <i>Carcinomatosis peritoneal.</i>    | 2 (25%)                      |
| <i>Retroperitoneales.</i>            | 1 (12,5%)                    |
| <b>Mortalidad. (SI / NO).</b>        | 17 / 28 (37,8% / 62,2%)      |

---

**ST:** Supervivencia Total. **SLE:** Supervivencia Libre de Enfermedad. Se expresan en: Media (Desviación estándar) [Rango].

\* Pacientes que no presentaban enfermedad a distancia en el momento del diagnóstico.

La mortalidad global fue de un 37,8% (17 pacientes), en todos los casos relacionada con el CCR, con una edad media al fallecimiento de 41,21 años. El período de tiempo en el que tuvieron lugar los fallecimientos fue el mismo que el referido previamente para el cálculo de las supervivencias.

Las características de los 17 pacientes fallecidos son semejantes a las que presenta el conjunto, salvo ligeras diferencias. La proporción de neoplasias a nivel del colon derecho resultó algo menor, con un 35,3%, mientras que los tumores productores de moco alcanzaron el 29,4%, con un 17,6% de neoplasias de bajo grado de diferenciación. Como se verá más adelante, el análisis de la Inestabilidad de microsatélites (IMS), en este grupo fue también algo menor con un 25%, mientras que la del grupo total resultó ser del 31%.

Seis pacientes presentaron más de una neoplasia a lo largo de la evolución. Tres (6,6%) presentaron otro CCR: dos de ellos sincrónicos y el otro metacrónico. Por otro lado, dos pacientes presentaron neoplasias extracolónicas y no relacionadas con el síndrome de Lynch: uno de ellos un carcinoma epidermoide en el pie, y el otro paciente un encondroma a nivel del húmero. Sólo una paciente presentó un adenocarcinoma de endometrio dos años después de la cirugía del CCR derecho inicial. Es importante destacar que fue a raíz de la entrevista con la paciente cuando refirió ciertos síntomas ginecológicos, por lo que se le derivó al especialista correspondiente, siendo entonces diagnosticada de la mencionada neoplasia.

Quince pacientes (33,33%) presentaron algún tipo de pólipo colónico, en un caso (6,67%) detectado con anterioridad al diagnóstico del CCR, en 4 (26,67%) posteriores, en 9 (60%) fueron sincrónicos, y en un caso, anterior y posterior. Excluyendo uno de los casos, que resultó ser una Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF), la media fue de 1,6 pólipos en este subgrupo de pacientes. Sólo en 3 de ellos (20%) presentaron un total de 2, y sólo 1 presentó un total de 6 (6,7%), presentando un único pólipo los 10 restantes. Los diferentes tipos de pólipos se describen en la Tabla IV.6.



**Tabla IV.6.** Presencia y tipos de pólipos detectados a lo largo de la evolución.

---

|                                     |                |
|-------------------------------------|----------------|
| <b>Presencia de pólipos:</b>        | 15/45 (33,33%) |
| <b>Tipo de pólipo.</b>              |                |
| Pólipo adenomatoso.                 | 8 (53,3%)      |
| Pólipo tubulo-veloso con displasia. | 3 (20,1%)      |
| Pólipo veloso.                      | 2 (13,4%)      |
| Hiperplásico.                       | 1 (6,6%)       |
| Poliposis Adenomatosa Familiar.     | 1 (6,6%)       |

---

**Tabla IV.7.** Tabla resumen de las características generales y anatómo-clínicas.

|   | <b>Total<br/>N (%)</b> |
|---|------------------------|
| <b>Pacientes</b>                          | 45 (100)               |
| <b>Edad media de diagnóstico del CCR.</b> | 39,07                  |
| <b>Sexo:</b>                              |                        |
| <b>Varones</b>                            | 23 (51,1)              |
| <b>Mujeres</b>                            | 22 (48,9)              |
| <b>Localización tumoral:</b>              |                        |
| <b>Colon derecho</b>                      | 20 (44,4)              |
| <b>Colon izquierdo y recto</b>            | 25 (55,6)              |
| <b>Diferenciación tumoral:</b>            |                        |
| <b>Alto</b>                               | 2 (4,4)                |
| <b>Moderado</b>                           | 36 (80,0)              |
| <b>Bajo</b>                               | 7 (15,6)               |
| <b>Producción de moco.</b>                | 15 (33,3)              |
| <b>Estadío Astler-Coller modificado:</b>  |                        |
| <b>A</b>                                  | 3 (6,7)                |
| <b>B<sub>1-2</sub></b>                    | 17 (37,8)              |
| <b>C<sub>1-2</sub></b>                    | 15 (33,3)              |
| <b>D</b>                                  | 10 (22,2)              |
| <b>Presencia de pólipos asociados.</b>    | 15 (33,3)              |
| <b>CCR sincrónicos y metacrónicos.</b>    | 3 (6,7)                |

## 1.2. Características familiares.

Una vez identificados los sujetos del estudio, se llevó a cabo una entrevista con ellos o, en caso de que hubieran fallecido, con un familiar directo. En ella se dibujó el árbol familiar de cada *probandus*, reflejando todas las neoplasias aparecidas en la familia, así como la edad de diagnóstico de las mismas y, en caso de fallecimiento, la edad en que sucedió el mismo. Las neoplasias se dividen en:

- a) Aquellas consideradas asociadas al síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP): CCR, cáncer de endometrio, cáncer de estómago, ovario, intestino delgado, tracto hepatobiliar, uroepitelio y pelvis renal (Watson and Lynch 1994).

- b) Neoplasias consideradas no asociadas al síndrome de Lynch: cualquiera de ellas, excluidas las enumeradas en el epígrafe anterior.

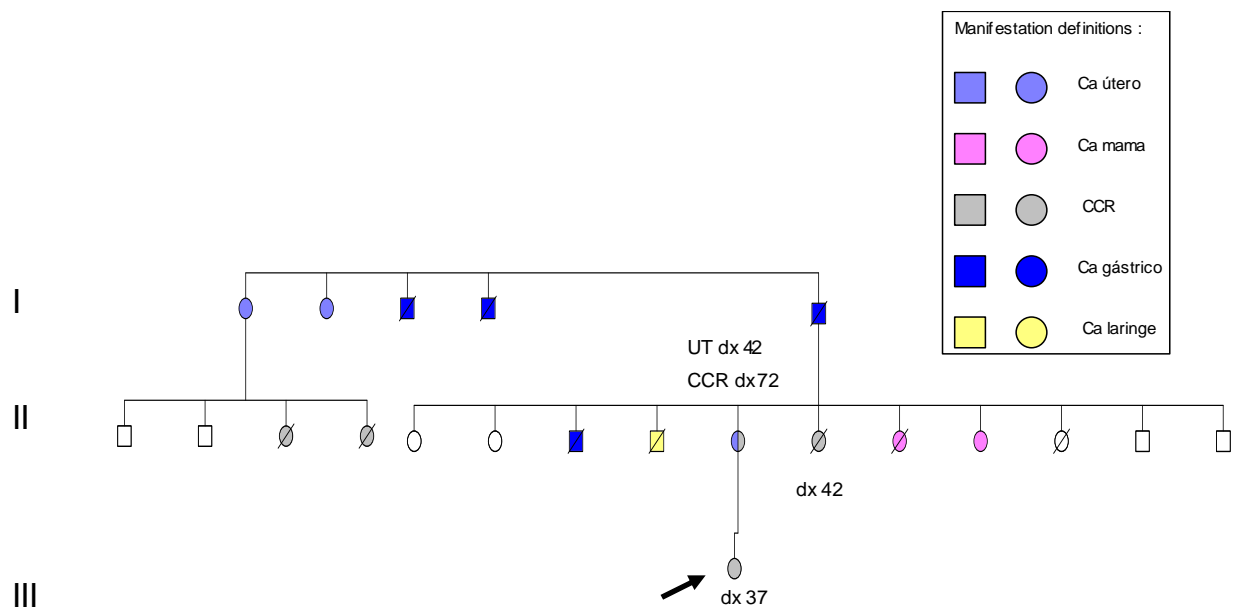
Por otro lado, a partir de los árboles familiares de cada probando se clasificaron a las familias según la distinta carga de neoplasias en:

- a) Familia con sospecha de síndrome de Lynch, si cumplía los criterios de Ámsterdam tipo II.

- b) Familia con agregación de CCR u otras neoplasias asociadas al síndrome de Lynch, sin cumplir los criterios previos.

- c) Caso esporádico, familias en las que sólo el *probandus* incluido en el estudio presentó el CCR.

De los 45 casos, 27 (60%) fueron considerados esporádicos, 9/45 (20%) presentaban agregación familiar para CCR, y otros 8 cumplían los criterios de Ámsterdam para el síndrome de Lynch. Se excluye la familia con PAF. De estos ocho pacientes con sospecha clínica de síndrome de Lynch, sólo cuatro de ellos (50%) cumplían criterios de Ámsterdam I. En la Figura IV.2 se presenta el árbol de una de estas familias, en el que se aprecia la aparición de varias neoplasias relacionadas con el síndrome de Lynch, tanto como otras neoplasias no relacionadas con el mismo. Además, como se comentó previamente, un caso cumplía los criterios de PAF, y en el estudio genético se identificó una mutación germinal en el gen APC (exón 8, c.916delCT). En la Tabla IV.8 se presentan los diferentes tipos de neoplasias relacionadas con el síndrome de Lynch que aparecieron en los familiares de los pacientes estudiados. Como era de esperar, la neoplasia más frecuente fue el CCR, seguida del adenocarcinoma de útero, siendo cuatro las familias que presentaban ambas neoplasias simultáneamente. Las siguientes en orden de frecuencia son el adenocarcinoma gástrico y la neoplasia de vías urinarias y del Sistema Nervioso Central. En dos casos se identificaron dos neoplasias abdominales sin llegar a precisar la localización concreta de las mismas, al carecer de informes. Estos últimos se presentaron en casos definidos como esporádicos, si bien alguno de ellos, de conocerse el origen de la neoplasia, podría haberse calificado de manera distinta.



**Figura IV.2.** Árbol de una familia Ámsterdam I positiva. Los números se refieren a la edad de diagnóstico de la neoplasia.

**Tabla IV.8.** Relación de los diferentes tumores relacionados con el síndrome de Lynch, y su frecuencia de aparición en las diferentes familias. No se incluyen los CCR de los *probandi*.

El porcentaje se refiere al número de familias con dicho tumor respecto al total de cada grupo.

---

| <b>Número de familias.</b> | <b>Total.</b> | <b>Esporádicos.</b> | <b>Agregación.</b> | <b>CCHNP.</b> |
|----------------------------|---------------|---------------------|--------------------|---------------|
|                            | <b>44</b>     | <b>27</b>           | <b>9</b>           | <b>8</b>      |
| Colorrectal.               | 13 (29,5%)    |                     | 6 (66%)            | 7 (87,5%)     |
| Útero.                     | 6 (13,5%)     |                     | 2 (22%)            | 4 (50%)       |
| Gástrico.                  | 4 (9,1%)      |                     |                    | 4 (50%)       |
| Vías urinarias.            | 2 (4,5%)      |                     | 1 (11%)            | 1 (12,5%)     |
| Sistema Nervioso Central.  | 2 (2,3%)      |                     |                    | 2 (25%)       |
| Ovario.                    | 1 (2,3%)      |                     |                    | 1 (12,5%)     |
| Páncreas.                  | 1 (2,3%)      |                     | 1 (11%)            |               |
| Abdominal no especificado. | 2 (4,5%)      | 2 (7,4%)            |                    |               |

---

Siguiendo con los antecedentes familiares neoplásicos, del total de 44 familias, 12 (27,27%) presentaron algún tipo de neoplasia no relacionada previamente con el síndrome de Lynch. El tipo y número de neoplasias identificadas aparecen en la Tabla IV.9. Destaca el cáncer de mama, que se observó en cuatro familias (9,1%) y el de laringe y las leucemias, en tres familias (6,9%). También es importante señalar que estos tipos de tumores se presentan no tanto en las familias con criterios de síndrome de Lynch, sino en las de los pacientes definidos como esporádicos y en las familias con agregación. Varias de estas neoplasias se observaron en el seno de una misma familia. En la Figura IV.3 se muestra el árbol genealógico de una estas familias con agregación de neoplasias no relacionadas con el síndrome de Lynch. Ninguna de las familias que mostraban estas agregaciones cumplía los criterios clínicos para dicho síndrome.

**Tabla IV.9.** Relación de los diferentes tumores no asociados con el síndrome de Lynch, y su distribución en los diferentes tipos de familias.

El porcentaje se refiere al número de familias con dicho tumor respecto al total de cada grupo.

---

|                        | <b>Total.</b> | <b>Esporádicos.</b> | <b>Agregación.</b> | <b>CCHNP.</b> |
|------------------------|---------------|---------------------|--------------------|---------------|
| <b>Nº familias:</b>    | <b>44</b>     | <b>27</b>           | <b>9</b>           | <b>8</b>      |
| <b>Tipo de tumor.</b>  |               |                     |                    |               |
| Mama.                  | 4 (9,1%)      | 1 (2,3%)            | 2 (22,2%)          | 1 (12,5%)     |
| Laringe.               | 3 (6,9%)      | 1 (2,3%)            |                    | 2 (25%)       |
| Leucemia.              | 3 (6,9%)      | 1 (2,3%)            | 1 (11,1%)          | 1 (12,5%)     |
| Cavidad oral.          | 2 (4,5%)      |                     | 2 (22,2%)          |               |
| Enfermedad de Hodgkin. | 1 (2,3%)      |                     | 1 (11,1%)          |               |
| Esófago.               | 1 (2,3%)      |                     | 1 (11,1%)          |               |
| Melanoma.              | 1 (2,3%)      | 1 (2,3%)            |                    |               |
| Sarcoma de útero.      | 1 (2,3%)      |                     | 1 (11,1%)          |               |
| Pulmón.                | 1 (2,3%)      | 1 (2,3%)            |                    |               |
| Testículo.             | 1 (2,3%)      | 1 (2,3%)            |                    |               |
| Mieloma múltiple.      | 1 (2,3%)      | 1 (2,3%)            |                    |               |
| Origen desconocido.    | 1 (2,3%)      |                     |                    | 1 (12,5%)     |

---

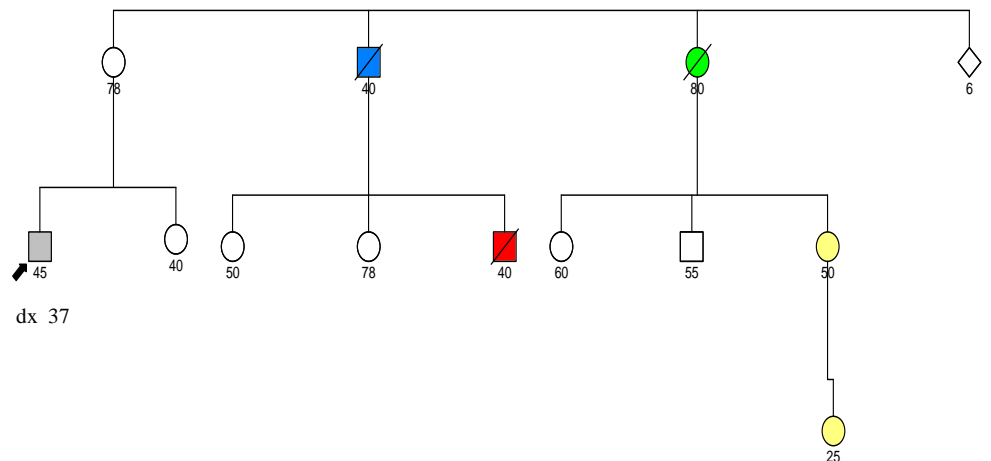
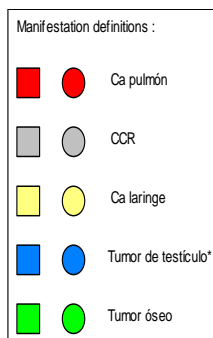


Figura IV.3. Árbol de una familia con múltiples neoplasias no relacionadas con el síndrome de Lynch.

### 1.3. Características moleculares.

Aparte del árbol familiar de cada *probandus*, en la entrevista se obtenía el consentimiento informado para el correspondiente estudio de tejido tumoral parafinado del CCR. Como ya se ha mencionado con anterioridad, de haber fallecido el mismo, el consentimiento lo otorgaba un familiar directo.

#### 1.3.1 *Inestabilidad de microsatélites.*

Para el estudio se descartó al paciente con diagnóstico de PAF, y de los 44 casos restantes, se obtuvo tejido tumoral suficiente para llevar a cabo el análisis en 42 casos. En la Tabla IV.10. se describen los resultados obtenidos.

**Tabla IV.10.** Distribución de los pacientes según la presencia de inestabilidad de microsatélites en el CCR.

---

|  |          |
|--|----------|
| Inestabilidad de microsatélites (IMS). | 13 (31%) |
| Estabilidad de microsatélites (EMS).   | 29 (69%) |

---

En todos los casos el estudio se realizó utilizando únicamente el marcador microsatélite BAT26, y en ningún caso se utilizó el denominado “panel de Bethesda”, ya que ninguno de los casos que presentaron EMS mostró antecedentes familiares sugestivos de síndrome de Lynch. Además, ninguno de estos casos estables mostró falta de expresión de las proteínas de reparación en el estudio inmunohistoquímico.

Los resultados del análisis comparativo de las características anatómo-clínicas, familiares y moleculares de los pacientes con tumores IMS y EMS se mostrarán en un apartado posterior.

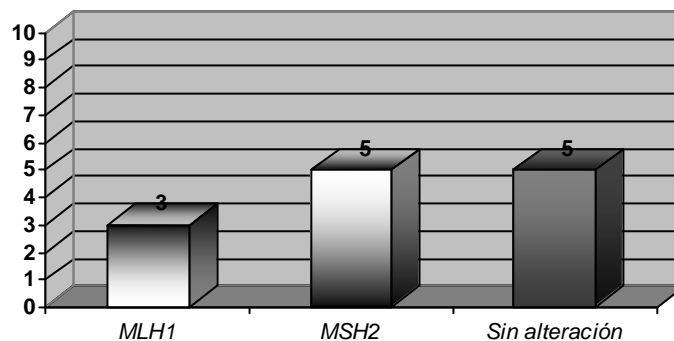
### 1.3.2 Análisis de los genes *MLH1* y *MSH2*.

Una vez obtenido el resultado del estudio de la inestabilidad de microsatélites, se volvió a contactar con los pacientes, o con los familiares de primer grado en caso de fallecimiento, con objeto de informar del resultado del mismo. En aquellos casos en los que el CCR presentaba IMS se tomó una muestra de sangre periférica del *probandus* en caso de que viviera. De ocurrir lo contrario, se identificaba en el árbol genealógico otros familiar afectado de cáncer, preferiblemente CCR, y que tuviera menor edad en el momento del diagnóstico. Sólo en dos ocasiones hubo que recurrir a familiares del *probandus*. En uno fue la hermana, con una neoplasia de vías urinarias a una edad de 33 años, mientras que en el otro fue la madre del *probandus*, con una neoplasia de endometrio a los 58 años.

De las muestras de sangre periférica se extrajo el ADN para la realización del estudio completo de los genes de reparación de errores de emparejamiento del ADN, *MLH1* y *MSH2*, que representan alrededor del 90% de las familias con síndrome de Lynch y mutaciones



germinales en los genes de reparación. En la Figura IV.4 se presentan los resultados obtenidos en el mencionado estudio, tanto de las mutaciones puntuales detectadas en ambos genes, como en la aparición de grandes deleciones en el caso de que el resultado del estudio de las mutaciones fuera negativo. De los 13 casos analizados, 8 (61,5%) mostraron una mutación germinal patogénica en algunos genes (Figura IV.4).



**Figura IV.4.** Resultado del estudio de los genes *MLH1* y *MSH2* en los pacientes con tumores IMS.

Los tipos de mutaciones puntuales y de grandes reordenamientos identificados en los genes *MLH1* y *MSH2* se muestran en la Tabla IV.11. Como ya se ha mencionado, una vez que se llevaba a cabo el rastreo de mutaciones puntuales de ambos genes, y obtenido un resultado negativo, se realizaba el estudio de grandes reordenamientos mediante la técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). En la muestra se halló un caso, que presentaba una deleción de los exones 1 a 3 del gen *MSH2*.

**Tabla IV.11.** Mutaciones identificadas en los genes *MLH1* y *MSH2*.

| Gen         | Exón/Intrón     | Codón       | Alteración           | Consecuencia en la proteína       |
|-------------|-----------------|-------------|----------------------|-----------------------------------|
| <i>MLH1</i> | Exón 4          | 350         | C>T                  | Cambio de aminoácido T117M        |
| <i>MLH1</i> | Intrón 6        | 545+2       | T>A                  | Incorrecto procesamiento del ARNm |
| <i>MLH1</i> | Exón- intrón 18 | 2103,2103+1 | delG                 | Incorrecto procesamiento del ARNm |
| <i>MSH2</i> | Exón 3          | 432         | delC                 | Proteína truncada                 |
| <i>MSH2</i> | Intrón 6        | 1077-1      | G>A                  | Incorrecto procesamiento del ARNm |
| <i>MSH2</i> | Exón 7          | 1216        | C>T                  | Proteína truncada (R406X)         |
| <i>MSH2</i> | Exón 14         | 2383        | dupA                 | Proteína truncada (P795X)         |
| <i>MSH2</i> | Exones 1-3      |             | Delección exones 1-3 | Gran delección                    |

### 1.3.3 Análisis inmunohistoquímico.

Una vez realizado el estudio de la inestabilidad de microsatélites, se llevó a cabo el estudio inmunohistoquímico de los CCR para los distintos marcadores descritos en el apartado de Material y Métodos. Se han utilizado 19 anticuerpos para proteínas relevantes en el ciclo celular, adhesión celular, proliferación, apoptosis y otros procesos celulares esenciales; más las tres proteínas más importantes del sistema de reparación del ADN, como son Mlh1, Msh2 y Msh6. El estudio de cada marcador inmunohistoquímico se realizó de manera simultánea, utilizando una micromatriz de tejido.

#### 1.3.3.1. Proteínas del sistema de reparación.

Los resultados obtenidos en el estudio inmunohistoquímico de las proteínas correspondientes a los genes de reparación se detalla en la Tabla IV.12. Hay que señalar que, como para el resto de marcadores, no todos los tumores se han podido estudiar, bien por no estar disponibles, bien por no existir material suficiente para llevar a cabo todos los estudios que se han ido

detallando. A este respecto, en cada una de las tablas de resultados sólo se expresan para cada uno de los marcadores el número de resultados positivos o negativos, y entre paréntesis, el porcentaje referido siempre al número de casos con resultado valorable.

**Tabla IV.12.** Resultados del análisis inmunohistoquímico de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento.

|                                      | Estudio inmunohistoquímico |                     |
|--------------------------------------|----------------------------|---------------------|
|                                      | Normal                     | Falta de expresión. |
| <b><u>Sistema de reparación.</u></b> |                            |                     |
| Mlh1 (n=28)                          | 24 (86)                    | 4 (14)              |
| Msh2 (n=28)                          | 24 (86)                    | 4 (14)              |
| Msh6 (n=26)                          | 23 (88)                    | 3 (12)              |

En cuanto a la proteína Mlh1, de los cuatro resultados negativos, en los que había falta de expresión, todos eran tumores IMS. Uno corresponde a un paciente en el que se identificó una mutación en el gen *MLH1*, y en los otros tres no se detectó mutación del gen. En la presente serie hubo otros dos casos que presentaron mutación para el gen *MLH1*, si bien no se pudo llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico de la proteína por carecer de material para el mismo.

Al contrario ocurre con los cuatro casos negativos para la proteína Msh2. Todos ellos resultaron ser IMS, pero en tres de ellos sí se encontró mutación germinal en el gen, mientras que sólo para uno no se identificó mutación. En los dos casos que completan los cinco en que se han hallado mutación para el gen *MSH2* no se pudo disponer de material para el estudio inmunohistoquímico.

Los tres casos en que Msh6 no se expresa van acompañados de ausencia también de la proteína Msh2, ya que ambas proteínas están implicadas en el heterodímero hMutS $\alpha$ . De los casos con falta de expresión de Msh6, todos resultaron ser IMS, y en los tres se detectó mutación para el gen *MSH2*.

### 1.3.3.2. Otros marcadores.

En las Tablas IV.13 y IV.14 se detallan los resultados inmunohistoquímicos de los diferentes marcadores relacionados con el ciclo celular, adhesión celular, proliferación celular y apoptosis.

**Tabla IV.13.** Resultados del análisis inmunohistoquímico de los marcadores de ciclo celular.

|                               | Expresión inmunohistoquímica. |                   |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|
|                               | Positiva<br>n (%)             | Negativa<br>n (%) |
| <b>Marcadores moleculares</b> |                               |                   |
| <b><u>Ciclo celular</u></b>   |                               |                   |
| Cdk2 (n=27)                   | 13 (48)                       | 14 (52)           |
| Ciclina A (n=28)              | 13 (46)                       | 15 (54)           |
| Ciclina D1 (n=28)             | 12 (43)                       | 16 (57)           |
| Ciclina D3 (n=28)             | 12 (43)                       | 16 (57)           |
| Ciclina E (n=27)              | 8 (30)                        | 19 (70)           |
| p16 (n=27)                    | 13 (48)                       | 14 (52)           |
| p21 (n=25)                    | 14 (56)                       | 11 (44)           |
| p27 (n=23)                    | 12 (52)                       | 11 (48)           |
| RB-P (n=27)                   | 13 (48)                       | 14 (52)           |
| Skp2 (n=26)                   | 12 (46)                       | 14 (54)           |
| Chk2 (n=24)                   | 13 (54)                       | 11 (46)           |

Es importante destacar la proporción equivalente entre los resultados positivos y los negativos entre las diferentes marcadores, excepción hecha de la ciclina E, en la que es predominante la falta de expresión. A la hora de analizar los resultados de los marcadores correspondientes al ciclo celular, se han estudiado posibles relaciones con las características clínicas, familiares e histológicas, y se han hallado asociaciones, sin alcanzar en ninguna de ellas la significación estadística dado el reducido tamaño muestral. Podemos destacar que el 77% (10/13) de los CCR que muestran falta de expresión de p21 son esporádicos, o bien que de los pacientes que murieron durante el período de seguimiento, 9 presentaron ausencia de expresión para la ciclina E, el 82% (9/11 casos valorables). De los 10 CCR diagnosticados en estadio D, sólo 6 son valorables para el análisis inmunohistoquímico de la ciclina E, presentando todos ellos ausencia en la expresión de la misma.

Los resultados correspondientes al resto de marcadores se muestran en la Tabla IV.14.

**Tabla IV.14.** Resultados del análisis inmunohistoquímico de los marcadores moleculares de adhesión, proliferación, apoptosis y otros procesos celulares.

|                                | Expresión inmunohistoquímica. |          |
|--------------------------------|-------------------------------|----------|
|                                | Positiva                      | Negativa |
| <b><u>Adhesión celular</u></b> |                               |          |
| E-cadherina (n=26)             | 19 (73)                       | 7 (27)   |
| <b><u>β-catenina</u></b>       |                               |          |
| Membrana (n=28)                | 24 (86)                       | 4 (14)   |
| Núcleo (n=28)                  | 10 (36)                       | 18 (64)  |
| <b><u>Proliferación</u></b>    |                               |          |
| Ki-67 (n=27)                   | 17 (63)                       | 10 (37)  |
| p53 (n=28)                     | 15 (54)                       | 13 (46)  |
| <b><u>Apoptosis</u></b>        |                               |          |
| Bcl-2 (n=28)                   | 7 (25)                        | 21 (75)  |
| <b><u>Otros</u></b>            |                               |          |
| CK-20 (n=17)                   | 10 (59)                       | 7 (41)   |
| RAD50 (n=16)                   | 10 (63)                       | 6 (37)   |
| SMAD4 (n=24)                   | 13 (54)                       | 11 (46)  |

Destaca la importante proporción de CCR que presentan expresión de β-catenina en membrana, un 86%. Estos datos podrían señalar la posibilidad de una vía alternativa de carcinogénesis, al no estar activada la vía Wnt, lo que ocurre con gran frecuencia en tumores colorrectales tanto EMS como IMS (Shimizu et al. 2002). Respecto al resto de resultados, destaca que el 60% de los CCR que se presentan en estadio D de Astler-Coller presentan Ki-67 positivo. Los factores relacionados con el pronóstico y la supervivencia se analizan a continuación.

#### **1.4. Factores pronóstico. Análisis de supervivencia.**

Se considera factor pronóstico aquel que predice el curso clínico de una enfermedad. A la hora de identificar qué variables de las analizadas en nuestro estudio podrían ser consideradas como factores pronóstico, definimos como eventos a predecir la mortalidad relacionada con el CCR y la aparición de recidiva tumoral después de una cirugía primaria con intención curativa del CCR. El periodo de observación difiere para las dos muestras estudiadas. Por un lado, para aquellos cuyo origen era el Hospital Gregorio Marañón, éste va desde Enero de 1996 hasta Diciembre de 2004, mientras que para aquellos provenientes del Hospital General de Segovia abarca desde Enero de 2000 hasta Diciembre de 2006. La media de seguimiento fue de 50,56 meses, con un intervalo entre 3 y 101 meses. En el caso del análisis de supervivencia, se lleva a cabo mediante el método Kaplan-Meier, considerando la supervivencia hasta que se produce el evento “muerte”, quedando referido cada caso hasta que se obtiene la última revisión del paciente en el caso de supervivencia. La importancia de identificar posibles factores pronóstico viene determinada por la aplicación de dichos factores en el manejo terapéutico y en el seguimiento del CCR en este grupo de pacientes.

##### *1.4.1 Factores pronóstico.*

A la hora de analizar las diferentes variables como factores pronóstico, tanto desde el punto de vista de la mortalidad como de la aparición de recidiva, se llevó a cabo la prueba de Chi cuadrado en el caso de las variables discretas, mientras que en el caso de las continuas se realizó mediante el análisis univariante de la comparación de medias con el test t. En la Tabla IV.15 se muestran los valores más significativos.

**Tabla IV.15.** Relación de variables discretas con posible valor pronóstico, en relación con la mortalidad y la aparición de recidiva tumoral.

---

| <b><u>Variable “Mortalidad”.</u></b> | <b><i>P</i></b>   | <b><i>Descripción.</i></b>                              |
|--------------------------------------|-------------------|---|
| <i>Estadificación TNM.</i>           | <b>&lt; 0,001</b> | Ver texto y Tabla IV.16.                                |
| <i>Estadificación A-C*.</i>          | <b>&lt; 0,001</b> | Ver texto y Tabla IV.16.                                |
| <i>Metástasis.</i>                   | <b>&lt; 0,001</b> | La presencia de metástasis se relaciona con mortalidad. |

| <b><u>Variable “Recidiva”.</u></b> |             |  |
|------------------------------------|-------------|--|
| <i>Localización.</i>               | <b>0,03</b> | El 62,5% de las recidivas son de CCR izquierdos. |

---

\* A-C : Astler- Coller.

Como se observa en la Tabla IV.15, tanto la estadificación del tumor como la presencia de metástasis se asocian con la mortalidad. La relación con los diferentes estadios tumorales se muestra en le Tabla IV.16. Desde el punto de vista anatómico-clínico la localización del CCR a nivel del colon izquierdo se relaciona también con la mortalidad, sin alcanzar la significación estadística ( $p = 0,08$ ). Así, el 52,9% (9 casos) de los fallecidos son CCR izquierdos.



**Tabla IV.16.** Relación de los estadios tumorales con la mortalidad y la aparición de recidiva tumoral.

---

| <b><i><u>Estadio tumoral.</u></i></b> | <b><i><u>Mortalidad.</u></i></b> |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| Estadio I.                            | 0 (0%)                           |
| Estadio II.                           | 5 (35,7%)                        |
| Estadio III.                          | 2 (13,3%)                        |
| Estadio IV.                           | 10 (100%)                        |

---

La estadificación de la pieza tumoral es un claro factor pronóstico. Como se observa en la Tabla IV.16, en la medida en que avanza el estadio el porcentaje de fallecimientos es mayor, con la excepción del estadio III. Al revisar los pacientes incluidos en este estadio, se aprecia que la proporción de tumores IMS es mayor en él, presentándose en este estadio el 40% del total de IMS, mientras que el estadio II sólo lo hicieron un 28.6%. La mortalidad en pacientes con IMS en ambos estadios es equivalente, mientras que la diferencia depende de la proporción mayor de tumores EMS en el estadio II. En conclusión, la mortalidad en el CCR del adulto joven está íntimamente relacionada con el estadio al diagnóstico. Como se verá más adelante, la influencia de la estadificación tumoral en el pronóstico de estos pacientes no es igual para los tumores IMS que para los EMS, poseyendo en estos últimos muchos más peso que en los primeros.

En cuanto a la aparición de recidiva, sólo la localización tumoral se relaciona con ella, siendo los CCR de localización izquierda los que muestran una mayor tendencia a la misma. En nuestro estudio, la estadificación tumoral no es un buen factor pronóstico de recidiva debido a dos motivos. Por una parte, para su valoración sólo se consideran aquellos casos en los que se parte de un diagnóstico inicial de enfermedad no metastásica, en los que es posible la

aparición de recidiva. Así, quedan excluidos los tumores con estadio IV ó D, según la clasificación que se utilice. El otro argumento es que en los CCR con estadio III ó C existe un importante porcentaje de neoplasias IMS que desarrollan recidiva con menor frecuencia que los EMS.

La expresión de  $\beta$ -Catenina no ha mostrado resultados significativos en su relación con la mortalidad y la recidiva. Sin embargo, su expresión podría ser un marcador de mal pronóstico. En condiciones normales, la  $\beta$ -Catenina se expresa en la membrana, por lo que se puede considerar como tumores con vía Wnt aberrante aquellos que no la expresan a dicho nivel o que sí lo hacen en el núcleo. De los pacientes que presentaron ausencia de la misma en la membrana celular, un 75% de los casos falleció a lo largo de la evolución. De igual forma sucedió en el caso de encontrarla expresada a nivel del núcleo, presentando entonces una mortalidad del 60%, si bien en ningún caso llega a alcanzarse la significación estadística, probablemente por lo reducido de la muestra. Desde el punto de vista molecular, en relación con la recidiva tumoral, la presencia de  $\beta$ -Catenina en membrana podría ser un factor de buen pronóstico, ya que el 78% de los casos (14) que muestran expresión en membrana no mostraron recidiva durante el período de seguimiento, aunque estos resultados no alcanzaron la significación estadística. Cuando consideramos aquellos casos con vía Wnt aberrante o intacta, la  $p$  se aproxima aún más a la significación estadística, tanto desde el punto de vista del valor pronóstico como en análisis de supervivencia, sugiriendo que, cuando la vía Wnt está implicada en la carcinogénesis, los pacientes presentarían un peor pronóstico, mientras que si está intacta, el pronóstico sería mejor.

#### 1.4.2 Análisis de supervivencia.

Se realiza por medio del método Kaplan-Meier. Es un método donde la variable que se estudia es el tiempo que tarda en ocurrir un suceso, en nuestro caso la muerte. De modo que al final del período de observación no todos los pacientes habrán presentado el suceso objeto del estudio. Puede ocurrir, además, que alguno de ellos se haya perdido por diversas causas, sin poder determinar su estado, o bien, que se hayan incorporado durante el período de observación, por lo que serán observados durante un período de tiempo menor, con menos probabilidad de desarrollar el suceso. Las observaciones incompletas se denominan “censuradas” (*censored*). Posteriormente se pueden comparar las curvas de las diferentes

variables con el objetivo de diferenciar alguna de ellas relacionada con una mayor o menor supervivencia. En nuestro caso, hemos valorado la relación de las características anatómicas, familiares y la expresión inmunohistoquímicas de los marcadores seleccionados con la variable “muerte”.

De todos los análisis realizados, hemos obtenido una relación significativa en:

- Presencia de metástasis en el momento del diagnóstico ( $p < 0.001$ ).
- Aparición de recidiva tumoral en la evolución ( $p < 0.001$ ).
- Presencia de  $\beta$ -catenina de membrana ( $p = 0.03$ ).

Las dos primeras variables, presencia de metástasis y recidiva tumoral, se relacionan con una menor supervivencia, mientras que la presencia de expresión de  $\beta$ -catenina en membrana se asocia con una mayor supervivencia, como se aprecia en la Figura IV.5.

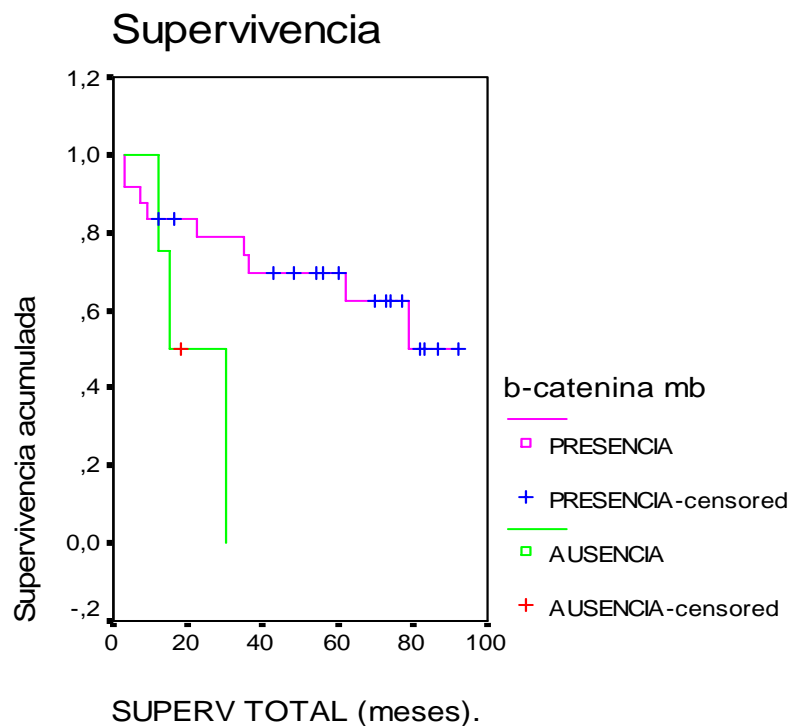


Figura IV. 5. Curva de supervivencia en relación con la expresión de la  $\beta$ -catenina.

El resto de los análisis realizados no alcanzó la significación estadística. Sólo señalar que, como se ha indicado en el apartado previo de factores pronóstico, existe una relación entre

mortalidad y estadificación del tumor, con la excepción comentada del estadio III. Los resultados se presentan en la Figura IV.6.

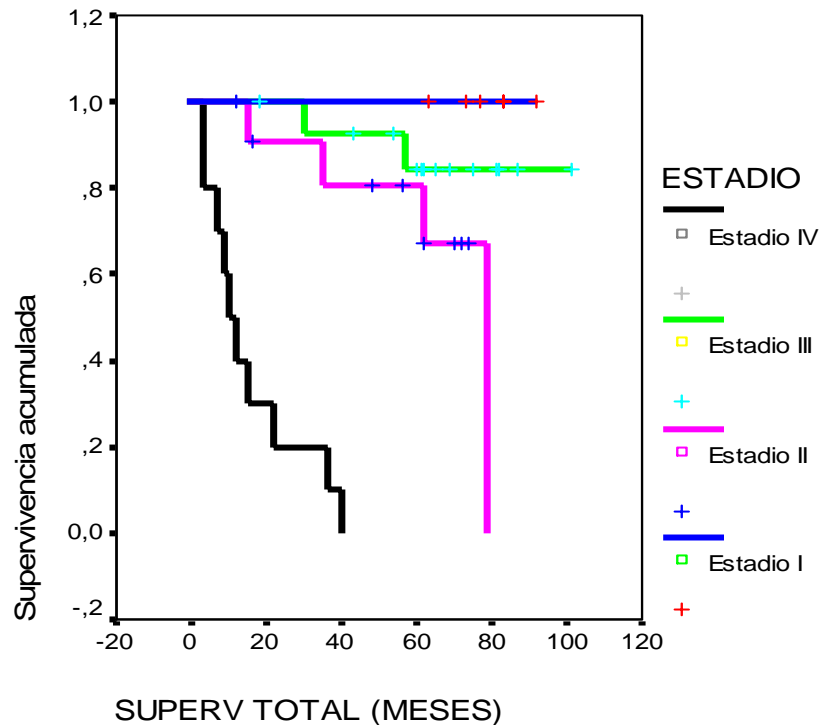


Figura IV. 6. Curvas de supervivencia en relación a la estadificación del CCR.

## 2. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS TUMORES ESTABLES (EMS) E INESTABLES (IMS).

Una vez llevado a cabo el estudio descriptivo y el análisis de la muestra general, se realizan comparaciones consecutivas, la primera de las cuales se realiza entre los tumores con IMS frente a los que presentaron EMS, todos ellos pertenecientes a la muestra de CCR en pacientes de edad igual o menor de 45 años.

La IMS es una característica molecular de gran relevancia en el CCR. Se asocia a la forma familiar más frecuente, como es el síndrome de Lynch o CCHNP, al relacionarse directamente con un fallo en el sistema de reparación de bases del ADN (Aaltonen et al. 1993). De igual forma se asocia a un mejor pronóstico tras la cirugía y, sin embargo, una menor respuesta al

fluorouracilo. (Gryfe et al. 2000; Hemminki et al. 2000; Wright et al. 2000; Watanabe et al. 2001; Storojeva et al. 2005; Bendardaf et al. 2007). El resto de CCR que no muestran inestabilidad de los microsatélites, por tanto, considerados estables (EMS), generalmente presentan inestabilidad cromosómica.

En 42 tumores de la presente muestra se realizó el análisis de los microsatélites y 13 (31%) mostraron IMS. A continuación se muestran los resultados de comparar las características clínicas, familiares y moleculares entre los 13 tumores IMS y los 29 EMS.

### 2.1. Características anatomo-clínicas.

En la Tabla IV.17 se presentan las edades medias al diagnóstico del CCR junto con la desviación estándar. En la misma tabla aparecen las proporciones de sexos para cada uno de los grupos. La diferencia en la edad al diagnóstico entre los CCR que presentan IMS frente a los EMS resulta estadísticamente significativa. El rango de edades para los IMS abarca desde 32 años a 44 años. Por el contrario, los EMS presentan un abanico de edades desde los 25 a los 45 años, pero con una mayor frecuencia de aparición a partir de los 39 años. En relación a la distribución por sexos, no hay diferencias.

**Tabla IV.17.** Edad media al diagnóstico del CCR y distribución por sexos.

|                                     | IMS                   | EMS                 | <i>p</i>    |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------------|-------------|
| <b><i>Edad al diagnóstico</i> *</b> | 36,7 (32-44, DE: 1,0) | 40 (25-45, DE: 4,6) | <b>0.03</b> |
| <b><i>Sexo</i> ** (M/V).</b>        | 6 (46%) / 7 (54%)     | 16 (55%) / 13 (45%) | NS          |

\* Edad media en años (Rango y Desviación estándar).

\*\* M: Mujer; V: Varón. NS: No significativo.

En la Tabla IV.18 se indican las diferentes localizaciones de los CCR. Destacar la marcada incidencia de CCR derecho (70%) en los casos con IMS. En los EMS la localización del tumor muestra proporciones similares a las observadas en los CCR esporádicos (Koldner et al. 1994). Si la distribución por localizaciones la unificamos en colon derecho por un lado, y colon izquierdo por otro, sumándoles a estos los localizados en recto y en la unión recto-sigma, obtendríamos una p de 0,09. En la misma Tabla se indica además la intención de la cirugía, curativa o paliativa, dependiendo de la presencia o no de enfermedad a distancia en el momento de la intervención, y de existir, si aquella fue o no resecable.

**Tabla IV.18.** Localización del CCR e intención quirúrgica en los tumores IMS y EMS.

|                                 | <b>IMS</b>         | <b>EMS</b>         | <b>p</b> |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|----------|
| <b>Localización.</b>            |                    |                    |          |
| Colon derecho.                  | 9 (70%)            | 11 (38%)           |          |
| Colon izquierdo.                | 2 (15%)            | 11 (38%)           |          |
| Recto.                          | 2 (15%)            | 7 (24%)            | NS       |
| <b>Intención de la cirugía.</b> |                    |                    |          |
| Curativa / Paliativa.           | 11 (85%) / 2 (15%) | 21 (72%) / 8 (28%) | NS       |

Dentro de la serie, cuatro neoplasias fueron pólipos vellosos malignizados, todas ellas mostraron EMS. El grado de diferenciación de las neoplasias fue predominantemente de grado medio. Sólo los tumores EMS presentan CCR de alto grado de diferenciación. Dentro de los CCR “mucosecretorios”, se consideraron también aquellos con presencia de células en “anillo de sello”. Ambas características son más frecuentes en los CCR que aparecen en los sujetos jóvenes (Liang et al. 2003), aunque son más frecuentes en los tumores con IMS. A este

respecto los valores de la p son cercanos a la significación estadística, pero ésta sólo se alcanza en la presencia de “células en anillo de sello”. En la Tabla IV.19 se presentan estos datos histológicos.

**Tabla IV.19.** Comparación de las características histopatológicas de los IMS y EMS.

|                                   | <b>IMS</b> | <b>EMS</b>  | <b>p</b>     |
|-----------------------------------|------------|-------------|--------------|
| <b>Grado de diferenciación.</b>   | n (%)      | n (%)       |              |
| Bajo.                             | 3 (23,1)   | 4 (13,8)    |              |
| Medio.                            | 10 (76,9)  | 23 (79,3)   |              |
| Alto.                             | 0 (0)      | 2 (6,9)     | NS           |
| <b>Producción de moco.</b>        | +/- (%)    | +/- (%)     |              |
| Mucosecreción.                    | 5/8 (38,5) | 5/24 (17,2) | NS           |
| Células en anillo de sello.       | 4/9 (30,8) | 0/29 (0)    | <b>0.006</b> |
| Total de CCR productores de moco: |            |             |              |
|                                   | 5 (38,5%)  | 5 (17,2%)   | NS           |

Los resultados de la comparación de los tumores IMS frente a los EMS en relación a la estadificación tumoral se muestran en la Tabla IV.20. No se observan diferencias estadísticamente significativas. Los CCR en el dulto joven se diagnostican tarde,

independientemente de si son IMS o EMS. En una alta proporción de casos, más marcada en los IMS, el diagnóstico se hace cuando hay afectación de ganglios o metástasis a distancia.

**Tabla IV.20.** Estadificación tumoral de los tumores IMS y EMS.

|   | <b>IMS</b> | <b>EMS</b> | <b><i>p</i></b> |
|---|------------|------------|-----------------|
| <b>Sistema AJCC/TNM</b>                       |            |            |                 |
| I   | 1 (7,7)    | 4 (13,8)   |                 |
| II  | 4 (30,8)   | 10 (34,5)  |                 |
| III   | 6 (46,2)   | 7 (24,1)   |                 |
| IV  | 2 (15,4)   | 8 (27,6)   | NS              |
| <b>Clasificación de Dukes / Astler-Coller</b> |            |            |                 |
| A   | 0 (0,0)    | 2 (6,9)    |                 |
| B   | 5 (38,5)   | 12 (41,4)  |                 |
| C   | 6 (46,2)   | 7 (24,1)   |                 |
| D   | 2 (15,4)   | 8 (27,6)   | NS              |
| <b>Afectación de ganglios linfáticos</b>      |            |            |                 |
| Sí  | 7 (53,8)   | 13 (44,8)  |                 |
| No  | 6 (46,2)   | 16 (55,2)  | NS              |
| <b>Metástasis a distancia al diagnóstico</b>  |            |            |                 |
| Sí  | 2 (15,4)   | 8 (27,6)   |                 |
| No  | 11 (84,6)  | 21 (72,4)  | NS              |

Según se observa en la Tabla IV.21, tanto la ST como la SLE fueron más favorables en el grupo de IMS, con una *p* muy próxima a la significación estadística. Una vez excluidos aquellos pacientes que presentaban en el momento del diagnóstico enfermedad a distancia, la diferencia a favor de los IMS se reduce, en especial cuando se considera la ST. En el mismo sentido apuntar los resultados de la recidiva tumoral, que es mayor para los tumores EMS, siendo interesante resaltar que las que se presentaron en los IMS sólo fueron a distancia,



mientras que en los EMS variaron entre locorreregionales y ambas. La mortalidad fue mayor también en el grupo EMS.

**Tabla IV.21.** Seguimiento de los pacientes: Supervivencia, mortalidad, recidiva y tipo de recidiva.

|   | <b>IMS</b>    | <b>EMS</b>     | <b><i>p</i></b> |
|---|---------------|----------------|-----------------|
| <b>Total de pacientes.</b>                      |               |                |                 |
| <b>ST*</b>                                      | 56,85 (25,81) | 45,70 (30,41)  | NS              |
| <b>SLE.</b>                                     | 52,77 (31,84) | 35,41 (31,32)  | NS              |
| <b>Pacientes sin metástasis al diagnóstico.</b> |               |                |                 |
| <b>ST.</b>                                      | 64,27 (19,95) | 58,36 (26,14)  | NS              |
| <b>SLE.</b>                                     | 62,36 (23,62) | 48,90 (26,08)  | NS              |
| <b>Recidiva tumoral **.</b>                     |               |                |                 |
|   | 2 / 11 (18,2) | 5 / 21 (23,8)  | NS              |
| <b>Tipo de recidiva.</b>                        |               |                |                 |
| <i>Locorreional.</i>                            | 0 (0)         | 1 (20)         |                 |
| <i>A distancia.</i>                             | 2 (100)       | 2 (40)         |                 |
| <i>Ambas.</i>                                   | 0 (0)         | 2 (40)         | NS              |
| <b>Mortalidad **.</b>                           |               |                |                 |
|   | 4 / 17 (30,8) | 12 / 29 (41,4) | NS              |

\* La supervivencia está expresada en meses y entre paréntesis la Desviación estándar.

\*\* Casos positivos / Total (%).

En relación a los CCR sincrónicos y/o metacrónicos, aparece uno en cada grupo. Cinco pacientes presentaron más de una neoplasia a lo largo de la evolución. Las dos neoplasias extracolónicas y no relacionadas con el síndrome de Lynch aparecen en pacientes con EMS (carcinoma epidermoide en el pie y encondroma a nivel del húmero). La paciente que a lo largo de su evolución presentó el adenocarcinoma de endometrio pertenecía al grupo de tumores IMS.

En ambos grupos se apreciaron pólipos a lo largo de la evolución, siendo algo más frecuente en el grupo de EMS y, además, en este grupo sus características histológicas son más variadas. Por otro lado, recordar que en este último grupo aparecen cuatro pacientes en los que el CCR asienta sobre un pólipo veloso previo ya malignizado. Los diferentes tipos de pólipos se muestran en la Tabla IV.22.

**Tabla IV.22.** Tipos de pólipos detectados a lo largo de la evolución.

|                                     | <b>IMS</b>      | <b>EMS</b>     | <b><i>p</i></b> |
|-------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| <b>Pólipos en la evolución.</b>     |                 |                |                 |
|                                     | 4 / 13 (30,8) * | 10 / 29 (34,5) | NS              |
| <b>Tipo de pólipo.</b>              |                 |                |                 |
| Pólipo adenomatoso.                 | 3/4 (75%)       | 5/10 (50%)     |                 |
| Pólipo tubulo-veloso con displasia. | 1/4 (25%)       | 2/10 (20%)     |                 |
| Pólipo veloso.                      |                 | 2/10 (20%)     |                 |
| Hiperplásico.                       |                 | 1/10 (10%)     |                 |

\* Casos positivos / Total (%).

## **2.2. Características familiares.**

En la Tabla IV.23 se desglosan los antecedentes familiares oncológicos entre los tumores IMS y EMS. Como era de esperar los casos con sospecha de Síndrome de Lynch es predominante en los casos con IMS, mientras que los que presentaron EMS fueron esencialmente casos esporádicos. En el caso de los primeros también es importante destacar la mayor presencia en

la familia de neoplasias relacionadas y no relacionadas con el síndrome de Lynch. Es posible que alguna de las neoplasias en principio no relacionadas con el síndrome guarden relación con la alteración constitucional en el sistema de reparación del ADN que muestran los pacientes con CCR IMS.

**Tabla IV.23.** Antecedentes oncológicos familiares.

|  | <b>IMS</b>   | <b>EMS</b>   | <b><i>p</i></b>   |
|--|--------------|--------------|-------------------|
| <b>Agregación familiar de neoplasias.</b>  |              |              |                   |
|  | <b>n (%)</b> | <b>n (%)</b> |                   |
| Caso esporádico.   | 2 (15,4)     | 24 (82,7)    |                   |
| Agregación familiar.   | 4 (30,8)     | 4 (13,8)     |                   |
| Sospecha de CCHNP.   | 7 (53,8)     | 1 (3,5)      | <b>&lt; 0.001</b> |
| <b>Neoplasias relacionadas con el síndrome de Lynch en otro miembro de la familia.</b> |              |              |                   |
| Número de familias.  | 11 (84,6)    | 5 (17,3)     | <b>&lt;0.01</b>   |
| <b>Neoplasias no relacionadas con el síndrome de Lynch.</b>                            |              |              |                   |
| Número de familias.  | 7 (53,8)     | 8 (27,6)     | <b>0.02</b>       |

En la Tabla IV.24 se detallan los tipos de tumores asociados al síndrome de Lynch aparecidos en ambos grupos de familias.

**Tabla IV.24.** Relación de los diferentes tumores relacionados con el síndrome de Lynch aparecidos en familiares.

|  | IMS                  | EMS               |
|--|----------------------|-------------------|
| <b>Número de familias con neoplasia:</b> |                      |                   |
| Colorrectal.                             | 8 (61,5%)*           | 5 (17,2%)         |
| Útero.                                   | 5 (38,5%)            | 1 (3,4%)          |
| Gástrico.                                | 2 (15,4%)            | 2 (6,9%)          |
| Sistema Nervioso Central.                | 2 (15,4%)            | -                 |
| Vías urinarias.                          | 1 (7,7%)             | 1 (3,4%)          |
| Ovario.                                  | 1 (7,7%)             | -                 |
| Páncreas.                                | 1 (7,7%)             | -                 |
| Abdominal no especificado.               | 1 (7,7%)             | 1 (3,4%)          |
| <b>Total de familias con neoplasias:</b> | <b>11/13 (84,6%)</b> | <b>9/29 (31%)</b> |

\* Porcentaje respecto a cada uno de los grupos IMS y EMS. No se incluyen los CCR de los *probandi*.

En la Tabla IV.25 se recogen los tumores no asociados al síndrome de Lynch aparecidos en las familias con tumores IMS y EMS. Destaca la heterogénea distribución de las mismas tanto para uno como para otro grupo, aunque proporcionalmente es mayor la frecuencia de estas en las neoplasias IMS. Sólo dos neoplasias, leucemia y cáncer de cavidad oral, se observan tanto en los casos IMS como en los EMS. En la Figura IV.3 se muestra el árbol de una familia típica con tumores no asociados al síndrome de Lynch.

**Tabla IV.25.** Relación de los tumores no asociados con el síndrome de Lynch que presentaron los familiares de los *probandi* con tumores IMS y EMS.

---

**Neoplasias no relacionadas con el síndrome de Lynch.**

|                     | IMS       | EMS       |
|---------------------|-----------|-----------|
| Mama.               | 1 (7,7%)  | 3 (10,2%) |
| Laringe.            | 3 (23,1%) | -         |
| Leucemia.           | 2 (15,4%) | 1 (3,4%)  |
| Cavidad oral.       | 1 (7,7%)  | 1 (3,4%)  |
| Enfermedad Hodgkin. | -         | 1 (3,4%)  |
| Esófago.            | -         | 1 (3,4%)  |
| Melanoma.           | -         | -         |
| Sarcoma de útero.   | -         | 1 (3,4%)  |
| Pulmón.             | 1 (7,7%)  | -         |
| Testículo.          | 1 (7,7%)  | -         |
| Mieloma múltiple.   | 1 (7,7%)  | -         |
| Origen desconocido. | 1 (7,7%)  | -         |

---

En la Tabla IV.26 se resumen los datos anatómo-clínicos y familiares globales en los tumores IMS y EMS.

**Tabla IV.26.** Resumen datos anatómico-clínicos y familiares en los grupos IMS y EMS.

|   | <b>Total<br/>n (%)</b> | <b>EMS<br/>n (%)</b> | <b>IMS<br/>n (%)</b> | <b>p (<math>\chi^2</math>)</b> |
|---|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------|
| <b>Pacientes</b>                        | 45 (100)               | 29 (64,4)            | 13 (28,9)            |                                |
| <b>Edad media de aparición (SD)</b>     | 39,07 (4,4)            | 40 (4,6)             | 36,7 (3,6)           | <b>0,03<sup>1</sup></b>        |
| <b>Sexo:</b>                            |                        |                      |                      |                                |
| <b>Masculino</b>                        | 23 (51,1)              | 13 (44,8)            | 7 (53,8)             |                                |
| <b>Femenino</b>                         | 22 (48,9)              | 16 (55,2)            | 6 (46,2)             | NS                             |
| <b>Localización tumoral:</b>            |                        |                      |                      |                                |
| <b>Colon derecho</b>                    | 20 (44,4)              | 11 (37,9)            | 9 (69,2)             |                                |
| <b>Colon izquierdo</b>                  | 15 (33,3)              | 11 (37,9)            | 2 (15,4)             |                                |
| <b>Recto</b>                            | 10 (22,2)              | 7 (24,1)             | 2 (15,4)             | NS                             |
| <b>Grado de diferenciación celular:</b> |                        |                      |                      |                                |
| <b>Bien</b>                             | 2 (4,4)                | 2 (6,9)              | 0 (0,0)              |                                |
| <b>Moderado</b>                         | 36 (80,0)              | 23 (79,3)            | 10 (76,9)            |                                |
| <b>Pobre</b>                            | 7 (15,6)               | 4 (13,8)             | 3 (23,1)             | NS                             |
| <b>Producción de moco</b>               | 15 (33,3)              | 5 (17,2)             | 5 (38,5)             | NS                             |
| <b>Células en “anillo de sello”</b>     | 4 (8,9%)               | 0/29 (0)             | 4/9 (30,8)           | <b>0,006</b>                   |
| <b>Astler Collier modificado:</b>       |                        |                      |                      |                                |
| <b>A</b>                                | 3 (6,7)                | 2 (6,9)              | 0 (0,0)              |                                |
| <b>B<sub>1-2</sub></b>                  | 17 (37,8)              | 12 (41,4)            | 5 (38,5)             |                                |
| <b>C<sub>1-2</sub></b>                  | 15 (33,3)              | 7 (24,1)             | 6 (46,1)             |                                |
| <b>D</b>                                | 10 (22,2)              | 8 (27,6)             | 2 (15,4)             | NS                             |
| <b>Presencia de pólipos asociados</b>   | 15 (33,3)              | 10 (34,5)            | 4 (30,8)             | NS                             |
| <b>CCR sincrónico o metacrónico</b>     | 3 (6,7)                | 1 (3,4)              | 1 (7,7)              | NS                             |
| <b>Historia familiar de cáncer.</b>     |                        |                      |                      |                                |
| <b>Neoplasias relacionada con Lynch</b> | 18 (40,0)              | 5 (17,3)             | 11 (84,6)            | <b>&lt;0,01</b>                |
| <b>Neoplasias no Lynch.</b>             | 12 (26,7)              | 8 (27,6)             | 7 (53,8)             | <b>0,02</b>                    |
| <b>Casos esporádicos.</b>               | 27 (60,0)              | 24 (82,7)            | 2 (15,4)             | <b>&lt; 0,001</b>              |

<sup>1</sup> El test llevado a cabo es la t de Student.

### 2.3. Características moleculares.

En este apartado se comparan los resultados del análisis inmunohistoquímico de los marcadores seleccionados en los dos grupos de tumores, IMS y EMS.

#### 2.3.1. *Análisis inmunohistoquímico.*

Se han seleccionado 25 proteínas relevantes en el sistema de reparación de los errores de emparejamiento del ADN (proteínas MMR), ciclo celular, adhesión, proliferación, apoptosis, y otras funciones celulares de importancia. Los resultados se presentan ordenando estas proteínas por su función. Así, en primer lugar se describen los resultados del análisis de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento del ADN.

### 2.3.1.1. Proteínas del sistema de reparación.

Como se observa en la Tabla IV. 27, la falta de expresión de las proteínas del sistema de reparación se observa sólo en el grupo de CCR con IMS, reflejo de la alteración del sistema de reparación del ADN que sucede en los primeros. Existe, por tanto, una buena correlación entre los resultados obtenidos en la inestabilidad de microsatélites y las de la IHQ de las proteínas MMR.

**Tabla IV.27.** Resultados del análisis de la expresión inmunohistoquímica de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento (proteínas MMR).

|   | <b>IMS</b><br>+ (%) / - (%) | <b>EMS</b><br>+ (%) / - (%) | <b>P</b>     |
|---|-----------------------------|-----------------------------|--------------|
| <b>Proteínas del sistema de reparación.</b> |                             |                             |              |
| <b>Mlh1</b>                                 | 4 (50) / 4 (50)             | 20 (100) / 0 (0)            | <b>0.01</b>  |
| <b>Msh2</b>                                 | 3 (43) / 4 (57)             | 21 (100) / 0 (0)            | <b>0.002</b> |
| <b>Msh6</b>                                 | 2 (40) / 3 (60)             | 21 (100) / 0 (0)            | <b>0.004</b> |

Se puede apreciar las diferencias entre los dos grupos IMS y EMS en relación a las tres proteínas del sistema de reparación más frecuente, no existiendo falta de expresión en ninguno de los casos que de neoplasias EMS. Sin embargo, en los tumores IMS, de los nueve en que se pudo contar con material para realizar el análisis, ocho presentaron ausencia de expresión para alguna de las tres proteínas, mientras que el otro el análisis no fue valorable.

En cuanto a la proteína Mlh1, de los cuatro resultados negativos, y como se comentó en un apartado previo, uno corresponde a un paciente en el que se identificó una mutación en el gen *MLH1*, y en otros tres no se detectó mutación del gen. En los dos casos restantes con mutación para el gen *MLH1* no se pudo llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico de la proteína por carecer de material para el mismo.

En relación a los cuatro casos negativos para la proteína Msh2, en tres se encontró mutación germinal en el gen, mientras que sólo para uno no se identificó mutación. En los dos casos que completan los cinco en que se han hallado mutación para el gen *MSH2* no se pudo disponer de material para el estudio inmunohistoquímico.

Los tres casos en que Msh6 no se expresa van acompañados de ausencia también de la proteína Msh2, ya que ambas proteínas están implicadas en el heterodímero hMutS $\alpha$ . En los tres se detectó mutación para el gen *MSH2*.

Como era de esperar, el porcentaje de casos que muestran falta de expresión de alguna de las proteínas MMR es muy superior para los tumores IMS. Ésto es concordante con lo descrito previamente en numerosas series de tumores y pacientes (Dietmaier et al. 1997; Stone et al. 2001; Lanza et al. 2002; Lindor et al. 2002; Ruzskiewicz et al. 2002; de Jong et al. 2004a)

#### 2.3.1.2. Proteínas del ciclo celular.

En la Tabla IV.28 se detalla el estudio comparativo entre los CCR con IMS y aquellos que presentaron EMS, en relación a los marcadores del ciclo celular.



**Tabla IV.28.** Estudio comparativo de los tumores con IMS y EMS según la expresión de los marcadores de ciclo celular.

|   | IMS<br>n (%)     |  | EMS<br>n (%)      | p ( $\chi^2$ )* |
|---|------------------|--|-------------------|-----------------|
| <b>Marcadores de ciclo celular.</b>                     |                  |  |                   |                 |
| Cdk2 (n=27)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=14)       | 4 (67)<br>2 (33) |  | 9 (43)<br>12 (57) | NS              |
| Ciclina A (n=28)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=15)  | 5 (71)<br>2 (29) |  | 8 (38)<br>13 (62) | NS              |
| Ciclina D1 (n=28)<br>Positivo (n=12)<br>Negativo (n=16) | 5 (71)<br>2 (29) |  | 7 (33)<br>14 (67) | NS              |
| Ciclina D3 (n=28)<br>Positivo (n=12)<br>Negativo (n=16) | 4 (57)<br>3 (43) |  | 8 (38)<br>13 (62) | NS              |
| Ciclina E (n=27)<br>Positivo (n=8)<br>Negativo (n=19)   | 5 (83)<br>1 (17) |  | 3 (14)<br>18 (86) | <b>0'004</b>    |
| p16 (n=27)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=14)        | 4 (67)<br>2 (33) |  | 9 (43)<br>12 (57) | NS              |
| p21 (n=25)<br>Positivo (n=14)<br>Negativo (n=11)        | 4 (67)<br>2 (33) |  | 10 (53)<br>9 (47) | NS              |
| p27 (n=23)<br>Positivo (n=12)<br>Negativo (n=11)        | 4 (80)<br>1 (20) |  | 8 (44)<br>10 (56) | NS              |
| RB-P (n=27)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=14)       | 2 (29)<br>5 (71) |  | 11 (55)<br>9 (45) | NS              |
| Skp2 (n=26)<br>Positivo (n=12)<br>Negativo (n=14)       | 3 (60)<br>2 (40) |  | 9 (43)<br>12 (57) | NS              |
| Chk2 (n=24)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=11)       | 3 (60)<br>2 (40) |  | 10 (53)<br>9 (47) | NS              |

\* Se muestra el valor estadístico de p obtenido tras realizar la prueba estadística deL Test exacto de Fisher para variables categóricas no paramétricas.

El marcador que destaca por encima del resto es la ciclina E, la cual se encuentra presente en la mayoría de los tumores IMS, mientras que ocurre lo contrario en los EMS. Esta característica de los CCR con IMS ha sido descrita previamente (Sutter et al. 2002), incluso

llegando a formular la hipótesis de que la sobre-expresión de ciclina E podría ser responsable de la inestabilidad de microsatélites en CCR (Simone et al. 2002). El resto de resultados no presentan diferencias entre los grupos.

#### 2.3.1.3. Otras proteínas.

Entre los diferentes marcadores nos encontramos con proteínas relacionadas con la adhesión celular, proliferación celular, apoptosis, y otros, como son la citoqueratina 20 (CK-20), utilizado como marcador inmunohistoquímico del CCR, RAD50, que contribuye a la activación de los puntos de control del ciclo y a la reparación del ADN, favoreciendo la estabilidad genómica, o SMAD4, implicado en la vía de señalización de TGF- $\beta$ , suprimiendo el crecimiento epitelial. En la Tabla IV.29 se detallan los resultados en los dos grupos de tumores.

**Tabla IV.29.** Comparación de la expresión inmunohistoquímica de marcadores de adhesión, proliferación, apoptosis y otros procesos celulares, entre los tumores con IMS y con EMS.

| <b>Inmunohistoquímica</b>   | <b>IMS</b><br>n (%) |  | <b>EMS</b><br>n (%) | <b>p (<math>\chi^2</math>)*</b> |
|---|---------------------|--|---------------------|---------------------------------|
| <b>Marcadores moleculares</b>   |                     |  |                     |                                 |
| <b><u>Adhesión celular</u></b>  |                     |  |                     |                                 |
| E-cadherina (n=26)<br>Positivo (n=19)<br>Negativo (n=7)                   | 4 (67)<br>2 (33)    |  | 15 (75)<br>5 (25)   | NS                              |
| $\beta$ -catenina<br>Membrana (n=28)<br>Positivo (n=24)<br>Negativo (n=4) | 6 (86)<br>1 (14)    |  | 18 (86)<br>3 (14)   | NS                              |
| Núcleo (n=28)<br>Positivo (n=10)<br>Negativo (n=18)                       | 2 (29)<br>5 (71)    |  | 8 (38)<br>13 (62)   | NS                              |
| <b><u>Proliferación</u></b>   |                     |  |                     |                                 |
| Ki-67 (n=27)<br>Positivo (n=17)<br>Negativo (n=10)                        | 3 (50)<br>3 (50)    |  | 14 (67)<br>7 (33)   | NS                              |
| p53 (n=28)<br>Positivo (n=15)<br>Negativo (n=13)                          | 4 (57)<br>3 (43)    |  | 11 (52)<br>10 (48)  | NS                              |
| <b><u>Apoptosis</u></b>   |                     |  |                     |                                 |
| Bcl-2 (n=28)<br>Positivo (n=7)<br>Negativo (n=21)                         | 2 (29)<br>5 (71)    |  | 5 (24)<br>16 (76)   | NS                              |
| <b><u>Otros</u></b>   |                     |  |                     |                                 |
| CK-20 (n=17)<br>Positivo (n=10)<br>Negativo (n=7)                         | 1 (20)<br>4 (80)    |  | 9 (75)<br>3 (25)    | NS                              |
| RAD50 (n=16)<br>Positivo (n=10)<br>Negativo (n=6)                         | 1 (25)<br>3 (75)    |  | 9 (75)<br>3 (25)    | NS                              |
| SMAD4 (n=24)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=11)                        | 2 (50)<br>2 (50)    |  | 11 (55)<br>9 (45)   | NS                              |

\* Se muestra el valor estadístico de p obtenido tras realizar la prueba estadística del Test exacto de Fisher para variables categóricas no paramétricas.

No se aprecian diferencias significativas entre ambos grupos, aunque los resultados en marcadores como CK20 y RAD50 se quedan en el límite de la significación. Probablemente lo reducido de la muestra está condicionando alguno de estos resultados. En el caso de CK20, los IMS de nuestro estudio presentan una expresión reducida del mismo, que parece ser una característica de este tipo de tumores (McGregor et al. 2004). En cuanto a RAD50, se ha visto que la alteración en el sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN conlleva una reducción en la expresión de dicho marcador, como sucede en nuestro caso (Duval and Hamelin 2002; Giannini et al. 2002; Giannini et al. 2004).

#### **2.4. Factores pronóstico. Análisis de supervivencia.**

A continuación se analizan los factores pronóstico y la supervivencia en los dos grupos de tumores, IMS y EMS.

##### 2.4.1. Tumores con IMS.

###### a) Factores pronóstico.

En la tabla IV.30 se muestran los valores que resultaron estadísticamente significativos.

**Tabla IV.30.** Relación de variables discretas con posible valor pronóstico, en relación con la mortalidad y la aparición de recidiva tumoral, para los casos que presentaron IMS.

---

| <b><u>Variable “Mortalidad”.</u></b> | <b><i>P</i></b> | <b><i>Descripción.</i></b>                      |
|--------------------------------------|-----------------|---|
| <i>Células en anillo de sello.</i>   | <b>0.05</b>     | La presencia condiciona mal pronóstico.         |
| <i>p53.</i>                          | <b>0.03</b>     | La falta de expresión determina mal pronóstico. |

**Variable “Recidiva”.**

*No existen variables con significación estadística.*

---

A la hora de hablar de los factores pronóstico, el tamaño muestral para los tumores IMS condiciona el análisis estadístico. Por ello, sólo alcanzan la significación como factores de mal pronóstico la presencia de células en “anillo de sello” y la ausencia de p53. En el primer caso, la ausencia de dicho tipo celular condiciona una supervivencia del 88%, por lo que la presencia determina mal pronóstico, circunstancia que había sido señalada en la literatura para el CCR en general y para el del adulto joven en particular (Chung et al. 1998; Nissan et al. 1999). En relación a la expresión de p53, su presencia se asocia con mayor supervivencia.

Aunque pocas variables alcanzan la significación estadística, en nuestros resultados se observa una serie de características, como mucosecreción, ausencia de pólipos durante la evolución, presentación esporádica del tumor, o expresión nuclear de  $\beta$ -catenina, que podrían asociarse a mal pronóstico. Es probable que alguna de ellas no alcance la significación estadística por lo reducido del tamaño muestral.

Respecto a los factores pronóstico relacionados con la “recidiva tumoral” no se encuentra ninguno que presente significación estadística entre las variables anatomoclínicas analizadas. Sólo la presencia de células en “anillo de sello” y la ausencia en la familia de neoplasias no

relacionadas con el síndrome de Lynch presentan cierta tendencia a relacionarse con una mayor probabilidad de aparición de recidivas. En el análisis de los marcadores inmunohistoquímicos, se aprecia una tendencia a la significación en el caso, de nuevo, de p53 ( $p = 0,07$ ). La falta de expresión de p53 se asociaría con la aparición de recidivas. Es importante destacar que en el grupo de CCR que presentaron IMS no existe relación entre la aparición de recidivas y la estadificación tumoral.

b) Análisis de la supervivencia.

El análisis de la supervivencia se realiza por medio del método Kaplan-Meier. Las variables con significación estadística relacionadas con los tumores IMS se detallan en la Tabla IV.31.

**Tabla IV.31.** Relación de las variables discretas que presentan significación estadística en el análisis de supervivencia para los casos que presentaron IMS.

---

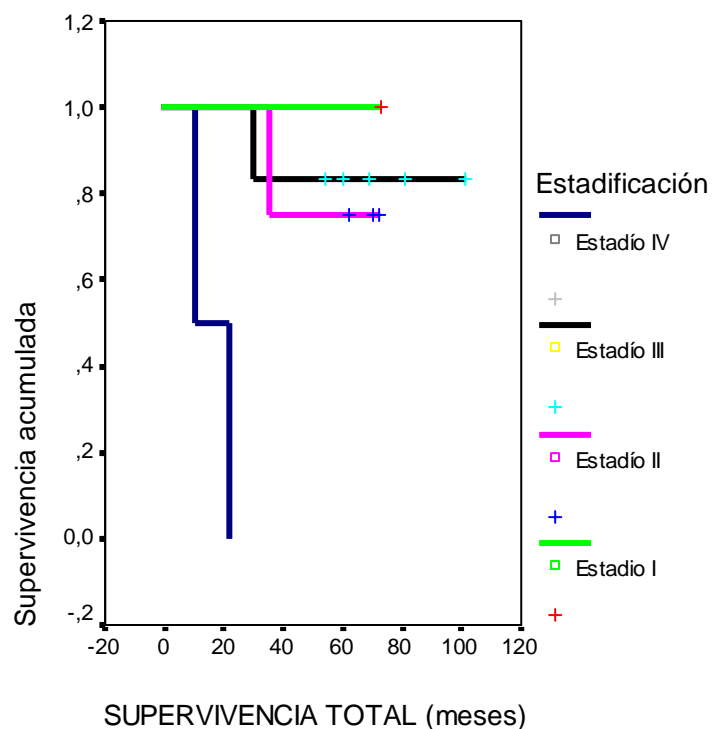
| <b><u>Variables que se asocian con mayor supervivencia.</u></b> | <b><i>P</i></b>   |
|---|-------------------|
| <i>Ausencia de células con producción de moco.</i>              | <b>0,04</b>       |
| <i>Expresión de p53.</i>  | <b>0,01</b>       |
| <i>Expresión de ciclina D1.</i>                                 | <b>0,008</b>      |
| <i>Expresión de ciclina E.</i>                                  | <b>0,025</b>      |
| <i>Expresión de ciclina A.</i>                                  | <b>0,008</b>      |
| <br>  |                   |
| <b><u>Variables que se asocian con menor supervivencia.</u></b> |                   |
| <i>Metástasis al diagnóstico.</i>                               | <b>&lt; 0,001</b> |
| <i>Aparición de recidiva tumoral.</i>                           | <b>&lt; 0,001</b> |

---

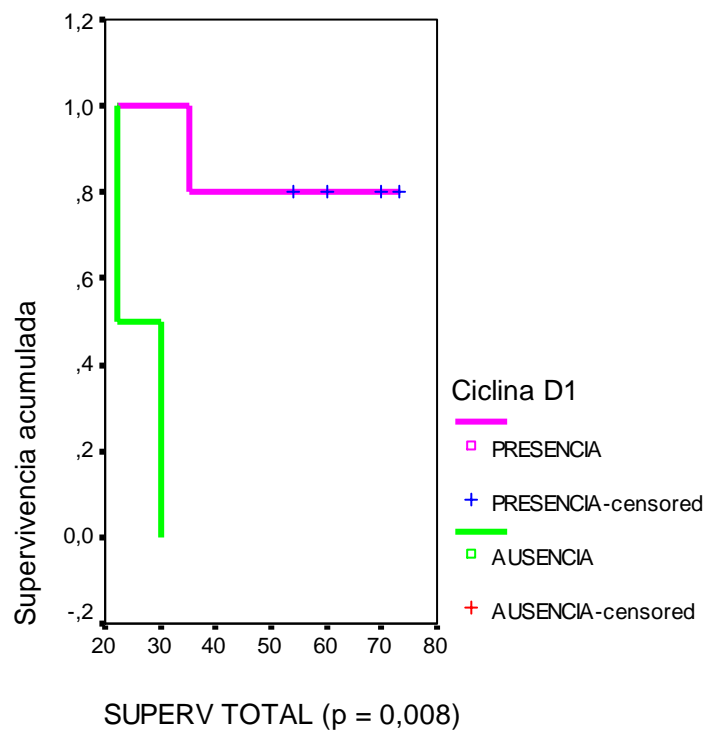
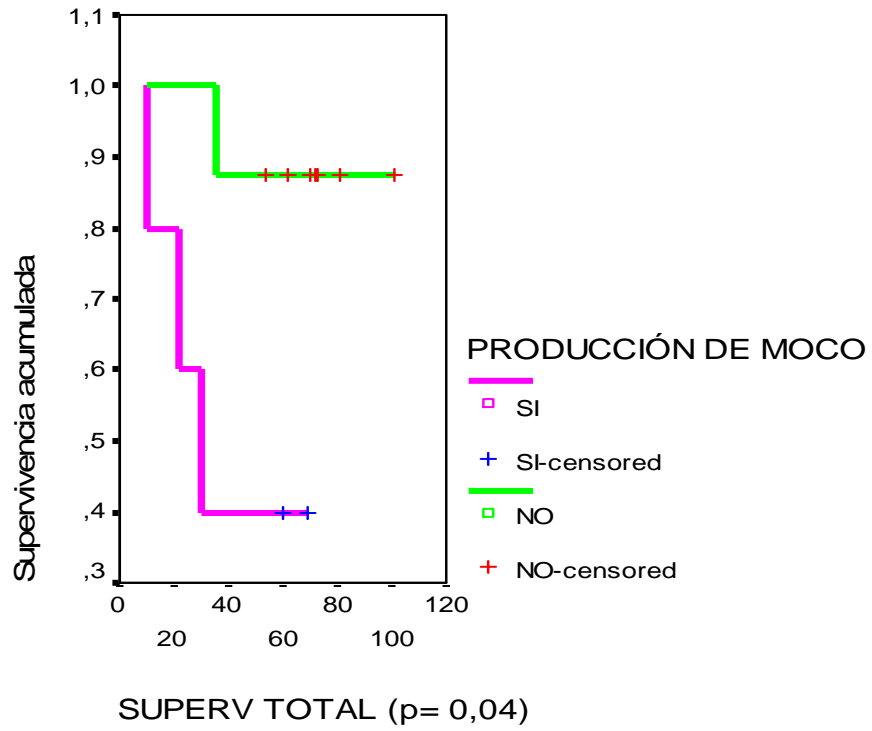
Los CCR con IMS que presentarían una mayor supervivencia serían aquellos con expresión normal de p53; ciclina D1 (Figura IV.8.); ciclina E; y ciclina A, y que vienen detallados en la Tabla IV.31.

Al contrario, los CCR que mostrarían una menor supervivencia serían aquellos con presencia de moco en el tumor (Figura IV. 8) y de metástasis en el momento del diagnóstico del CCR, así como los que desarrollasen recidiva tumoral durante el período de observación.

En el caso de la variable “estadificación tumoral”, señalar que los estadios II y III se intercambian en la progresión resultante de menor a mayor estadio, en relación a la gradación de mayor a menor supervivencia (Figura IV.7).



**Figura IV. 7.** Curvas de supervivencia en relación a la estadificación de los CCR que presentan IMS.



**Figura IV.8.** Curvas de supervivencia para las variables producción de moco y presencia o ausencia de ciclina D1.



## 2.4.2. Tumores con EMS.

### a) Factores pronóstico.

Las características significativamente relacionadas con el pronóstico en los tumores EMS se muestran en la Tabla IV. 32.

**Tabla IV.32.** Relación de variables discretas con posible valor pronóstico, en relación con la mortalidad y la aparición de recidiva tumoral, para los casos que presentaron EMS.

---

| <b><u>Variable “Mortalidad”.</u></b> | <b><i>P</i></b>   | <b><i>Descripción.</i></b> |
|--------------------------------------|-------------------|----------------------------|
| <i>Estadificación avanzada.</i>      | <b>&lt; 0.001</b> | Mal pronóstico.            |
| <i>Presencia de metástasis.</i>      | <b>&lt; 0.001</b> | Mal pronóstico.            |

| <b><u>Variable “Recidiva”.</u></b> |             |  |
|------------------------------------|-------------|--|
| <i>Localización del CCR.</i>       | <b>0.04</b> | Los tumores en colon izquierdo tendrían peor pronóstico. |

---

De las variables que se asocian con la mortalidad nos encontramos en primer lugar con la estadificación tumoral. La otra variable relacionada con un mal pronóstico es la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico. Su presencia da, como es esperable, un 100% de mortalidad (8 casos), mientras que la ausencia determina un 19% (4 casos). El resto de variables analizadas no presentan significación estadística. Sin embargo, entre ellas cabe destacar la variable localización del CCR (derecho, izquierdo y recto), con una mortalidad

para la segunda de un 64%, mientras que para el recto y el colon derecho sólo resultan de 29% y 27%, respectivamente. No obstante, ninguno de estos valores alcanza la significación estadística.

En cuanto a la relación entre las diferentes variables y la presencia o no de recidiva tumoral, la localización del CCR a nivel del colon izquierdo es la única que presenta significación estadística (Tabla IV.32). La localización en el colon izquierdo se asoció con incidencia de recidiva en el 57% de los casos (4 casos de los 7 en dicha localización), mientras que la localización en el colon derecho sólo con el 11% (1 caso).

No se observaron recidivas cuando el CCR se localizaba en el recto. Es importante, por otro lado, destacar la expresión de la proteína p53, que cuando se halla expresada se asocia a un 50% de recidivas, mientras que no se observaron cuando hubo falta de expresión, si bien estos resultados no alcanzan la significación estadística ( $p = 0.08$ ).

#### b) Análisis de la supervivencia.

Las variables que presentaron significación estadística en relación con la supervivencia se presentan en la Tabla IV.33.

**Tabla IV.33.** Relación de las variables discretas que presentan significación estadística en el análisis de supervivencia.

---

| <u><i>Variables anatómo-clínicas.</i></u> | <i>P</i>          | <i>Descripción.</i>                         |
|---|-------------------|---|
| <i>Metástasis al diagnóstico.</i>         | <b>&lt; 0.001</b> | La presencia determina menor supervivencia. |
| <i>Recidiva tumoral.</i>                  | <b>&lt; 0.001</b> | La aparición determina menor supervivencia. |

---

Como era de esperar tanto la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico como la aparición de recidiva tumoral en la evolución, condicionan una menor supervivencia.

### 3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS TUMORES PROCEDENTES DE MADRID Y LOS DE SEGOVIA.

Entre Enero de 1996 y Diciembre de 1998 se diagnosticaron un total de 31 casos de CCR a una edad igual o menor de 45 años en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGM), mientras que en el periodo de tiempo comprendido entre Enero de 2000 a Diciembre de 2005 lo fueron en el Hospital de Segovia (SEG) un total de 14 pacientes. Según los datos recogidos por el Instituto Nacional de Estadísticas ([www.ine.es](http://www.ine.es)), para la provincia de Segovia, la población en 2000 era de 146613, mientras que en 2004 era de 152640. La correspondiente al Área sanitaria perteneciente al Hospital Gregorio Marañón era en 1996 de 637.028, y en 1998 de 647.154.

#### **3.1. Características anatómo-clínicas y familiares.**

La comparación entre las características más importantes desde el punto de vista anatómico y familiar se expone en la Tabla IV.34. Llevando a cabo el análisis de todas las variables anatómo-clínicas, sólo existen diferencias estadísticamente significativas en la presencia de CCR sincrónicos y/o metacrónicos, con 3 casos en la muestra de Segovia, frente a ninguno en la de Madrid. No existen grandes diferencias a la hora de hablar de la localización del CCR o de la presencia de pólipos a lo largo de la evolución. Sin embargo destaca cierto predominio de edad más precoz al diagnóstico; más frecuencia del sexo masculino; de neoplasias más pobremente diferenciadas y productoras de moco; así como un estadio más avanzado en el momento del diagnóstico de la muestra de Segovia respecto de la perteneciente al Área Sanitaria del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, de Madrid.

**Tabla IV.34.** Resumen de la comparación de las características anatómo-clínicas y familiares entre los CCR del Hospital Gregorio Marañón (HGM), de Madrid, y del Hospital de Segovia (SEG).

|   | <b>Total<br/>n (%)</b> | <b>HGM<br/>n (%)</b> | <b>SEG<br/>n (%)</b> | <b>p (<math>\chi^2</math>)</b> |
|---|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------|
| <b>Pacientes</b>                        | 45 (100)               | 31 (68,9)            | 14 (31,1)            |                                |
| <b>Edad media de aparición (DE)</b>     | 39,07 (4,4)            | 39,65 (3,8)          | 37,79 (5,5)          | NS <sup>1</sup>                |
| <b>Sexo:</b>                            |                        |                      |                      |                                |
| <b>Masculino</b>                        | 23 (51,1)              | 13 (41,9)            | 10 (71,4)            |                                |
| <b>Femenino</b>                         | 22 (48,9)              | 18 (58,1)            | 4 (28,6)             | NS                             |
| <b>Localización tumoral:</b>            |                        |                      |                      |                                |
| <b>Colon derecho</b>                    | 20 (44,4)              | 13 (41,9)            | 7 (50,0)             |                                |
| <b>Colon izquierdo</b>                  | 15 (33,3)              | 11 (35,5)            | 4 (28,6)             |                                |
| <b>Recto</b>                            | 10 (22,2)              | 7 (22,6)             | 3 (21,4)             | NS                             |
| <b>Grado de diferenciación celular:</b> |                        |                      |                      |                                |
| <b>Bien</b>                             | 2 (4,4)                | 1 (3,2)              | 1 (7,1)              |                                |
| <b>Moderado</b>                         | 36 (80,0)              | 27 (87,1)            | 9 (64,3)             |                                |
| <b>Pobre</b>                            | 7 (15,6)               | 3 (9,7)              | 4 (28,6)             | NS                             |
| <b>Producción de moco</b>               | 15 (33,3)              | 9 (29,0)             | 6 (42,9)             | NS                             |
| <b>Astler Collier modificado:</b>       |                        |                      |                      |                                |
| <b>A</b>                                | 3 (6,7)                | 3 (9,7)              | 0 (0,0)              |                                |
| <b>B<sub>1-2</sub></b>                  | 17 (37,8)              | 13 (41,9)            | 4 (28,6)             |                                |
| <b>C<sub>1-2</sub></b>                  | 15 (33,3)              | 9 (29,0)             | 6 (42,8)             |                                |
| <b>D</b>                                | 10 (22,2)              | 6 (19,4)             | 4 (28,6)             | NS                             |
| <b>Presencia de pólipos asociados</b>   | 15 (33,3)              | 11 (35,5)            | 4 (28,6)             | NS                             |
| <b>CCR sincrónico o metacrónico</b>     | 3 (6,7)                | 0 (0,0)              | 3 (21,4)             | <b>0,026</b>                   |
| <b>Historia familiar de cáncer.</b>     |                        |                      |                      |                                |
| <b>Neoplasias relacionada con Lynch</b> | 18 (40,0)              | 14 (45,2)            | 4 (28,6)             | NS                             |
| <b>Neoplasias no Lynch.</b>             | 12 (26,7)              | 10 (32,3)            | 2 (14,3)             | NS                             |
| <b>Casos esporádicos.</b>               | 27 (60,0)              | 17 (54,8)            | 10 (71,4)            | NS                             |

DE: Desviación estándar.

<sup>1</sup> El test llevado a cabo es la t de Student.

En relación a las características familiares parece apreciarse un mayor componente familiar de las neoplasias en la población de Madrid respecto a la de Segovia, tanto para aquellas relacionadas con el síndrome de Lynch, como para las no asociadas al mencionado síndrome.

### 3.2. Características moleculares.

Los resultados del análisis inmunohistoquímicos se presentan en las Tablas IV.35 y 36.

**Tabla IV.35.** Estudio comparativo de los tumores de Madrid (HGM) y de Segovia (SEG) teniendo en cuenta la expresión de los marcadores de ciclo celular analizados en el presente estudio.

|   | HGM<br>n (%)          |  | SEG<br>n (%)          | p ( $\chi^2$ )*   |
|---|-----------------------|--|-----------------------|-------------------|
| <b>Marcadores moleculares</b>                           |                       |  |                       |                   |
| <b><u>Ciclo celular</u></b>                             |                       |  |                       |                   |
| Cdk2 (n=27)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=14)       | 12 (80)<br>3 (20)     |  | 1 (8.3)<br>11 (91.7)  | <b>&lt; 0,001</b> |
| Ciclina A (n=28)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=15)  | 9 (56.3)<br>7 (43.7)  |  | 4 (33.3)<br>8 (66.7)  | NS                |
| Ciclina D1 (n=28)<br>Positivo (n=12)<br>Negativo (n=16) | 8 (50)<br>8 (50)      |  | 4 (33.3)<br>8 (66.7)  | NS                |
| Ciclina D3 (n=28)<br>Positivo (n=12)<br>Negativo (n=16) | 4 (25)<br>12 (75)     |  | 8 (66.7)<br>4 (33.3)  | <b>0,05</b>       |
| Ciclina E (n=27)<br>Positivo (n=8)<br>Negativo (n=19)   | 6 (40)<br>9 (60)      |  | 2 (16.7)<br>10 (83.3) | NS                |
| p16 (n=27)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=14)        | 10 (66.7)<br>5 (33.3) |  | 9 (75)<br>3 (25)      | <b>0,05</b>       |
| p21 (n=25)<br>Positivo (n=14)<br>Negativo (n=11)        | 10 (66.7)<br>5 (33.3) |  | 4 (40)<br>6 (60)      | NS                |
| p27 (n=23)<br>Positivo (n=12)<br>Negativo (n=11)        | 9 (64.3)<br>5 (35.7)  |  | 3 (33.3)<br>6 (66.7)  | NS                |
| RB-P (n=27)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=14)       | 9 (60)<br>6 (40)      |  | 4 (33.3)<br>8 (66.7)  | NS                |
| Skp2 (n=26)<br>Positivo (n=12)<br>Negativo (n=14)       | 8 (57.1)<br>6 (42.9)  |  | 4 (33.3)<br>8 (66.7)  | NS                |
| Chk2 (n=24)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=11)       | 13 (92.9)<br>1 (7.1)  |  | 0 (0)<br>10 (100)     | <b>&lt; 0.001</b> |

\* Se muestra el valor estadístico de p obtenido tras realizar la prueba estadística del Test exacto de Fisher para variables categóricas no paramétricas.

**Tabla IV.36.** Comparación de la expresión inmunohistoquímica de marcadores moleculares de adhesión, proliferación, apoptosis y otros procesos celulares, entre los tumores de las procedencias referidas en la tabla previa.

|   | HGM<br>n (%)          |  | SEG<br>n (%)          | p ( $\chi^2$ )* |
|---|-----------------------|--|-----------------------|-----------------|
| <b>Marcadores moleculares</b>   |                       |  |                       |                 |
| <b><u>Adhesión celular</u></b>  |                       |  |                       |                 |
| E-cadherina (n=26)<br>Positivo (n=19)<br>Negativo (n=7)                   | 11 (78.6)<br>3 (21.4) |  | 8 (66.7)<br>4 (33.3)  | NS              |
| $\beta$ -catenina<br>Membrana (n=28)<br>Positivo (n=24)<br>Negativo (n=4) | 15 (93.7)<br>1 (6.3)  |  | 9 (75)<br>3 (25)      | NS              |
| Núcleo (n=28)<br>Positivo (n=10)<br>Negativo (n=18)                       | 8 (50)<br>8 (50)      |  | 2 (16.7)<br>10 (83.3) | NS              |
| <b><u>Proliferación</u></b>   |                       |  |                       |                 |
| Ki-67 (n=27)<br>Positivo (n=17)<br>Negativo (n=10)                        | 9 (60)<br>6 (40)      |  | 8 (66.7)<br>4 (33.3)  | NS              |
| p53 (n=28)<br>Positivo (n=15)<br>Negativo (n=13)                          | 11 (68.8)<br>5 (31.2) |  | 4 (33.3)<br>8 (66.7)  | NS              |
| <b><u>Apoptosis</u></b>   |                       |  |                       |                 |
| Bcl-2 (n=28)<br>Positivo (n=7)<br>Negativo (n=21)                         | 6 (37.5)<br>10 (62.5) |  | 1 (8.3)<br>11 (91.7)  | NS              |
| <b><u>Otros</u></b>   |                       |  |                       |                 |
| CK-20 (n=17)<br>Positivo (n=10)<br>Negativo (n=7)                         | 3 (50)<br>3 (50)      |  | 7 (63.6)<br>4 (36.4)  | NS              |
| RAD50 (n=16)<br>Positivo (n=10)<br>Negativo (n=6)                         | 5 (83.3)<br>1 (16.7)  |  | 5 (50)<br>5 (50)      | NS              |
| SMAD4 (n=24)<br>Positivo (n=13)<br>Negativo (n=11)                        | 6 (46.2)<br>7 (53.8)  |  | 7 (63.6)<br>4 (36.4)  | NS              |

\* Se muestra el valor estadístico de p obtenido tras realizar la prueba estadística del test exacto de Fisher para variables categóricas no paramétricas.

Otros datos que merecen destacarse, aunque no presenten significación estadísticas, serían la mayor proporción de CCR con IMS (38% vs 15%) y de mutaciones de los genes relacionados (33%) de la muestra de Madrid con respecto a la de Segovia (14,3%). Todo ello guardaría relación con el mayor componente familiar neoplásico observado en la población de Madrid.

Desde el punto de vista de los marcadores moleculares, destacan las diferencias de expresión de Cdk2 y Chk2 ( $p < 0.001$ ), y la existente entre la ciclina D3 y p16 ( $p = 0.05$ ). Las dos primeras con falta de expresión casi en la totalidad de muestras de Segovia.

Por último, el origen de las muestras no parece determinante como factor pronóstico, ni influye en la probabilidad de una mayor supervivencia en el tiempo. La mortalidad del grupo de Madrid resultó ser de 35,5%, mientras que la de Segovia fue del 42,9%. Sin embargo, y a pesar de lo mencionado con anterioridad, en la curva de supervivencia según el método Kaplan-Meier se apreció una mayor supervivencia para el grupo de Madrid frente al de Segovia, sin que esta aparente diferencia alcance la significación estadística.





## **V. DISCUSIÓN**



## 1. EL CÁNCER COLORRECTAL EN EL ADULTO JOVEN.

El CCR es la cuarta variante más frecuente de cáncer en el mundo, así como la tercera causa de muerte por cáncer en los países desarrollados, con un riesgo acumulado de un 2-6% en la población general. En España, a pesar de ser menores que las tasas promedio de Europa, la tendencia es a ir en aumento [WHO-IARC 2002]. La mayor parte del CCR ocurre predominantemente en pacientes mayores, con una edad media al diagnóstico de 60 a 70 años (Chiang et al. 2003). El CCR de aparición a edad precoz, que aparece a una edad menor de 45 o 50 años, según las publicaciones, presenta una frecuencia reducida, no alcanzando en ninguno caso el 10% del total de CCR (Chung et al. 1998; Guillem et al. 1999; Mitry et al. 2001; Chiang et al. 2003).

El CCR en el adulto joven parece presentar características distintivas con respecto a aquellos casos que aparecen en individuos de mayor edad. Desde el punto de vista anatomoclínico los tumores se presentan con mayor frecuencia a nivel del colon derecho, son tumores con bajo grado de diferenciación, mucinosos y con una mayor probabilidad de presentar tumores sincrónicos y/o metacrónicos (Chiang et al. 2003). Otra característica es el estadio avanzado en el que se diagnostican estos tumores en muchas de las series (Chung et al. 1998; Mitry et al. 2001; Chiang et al. 2003).

La mayoría de las diferencias referidas son más marcadas si se divide el grupo según presenten o no antecedentes familiares compatibles con el síndrome de Lynch (Guillem et al 1999). El CCR que se presenta a edad precoz es un grupo heterogéneo, en que se hallan incluidos desde casos esporádicos hasta casos con una alta carga familiar, destacando este último extremo, puesto que existen múltiples estudios en los que se ha demostrado la importancia del criterio “edad precoz” a la hora de establecer el diagnóstico de síndrome de Lynch, ya que la frecuencia del síndrome en pacientes con CCR entre 40-45 años alcanza el 15%-20% (Guillem et al. 1996; Fante et al. 1997). En aquellos casos que presentan características de síndrome de Lynch, aumenta la proporción de tumores a nivel de colon derecho y mejora el pronóstico (Chung et al. 1998; Guillem et al. 1999; Lynch and de la Chapelle. 1999; Gryfe et al. 2000; Liang et al. 2003; Chiang et al. 2003). Por otro lado, en los

casos esporádicos el rasgo más importante es la presentación en un estadio más avanzado a la hora del diagnóstico (Guillem et al. 1999; Chiang et al. 2003).

Desde el punto de vista molecular, los CCR de edad precoz al diagnóstico pueden subdividirse en tumores con Inestabilidad de Microsatélites (IMS) o Estabilidad de Microsatélites (EMS), consecuencia de una alteración a nivel del sistema de reparación de errores de emparejamiento en el ADN (MMR), o no, respectivamente. Como es lógico, en el primer caso la frecuencia de casos con síndrome de Lynch es mayor, con la presencia de una alteración constitucional a nivel de alguno de los genes del sistema MMR. Se ha llegado a estimar que, en casos con CCR a una edad igual o menor de 40 años, entre el 47 y el 60% de los casos llegan a mostrar IMS, con un 25% presentando mutaciones germinales en los genes de reparación del ADN (Liu et al. 1995; Dunlop et al. 1997; Lukish et al. 1998). El segundo grupo lo integran aquellos tumores con EMS, en los que predomina la vía de la inestabilidad cromosómica (IC), equivalente a la implicada en los casos de CCR esporádicos de edad avanzada, con alteraciones en los genes *APC*, la  $\beta$ -catenina, *p53* y otros (Losi et al. 2005). Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que este grupo de tumores con EMS presentan dos fenotipos diferenciados, con y sin IC, llegando a sugerirse la posibilidad de una forma hereditaria de CCR dentro de la población de CCR diploides EMS de inicio precoz (Boardman et al. 2007a). Este extremo se ve reforzado por dos hallazgos relacionados con estos tumores. Por un lado, el riesgo aumentado de presentar CCR en familiares de primer grado del sujeto índice, en especial en hermanos (RR = 2,67) (Boardman et al. 2007b); por otro, la posibilidad de que exista un gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 14, implicado en la carcinogénesis de este tipo de tumores (Mourra et al. 2007).

Dentro de los CCR de aparición a edad joven cabe diferenciar un subgrupo con características específicas, como es el de los CCR que aparecen en la infancia y la adolescencia, en sujetos hasta una edad de 20-24 años (Durno et al. 2005; Hill et al. 2007). La proporción de tumores productores de mucina es más alta en este grupo, alcanzando en algunas series hasta el 62%, siendo ésta una de las causas del mal pronóstico de los mismos (Hill et al. 2007). La otra, es el estadio avanzado de la enfermedad que presentan los pacientes al diagnóstico, llegando al 86% de los pacientes con un estadio evolucionado (Hill et al. 2007). Estos dos puntos determinarían el peor pronóstico que presentan los CCR en este rango de edad. Los síntomas de presentación son similares a los del adulto. Sin embargo, la localización del CCR en edad

pediátrica no es predominantemente derecha, siendo en algunas series más frecuentemente izquierda. También en este grupo de CCR en la infancia y la adolescencia es más frecuente la aparición de una segunda neoplasia (Durno et al. 2005).

Desde el punto de vista molecular, no existen muchos estudios al respecto. Sin embargo, se ha descrito una alta proporción de casos con IMS, alcanzando en algunos estudios el 70%, con un 30% de mutaciones germinales a nivel de *MLH1* y *MSH2* (Terdiman et al. 2002; Durno et al. 2005). Existe a su vez una concordancia directa entre la mayor frecuencia de una segunda neoplasia en estos sujetos y la presencia de IMS en la misma, característica del fenotipo mutador (Gafanovich et al. 1999; Durno et al. 2005)

## 2. CARACTERÍSTICAS GLOBALES DEL CCR EN MENORES DE 45 AÑOS.

### 2.1. Características anatómicas-clínicas.

#### 2.1.1. Características clínicas.

En nuestra serie no hemos encontrado diferencias en la distribución por sexos, presentando una proporción equivalente para ambos (51,1% de mujeres frente al 48,9% de varones). La edad media al diagnóstico del CCR fue de 39,07 años (Rango: 25-45 años). En cuanto a lo publicado en la literatura utilizando la edad de corte de 45 años del diagnóstico del CCR para definir el grupo de adulto joven, las proporciones varían, encontrando algunos trabajos en los que las proporciones son mayores para las mujeres, alcanzando en algunos el 61% (Yiu et al. 2005), mientras que en otros ocurre lo contrario, siendo la población masculina la dominante (Losi et al. 2005). Como podía esperarse, las edades medias al diagnóstico coinciden con nuestros resultados en un intervalo estrecho cuando se fija una misma edad de corte al diagnóstico (Losi et al. 2005; Yiu et al. 2005).

Una característica destacable es la localización predominante en el colon derecho, con el 44,4% de los casos, frente a la localización izquierda y el recto. Estos datos concuerdan con algunos de los publicados en la literatura, en los que dicha localización en pacientes jóvenes puede alcanzar hasta el 53% (Lin et al 2005; Liang et al. 2006; Savas et al. 2007).

Sin embargo, no sucede así con lo publicado por Guillem et al (1999), donde sólo el 23% de los casos corresponden a CCR en el colon derecho, mientras que el 49% se presentan a nivel del recto. También en la serie de Liang et al (2003) tan sólo el 29,7% de los casos se localizan en el colon derecho. Igual sucede en la muestra de Pucciarelli et al (2003), con un 21,6% de los casos. En la serie de Boardman et al (2007) el porcentaje predominante de localización derecha se halla en el subgrupo de mayores de 65 años, con un 48%, mientras que en el de menos de 50 años sólo llega al 24%. En el trabajo de Yiu et al (2005) el 18% son de localización derecha en los jóvenes, frente al 27% en los adultos de edad avanzadas. Es necesario apuntar que muchos de estos estudios están llevados a cabo en instituciones que son centros de referencia de cirugía coloproctológica, por lo que existe una mayor proporción de intervenciones de CCR a nivel del recto (Guillem et al 1999; Yiu et al. 2005; Boardman et al 2007). La localización del colon derecho se hace más manifiesta en el momento en que se estratifican los resultados según presenten o no agregación familiar para neoplasias relacionadas con el síndrome de Lynch, o características propias de éste, como es la IMS, como puede apreciarse en la Tabla IV.18.

#### 2.1.2. Características anatómo-patológicas.

En un 5-10% de los adenocarcinomas, la producción de moco es importante, hablándose entonces de adenocarcinomas mucosecretorios. Cuando el moco se acumula intracelularmente, se denominan adenocarcinomas con células en “anillo de sello”. Los tumores productores de moco son muy frecuentes en los CCR que aparecen en pacientes jóvenes, así como en las formas hereditarias. En nuestros resultados, los mucinosos representan un 24,4%, llegando a alcanzar un 33,3% si a ellos les añadimos los tumores con presencia de células en “anillo de sello”. Estos datos son concordantes con lo descrito en la literatura. En las distintas series la proporción de tumores productores de mucina es alta en el global de casos, abarcando desde el 14% al 38% (Guillem et al. 1999; Chiang et al. 2003; Liang et al. 2003; O’Connell et al. 2004; Lin et al. 2005). Estos datos adquieren mayor relieve en algunos trabajos cuando se comparan con un grupo control de pacientes con CCR a edad avanzada, siendo la frecuencia tres veces mayor entre los jóvenes (Chiang et al. 2003; Liang et al. 2003). En otras series, para que los porcentajes adquieran cierta entidad, como ocurre en la de Losi et al (2005), es necesario estratificar los casos según rasgos característicos del síndrome de Lynch, pasando entonces del 7% al 14%, o incluso llegar hasta el 57%, como sucede en la serie de Guillem et al. (1999). En

la nuestra, la proporción de tumores productores de moco aumenta también a la hora de diferenciarlos entre IMS y EMS, siendo mayor para los primeros, como se verá más adelante. La alta proporción de tumores con estas características se debe, por tanto, al importante grupo de tumores que siguen la vía de la IMS, porcentualmente mayor en los CCR de jóvenes que en los CCR en adultos.

Respecto al grado de diferenciación que presentaron los tumores, es destacable la presencia de adenocarcinomas con bajo grado de diferenciación, con un 15,6% de los casos. Esta cifra se sitúa en el punto medio de lo descrito hasta ahora en la literatura, donde en algunos casos la proporción de CCR con bajo grado de diferenciación alcanza el 64% (O'Connell et al. 2004; Boardman et al. 2007). De nuevo, en el momento en que los casos se estratifican según la IMS, la proporción se ve a sí mismo aumentada (Gryfe et al. 2000). Lo mismo sucede si se comparan los CCR en adultos jóvenes con subgrupos de población de edad más avanzada, como en el caso de Chiang et al (2003), que pasa de un 17% en menores de 30 años, a un 7% en mayores de 60; o como lo descrito por Liang et al (2003), que oscila del 7,2% en menores de 40 años al 3,2% en mayores de 60. Estos mayores porcentajes de tumores de bajo grado de diferenciación también se asocian a la mayor presencia en la población joven de tumores IMS, puesto que también es una característica de ellos (Kim et al. 1994; Jass 2004; Luo et al. 2005).

### 2.1.3. Estadificación tumoral.

La estadificación tumoral se considera uno de los factores pronósticos más importantes del CCR, tanto a la hora de hablar de la supervivencia de los sujetos, como del riesgo de presentar recidiva tumoral. En nuestro estudio, llama la atención el alto porcentaje de tumores diagnosticados en estadios avanzados (III y IV), alcanzando entre ambos un 55,5% de los casos, con un 22,2% que se presentan ya con metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (ver Tabla IV.4 del capítulo de Resultados).

Nuestros resultados coinciden con los publicados en la literatura para el CCR de aparición a edad temprana, hallándose en el límite inferior para el intervalo reflejado en los diferentes trabajos. Los porcentajes correspondientes a los estadios C y D en el momento del diagnóstico oscilan entre el 52% y el 91% (Griffin et al. 1991; Guillem et al. 1999; Gryfe et al. 2000; Liang et al. 2003; Lin et al. 2005; Losi et al. 2005). En una revisión de conjunto llevada a cabo por O'Connell et al (2004), el estadio C se detectó en el 41%, y el estadio D en el 25% de los

casos. Esta alta proporción de casos en los estadios avanzados se acentúa cuando se comparan con los CCR diagnosticados a edad más avanzada, cuyos porcentajes de casos diagnosticados en ambos estadios vienen comprendidos entre el 32% y el 51%, siempre menores al subgrupo de jóvenes (Okuno et al. 1987; Marble et al. 1992; Chiang et al. 2003; Liang et al. 2003).

Es un hecho que el CCR en el adulto joven se diagnostica tarde. Una de las posibles causas podría encontrarse en que los pacientes menores de 50 años no son, salvo en casos concretos, una población diana de programas de cribado de CCR. Sólo aquellos individuos pertenecientes a familias con agregación para el CCR, o bien aquellos que presenten antecedentes personales de cáncer van a entrar en programas periódicos de cribado (Castells y Marzo 2004). En nuestro trabajo, si consideramos tan sólo a aquellos sujetos con antecedentes familiares de neoplasias, las proporciones de los estadios más avanzados (C y D) disminuyen al 40% y al 13%, respectivamente, haciendo ver, posiblemente, la influencia de los métodos de cribado en este grupo de sujetos.

Sin embargo, las tasas en general siguen siendo muy altas. Por una parte, nos encontramos con aquellos sujetos que no presentan ningún criterio para entrar en los programas de cribado del CCR al no presentar antecedentes familiares de neoplasias, y por otra, habría que considerar también una posible carcinogénesis acelerada, al menos en los CCR con IMS (Lynch et al. 1988; Vasen et al. 1993; Jass et al. 1994; de Jong et al. 2004). El 31% de nuestra serie tiene IMS, y al analizarlos, encontramos que el 61,5% de ellos se dan en estadios C y D, y ningún caso en el A (Ver Tabla IV.20. de Resultados), frente al 51,7% de los EMS en estadios C y D. A pesar de no alcanzar la significación estadística, estos datos parecen confirmar la hipótesis previa de que la secuencia de carcinogénesis está acelerada en los IMS, pudiendo, por tanto, justificar al menos en parte, el diagnóstico en estadios avanzados.

Estos datos, si bien son limitados y no permiten sugerir un replanteamiento de las estrategias de despistaje en el CCR dentro de la población más joven, sí apuntan la necesidad de prestar mayor atención a cualquier síntoma relacionado con el CCR en este grupo de población, mucho más en aquellos supuestos en los que existan antecedentes familiares o personales de neoplasias. De esta manera, podrían llevarse a cabo de inmediato las pruebas necesarias para descartar dicha patología, o en caso contrario, llegar a un diagnóstico precoz, condicionando, por tanto, una disminución de la morbimortalidad de estos pacientes.



#### 2.1.4. Seguimiento.

La Supervivencia Total (ST) y la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) en nuestro estudio fueron de 50,56 y 42,40 meses respectivamente, y si consideramos sólo la de aquellos que no presentaron metástasis en el momento del diagnóstico, ambas aumentan hasta los 61,12 y 54,51 meses. La mortalidad en nuestra serie fue del 37,8%, siendo algo menor que en la literatura, donde varía entre el 46% y el 56% (Gryfe et al. 2000; Liang et al. 2006). Esta última diferencia muy probablemente es debida a que la media de seguimiento en éstos trabajos es mayor que en el nuestro.

En la revisión llevada a cabo por O'Connell et al. (2004), la supervivencia media a los 5 años es del 33,4% en pacientes menores de 40 años, aunque en otros trabajos alcanza el 58% (Paraf et al. 2000; Liang et al. 2006). Las razones de estas tasas de mortalidad tan importantes se relacionan con la consiguiente proporción de estadios avanzados con que se diagnostican los CCR en este grupo de edad.

Cuando se comparan los CCR en adulto joven con los CCR a edad más avanzadas, la supervivencia a los cinco años resulta equivalente, a pesar de que, como se ha dicho antes, los CCR de los primeros se presentan en estadios más avanzados (Paraf et al. 2000). A este respecto, cabe mencionar el trabajo de Liang et al. (2003), quien estratifica según los estadios del CCR, además de comparar ambos grupos de edad. De esta forma encuentra una equivalencia en la supervivencia relacionada con el CCR para los estadios I, II y III, mientras que para el estadio IV, la supervivencia es significativamente mayor en los jóvenes que en los mayores: 25,46 meses (22,50-28,41) frente a 14,83 (12,61-17,05). Parece claro que la supervivencia guarda una estrecha relación con el estadio en el momento del diagnóstico, pero que tumores con estadios similares podrían tener una mejor supervivencia en los sujetos más jóvenes, especialmente en los estadios avanzados, probablemente porque los individuos más jóvenes resisten mejor las terapias más agresivas.

No existen muchas series en las que se describa la aparición de recidivas locorregionales o a distancia en el seguimiento de estos pacientes. La publicada por el grupo de Liang et al. (2006) sólo indica la presencia de metástasis a distancia en la evolución, que es de 9,3%, para un seguimiento medio de 67,6 meses. En nuestra serie resultó ser del 25,9%, mientras que las recidivas locales surgieron sólo en el 7,8%. La localización más frecuente de las metástasis a

distancia fue el hígado, como ocurre en el CCR esporádico del adulto. En este último grupo, las tasas de recidiva locorregional dependen de la localización, ya que son más frecuentes en pacientes con cáncer de recto (hasta un 32%) que con cáncer de colon, en las que no llegan al 20% (Lledó 2000).

#### 2.1.5. Presencia de pólipos colónicos.

En nuestro estudio, 15 pacientes presentaron algún tipo de pólipo en el colon (33,33%), bien sincrónicos con el CCR, bien de aparición previa al diagnóstico del CCR, o en el seguimiento posterior. Excluyendo uno de los casos, que resultó ser una PAF, con una mutación germinal identificada en el gen *APC*, el número medio de pólipos fue de 1,6. El 60% de ellos (9 casos) se identificaron en el momento del diagnóstico del CCR, mientras que en el seguimiento posterior a la cirugía lo fueron el 26,7%. El tipo más frecuente fue el pólipo adenomatoso (53,3%), seguido del túbulo-veloso con algún grado de displasia y el veloso (20,1% y 13,4%, respectivamente). Otro aspecto a comentar es que cuatro de los adenocarcinomas diagnosticados se desarrollaron sobre pólipos vellosos previos.

No son muchas las series en la literatura en las que se analiza la aparición de pólipos en estos pacientes, y las que lo llevan a cabo, sólo refieren aquellos que se presentan sincrónicos al CCR (Liang et al. 2003). La proporción de pólipos sincrónicos obtenida en nuestro estudio (20% sobre el total de pacientes) resulta equivalente a la del 18,8% publicada por Liang et al. (2003), presentando también un predominio de pólipos adenomatosos, aunque difiriendo en la mayor proporción de pólipos hiperplásicos (10%) en su serie con respecto a la nuestra.

En una serie en la que se analizó la prevalencia de adenomas en individuos jóvenes de riesgo moderado para desarrollar CCR por presentar algún antecedente familiar del mismo tumor, se hallaron en la primera colonoscopia un total de 19 adenomas y dos CCR, y tres adenomas en la primera sigmoidoscopia, de un total de 444 pacientes; en una segunda colonoscopia, en 14 pacientes con adenoma previo, y 162 sin él, se diagnosticaron respectivamente 3 (21%) y 8 (5%) (de Jong et al. 2005).

Parece que los individuos jóvenes que presentan antecedentes personales de CCR o pólipos colónicos, o al menos una proporción de ellos, son “fabricantes” de pólipos, aspecto que probablemente se encuentre en relación con el desarrollo del cáncer a tan temprana edad. Esto

determinaría la necesidad de un seguimiento a largo plazo, si no de por vida, mediante colonoscopia. De la misma manera sería valorable el tratamiento quirúrgico extenso de estos casos cuando surgieran varios pólipos sincrónicos en zonas del colon diferentes al CCR, tanto por la posibilidad de desarrollar más pólipos en el futuro, como por el riesgo mayor y más rápido de degeneración maligna y por la posible aparición de pólipos planos, de más difícil manejo, características comunes al síndrome de Lynch (Lynch et al. 1988; Vasen et al. 1993; Jass et al. 1994; de Jong et al. 2004).

#### 2.1.6. Neoplasias sincrónicas y metacrónicas.

Hemos analizado en nuestra serie la presencia de más de una neoplasia en el mismo individuo. Esta circunstancia es una característica del síndrome de Lynch y por lo tanto, en nuestra serie sería reflejo de un mayor o menor componente genético (Jass and Stewart 1992; de Jong et al. 2004).

En nuestra serie se produjeron CCR sincrónicos y/o metacrónicos en 3 casos (6,6%), siendo dos de ellos sincrónicos. Estos datos coinciden con lo publicado en la literatura, donde los porcentajes oscilan entre el 5% y el 9,8% (Gryfe et al. 2000; Guillem et al. 2000; Liang et al. 2003). En el trabajo de Liang et al. (2003), se compara la muestra de pacientes con CCR a edad menor o igual de 40 años con una de población de edad más avanzada, y se aprecia que esta última revela una proporción menor de los mismos, 1,8% frente al 9,8% correspondiente a la primera. Otro estudio, presentado por Guillem et al. (2000), estratifica las muestras atendiendo a si presentan antecedentes familiares relacionados con el síndrome de Lynch, y los porcentajes ascienden hasta el 37% en los que sí los presentan frente al 0% de los que no tienen antecedentes familiares compatibles on el síndrome de Lynch.

En relación a las neoplasias extracolónicas, nuestros resultados muestran una paciente que desarrolló un carcinoma de endometrio metacrónico, mientras que en otros dos casos se presentaron neoplasias extracolónicas no relacionadas con el síndrome de Lynch: un carcinoma epidermoide de piel, y un encondroma de húmero. En la literatura, dentro de las neoplasias extracolónicas en estos pacientes, no se diferencia entre aquellas relacionadas con el síndrome de Lynch y las que no se asocian. Se ha comunicado una frecuencia de neoplasias extracolónicas que varía entre el 1% y el 3% (Guillem et al. 2000; Liang et al. 2003). En

nuestro caso esta proporción alcanza el 6,6%. El grupo de Liang et al. (2003), encuentra que la proporción de las mismas en el grupo de población más anciana baja desde el 3%, correspondiente a los jóvenes, hasta el 1,8%. Un dato que llama la atención, sin embargo, es el publicado por Durno et al (2005), en donde, al analizar una población mucho más joven (menor o igual de 24 años), la tasa de sujetos que desarrollan en el seguimiento una segunda neoplasia aumenta hasta el 44%, con un seguimiento medio de 12,8 años, y siendo la mayor parte de ellas (75%) neoplasias del tracto intestinal. Esto puede ser debido a dos factores no excluyentes entre sí. Por un lado, un mayor componente genético en los sujetos con CCR de edades más jóvenes. A esto se suma el largo período de seguimiento, casi 13 años, del trabajo, que aumenta la probabilidad de identificar neoplasias metacrónicas.

La aparición de un CCR en un sujeto joven no sólo ha de obligar, por tanto, al seguimiento ya conocido que tiene por objeto la identificación de posibles recidivas de la neoplasia primitiva, sino que además, como se ha visto en los apartados 2.1.5. y 2.1.6., hay que tener en cuenta la posibilidad de la aparición de otros pólipos y/o CCR sincrónicos y metacrónicos, así como de neoplasias en otras localizaciones.

## **2.2. Características familiares.**

Una vez analizados los resultados correspondientes a las características anatómo-clínicas, a partir de los cuales se van perfilando ciertos rasgos diferenciadores de los CCR de aparición a edad temprana, tomamos en consideración las características familiares de los mismos. Como se ha mencionado se confeccionó el árbol familiar de cada *probandus*, a partir del cual se recogen todos los casos de neoplasias que se dan en los miembros de cada familia, y mediante el que se evalúa el riesgo de la familia según la aparición de neoplasias relacionadas con el síndrome de Lynch.

Uno de los criterios de Bethesda, guía clínica para seleccionar pacientes y familias candidatas al estudio de los genes de reparación, es el de presentar un CCR a una edad menor de 45 años (Rodríguez-Bigas et al. 1997a). De ahí que en este grupo de población sea más probable identificar casos relacionados con el mencionado síndrome. En algunas publicaciones, dicho criterio junto a la utilización de la IMS, se recomienda como una herramienta efectiva a la

hora de identificar el síndrome de Lynch, y por tanto, llevar a cabo la identificación de posibles mutaciones en los genes de reparación del ADN (Pucciarelli et al. 2003).

De los 44 casos de nuestra serie, excluido el que presentaba Poliposis Adenomatosa Familiar, hemos encontrado 8 casos (17,8%) que cumplían los criterios de Ámsterdam II para el síndrome de Lynch, además de otros 9 (20%) que, sin llegar a cumplir dichos criterios, presentaban cierta agregación familiar de cáncer. Los 27 pacientes restantes fueron considerados casos de CCR esporádicos al no presentar antecedentes familiares de CCR o de neoplasias asociadas al síndrome de Lynch.

En otro trabajo, los porcentajes de casos con antecedentes familiares sugestivos del síndrome de Lynch varían según el punto de corte de la edad al diagnóstico que se utilice. En el trabajo publicado por Losi et al. (2005), se emplea el mismo que en nuestro estudio, refiriendo un 10% de los casos con criterios de síndrome de Lynch, una proporción algo menor que la aparecida en nuestra serie. Cuando la edad al diagnóstico se reduce hasta los 40 años, los porcentajes varían entre el 3,2 y el 15% (Guillem et al. 1999; Liang et al. 2003; Pucciarelli et al. 2003). En el estudio publicado por Guillem et al (1999), además del 15% de los casos que cumplían criterios de Ámsterdam II, había un 36% de casos que presentaban agregación familiar de CCR.

Excepcional es el caso del trabajo publicado por Durno et al. (2005), que en la serie de 16 pacientes con CCR a una edad igual o menor de 24 años identifican a 10 (62,5%) con criterios clínicos de síndrome de Lynch. Esta proporción tan alta podría ser debida a la edad de corte y, por tanto, no incluir al grupo de CCR que parece insinuarse en los últimos años, con entidad propia dentro del CCR del adulto joven, y diferente del síndrome de Lynch. Esta entidad presentaría características de EMS, una edad media al diagnóstico mayor, una menor agregación familiar y unas bases genéticas probablemente diferentes, aparte de la ausencia de alteraciones en el sistema MMR (Rovella et al. 2001; Jenkins et al. 2002; Schiemann et al. 2004; Boardman et al. 2007a; Mourra et al. 2007; Valle et al. 2007).

Dos son los trabajos en los que analizan la presencia de antecedentes familiares neoplásicos en el grupo de CCR en el adulto joven con un grupo control con CCR a edad superior. En la serie de Liang et al. (2003), no hallan grandes diferencias entre ambos grupos. En el grupo de edad superior el porcentaje de casos con antecedentes familiares que cumplen los criterios clínicos

para el síndrome de Lynch alcanza el 2,8%, frente al 3,2% de los jóvenes. Sin embargo, en el trabajo de Pucciarelli et al.(2003), los porcentajes del grupo de edad más avanzada (mayores de 40 años) sólo alcanza el 1,7%, mientras que para el de los pacientes con CCR a edad igual o menor de 40 años alcanza el 8,1%.

Con todo, pensamos que la identificación de casos de síndrome de Lynch a partir de la edad joven al diagnóstico parece ser una herramienta muy efectiva en nuestro medio y no muy complicada. Su uso retrospectivo, cuando los antecedentes familiares de los pacientes no fueron recogidos en la historia inicial, puede ser muy útil como punto de partida para la identificación de posibles casos de síndrome de Lynch.

En ninguno de los trabajos referidos anteriormente se detallan los diferentes tipos de neoplasias que cada una de las familias presenta, tanto si pertenecen al espectro del síndrome de Lynch, como a las que no se asocian al mismo.

Las neoplasias relacionadas con el síndrome de Lynch más frecuentemente desarrolladas en nuestras familias fueron, excluyendo el CCR de los *probandi*: CCR, de útero, gástrica, de vías urinarias, del Sistema Nervioso Central, de ovario y pancreáticas. Como era de esperar, la más frecuente fue el CCR con un 29,5% de las familias, seguida de la neoplasia de endometrio, con un 13,5%. Llama la atención que las familias pertenecientes al grupo de “agregación de neoplasias relacionadas con el síndrome de Lynch” presentaron esencialmente CCR (66% de las familias), seguido del adenocarcinoma de endometrio en un 22% de los casos (ver Tabla IV.8. de Resultados). En el grupo de “agregación”, en 8 de los 9 casos se pudo llevar a cabo la IMS en el tumor, siendo positiva en cuatro de ellos, resultando tres portadores de mutación en los genes relacionados con sistema MMR. Por tanto, en el grupo de “agregación” encontraríamos casos con síndrome de Lynch en familias con un tamaño reducido. Los tumores con EMS con antecedentes familiares podrían ser consecuencia de cierta predisposición familiar al CCR, distinta a la que presenta el síndrome de Lynch (Rovella et al. 2001; Jenkins et al. 2002; Schieman et al. 2004; Boardman et al. 2007a; Mourra et al. 2007; Valle et al. 2007).

Además, en algunas de las familias pudimos identificar neoplasias distintas a las asociadas al síndrome de Lynch (ver Tabla IV.9. del apartado Resultados). Destaca sobre los demás el cáncer de mama (9,1% de todas las familias), seguido de cerca por el carcinoma de laringe y

las leucemias (6,9% cada uno). Es importante destacar que la neoplasia de mama aparece en los tres grupos (casos con síndrome de Lynch, con agregación familiar y casos esporádicos para el mismo), aunque fue más frecuente en el grupo que muestra agregación familiar (22,2%). La neoplasia de laringe se presentó en el 25% de las familias con criterios clínicos de Ámsterdam II. Un grupo variado de neoplasias surge también, con menos peso en muchas de las familias, en especial en las consideradas como casos de CCR esporádicos.

Podemos pensar que alguno de estos tumores puede ser debido al azar, en especial aquellos más comunes en la población general, como sucedería con los asociados a los CCR que hemos definido como “esporádicos” al no presentar en la familia neoplasias relacionadas con el síndrome de Lynch, y a los que se suma en la familia algún caso de cáncer de mama, pulmón en fumador, etc. Sin embargo existen otras familias donde pueden concurrir factores genéticos, como podría ser el caso de aquellas con “agregación familiar” y EMS, donde serían ciertos genes de baja susceptibilidad al cáncer los que se concentrarían en ellas, y cuyo efecto conjunto les conferiría un aumento del riesgo para el desarrollo de diferentes neoplasias. En cuanto a la asociación de tumores diferentes a los habituales relacionados con el síndrome de Lynch en aquellas familias que cumplían criterios clínicos de sospecha, también se señala esta posibilidad en algunas publicaciones. Este sería el caso de la neoplasia de laringe, que se apunta que podría estar dentro del abanico de tumores asociados a dicho síndrome, aunque las series correspondientes presentan una muestra reducida, o son reseñas de un único caso (Lynch et al. 1988; Maul et al. 2006).

En el trabajo de Oliveira et al. (2004) se analizó el espectro de neoplasias de las familias asociadas al síndrome de Lynch, o familias con cierta agregación de neoplasias relacionadas, sin criterios de edad al diagnóstico, y se encontró que el cáncer de mama es el de más frecuente aparición dentro de las neoplasias que no se asocian por definición al síndrome de Lynch, presente tanto en familias con criterios clínicos o con agregación, con un 26,5% y 27,8%, respectivamente.

Como veremos más adelante cuando distribuimos nuestros tumores en estables e inestables, los antecedentes familiares de neoplasias relacionadas o no con el síndrome de Lynch se incrementan notablemente en los casos inestables (ver Tablas IV.24 y 25 del apartado de Resultados). En los tumores IMS los antecedentes familiares de neoplasias asociadas al síndrome de Lynch son casi seis veces más frecuentes que en los casos EMS (84,6% vs

17,3%). Las neoplasias no asociadas al síndrome de Lynch son el doble de frecuentes en las familias con tumores IMS que en aquellas EMS (53,8% vs 27,6%).

### **2.3. Características moleculares.**

#### 2.3.1. Inestabilidad de microsatélites (IMS).

La IMS es una característica que muestran algunos CCR, y es consecuencia de la alteración del sistema de reparación del ADN (MMR). Prácticamente todos los CCR que aparecen en el síndrome de Lynch muestran IMS. Sin embargo, alrededor de un 15-20% de los CCR esporádicos también la presentan (Aaltonen et al. 1993; Ionov et al. 1993). Esta circunstancia crea ciertos problemas a la hora de seleccionar familias candidatas al estudio de los genes relacionados con el sistema MMR, y por tanto, posibles casos de síndrome de Lynch.

Las alteraciones en el sistema MMR pueden ser heredadas, como sucede en el síndrome de Lynch, o bien, en los casos esporádicos, tiene lugar de manera adquirida, mediante un silenciamiento a nivel epigenético por hipermetilación de los genes del sistema MMR. Sin embargo, ambos grupos de tumores tienen similares características anatómo-clínicas a pesar de sus distintas etiologías (Haydon et al. 2002).

En nuestro trabajo la IMS se ha llevado a cabo mediante el análisis del microsatélite BAT26, situado el locus 2p16. La utilización única de Bat26 se ha demostrado eficaz en trabajos previos (Hoang et al. 1997; Aaltonen et al. 1998; Zhou et al. 1998).

Tan sólo el 31% (13/42) de nuestros tumores mostró el fenotipo de IMS, a pesar de que la edad precoz al diagnóstico del CCR es una característica que acompaña a los casos de cáncer con componente hereditario y, por tanto, sería esperable una proporción más elevada con IMS.

Cuando se comparan nuestros datos con aquellos trabajos que presentan un criterio de selección por edad similar, nuestra proporción de tumores con IMS se halla dentro del intervalo referido en la literatura, donde la proporción de IMS oscila entre 19,7% y el 41% (Liang et al. 2003; Pucciarelli et al. 2003; Losi et al. 2005; Yiu et al. 2005). En la serie publicada por Losi et al (2005), la tasa de tumores que presentaron IMS alcanza el 19,7%. No



obstante, en este trabajo sólo se consideran positivos aquellos tumores con inestabilidad alta (2 o más microsátélites del panel de Bethesda). El porcentaje obtenido por nosotros del 31% es equivalente al de la serie de Southey et al. (2005), aunque hay que tener en cuenta que en esta última la proporción se alcanza mediante la suma de tumores que presentaban IMS baja y alta (15% y 17%, respectivamente). En dicho trabajo, no obstante, en lugar del panel de Bethesda de cinco microsátélites, utilizan un panel de 10, considerando estables aquellos que no presentaban alteración o la presentaban tan sólo en un microsátélite; baja IMS, con alteración de 2 a 5; y alta IMS, con alteración de 6 a 10 de los mismos. El trabajo de Yiu et al. (2005), por su parte, presenta una IMS alta de un 21% para pacientes con CCR a edad igual o menor de 45 años. Otra serie, la de Mead et al. (2007), en la que utilizan el panel de Bethesda, la proporción de IMS total es del 41%, con un 31% de los tumores presentando IMS alta.

Las cifras referentes a la IMS son diferentes en otros trabajos con edad de corte distinta o donde la edad no es el criterio de selección principal. La frecuencia de IMS es inversamente proporcional a la edad al diagnóstico: el porcentaje de IMS aumenta conforme la edad de diagnóstico del CCR disminuye. De esta forma, tenemos el trabajo de Gryfe et al (2000), donde se reduce hasta el 17%, con un punto de corte de 50 años, mientras que en lo publicado por Durno et al. (2005), la IMS aumenta en al mismo tiempo que disminuye la edad al diagnóstico hasta los 24 años, alcanzando el 73%.

Cuando se compararon los CCR en el adulto joven con los CCR a edad avanzada, las diferencias en los porcentajes de IMS son más manifiestas. En el trabajo de Pucciarelli et al (2003), la IMS alcanza el 32,4% en el grupo de adultos jóvenes menores o iguales de 40 años, y pasa al 6,9% en el grupo de CCR en mayores de 40 años. La proporción se reduce en la misma medida en lo publicado por Liang et al. (2003), que de un 29,4% en los jóvenes menores o iguales a 40 años, y pasa a un 6,3% en los CCR a edad igual o mayor de 60 años. Sin embargo, parece haber una distribución bimodal relacionada con la edad en la proporción de CCR que presentan IMS, con picos en los jóvenes, pero también en los más ancianos, estos últimos posiblemente debido a alteraciones epigénéticas adquiridas en los genes MMR (Samowitz et al. 1995; Chao et al. 2000; Yiu et al. 2005). En el trabajo de Samowitz et al. (1995) el grupo de pacientes con CCR entre 71 y 79 años presentó un 22,2% de IMS. En otra serie, la de Yiu et al. (2005), se confirman los dos picos de mayor frecuencia de IMS, con un 21% para los menores de 45 años, y un 33% para aquellos cuyo CCR se presentó a una edad superior a 87 años.

Por último, también debemos señalar que nuestros datos coinciden con la proporción encontrada en la Tesis Doctoral de la Dra. Laura Valle, de la Unidad de Cáncer Familiar, del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), de Madrid, en la que aproximadamente el 30% de las familias estudiadas presentó IMS en el tumor, aunque en este caso se analizaron sólo sujetos con carga familiar sugerente del síndrome de Lynch, independientemente de la edad a la que presentaron el CCR.

En resumen, el porcentaje de IMS en nuestra serie de pacientes jóvenes es equivalente al descrito previamente en la literatura para serie con edades de corte similares. Además, dicha proporción se asemeja al detectado en series de pacientes con carga familiar positiva para CCR y, sin embargo, diferente al identificado en aquellas de CCR esporádicos en pacientes con edades superiores a los 50 años. Estos hallazgos probablemente son reflejo del importante componente genético del CCR en adultos jóvenes.

### 2.3.2. Análisis de los genes *MLH1* y *MSH2*.

Se obtuvo sangre periférica de los *probandi* cuyos tumores mostraron IMS en 11 de los 13 casos. En los dos restantes, debido al fallecimiento de aquellos, se recogió ADN del familiar más joven afecto de neoplasia relacionada con el síndrome de Lynch. Se llevó a cabo el estudio completo de los genes de reparación del sistema MMR, *MLH1* y *MSH2*, que explican más del 90% de las familias con síndrome de Lynch con mutaciones germinales en los genes de dicho sistema (Lynch and de la Chapelle 2003; Chung and Rustgi 2003). El porcentaje de alteraciones en la línea germinal de *MLH1* y *MSH2* dentro del grupo de tumores que presentaron IMS fue del 61,5%, como puede verse en la Figura IV.4. Por tanto, en nuestro trabajo la IMS se consideraría con un valor predictivo positivo del 61,5%.

La tasa de detección de mutaciones en los genes MMR en nuestro grupo se sitúa en el límite superior de lo publicado previamente. En la mayoría de los trabajos consultados esta tasa varía desde el 23% hasta 62,5% de los casos con IMS (Chan et al. 1999; Pucciarelli et al. 2003; Durno et al. 2005; Niessen et al. 2006). La variabilidad en los porcentajes se correlaciona principalmente con la edad de corte de las series. Así, en aquellas con una edad más precoz, como sucede en la de Durno et al. (2005), la proporción de mutaciones encontradas en tumores con IMS es más alta (62,5%).

Si a la edad de diagnóstico y a la IMS se le suman otros criterios de selección, como pueden ser las características clínicas propias de los tumores con componente hereditario, la proporción de mutaciones encontradas puede aumentar, como sucede en el trabajo de Losi et al. (2005), en que llega hasta el 77,7%. En nuestro caso, si seleccionamos los tumores con IMS que además presentaron antecedentes familiares de neoplasias asociadas al síndrome de Lynch, encontramos que la proporción de mutaciones halladas dentro de este grupo asciende hasta el 71,5% (5/7).

Respecto a la alteración de uno u otro gen, el 37,5% de las alteraciones identificadas se localizaron en *MLH1*, mientras que el 62,5% lo fueron en *MSH2*. En la serie publicada por Pucciarelli et al. (2003), la proporción de mutaciones halladas es del 50% para cada uno de los genes, *MLH1* y *MSH2*, mientras que en la de Chan et al. (1999), la proporción es mayor para *MSH2* (87,5%). La proporción en nuestra muestra ha de ser interpretada con cautela debido a lo limitado de las cifras.

En otros grupos de población distintos al del grupo del adulto joven, las proporciones difieren, siendo mayor para *MLH1*, frente a la que tiene lugar en el joven, que es prácticamente la contraria. En el análisis llevado a cabo por la Dra Laura Valle, en la que analizó familias con agregación familiar de CCR o con sospecha de síndrome de Lynch, el porcentaje de pacientes con tumores con IMS que presentaron alteración a nivel de los genes de reparación resultó ser del 50%. La proporción de mutaciones identificadas fue del 60% para el *MLH1* y del 40% para el *MSH2*. En otro estudio, realizados en la población española, Caldés et al. (2002) realizaron la prueba genética de detección de mutaciones puntuales en 56 familias con al menos criterios de Bethesda, hallando un total de 17 mutaciones en los genes de reparación (30,36%), siendo la distribución de 69% en *MLH1* mientras que el 31% lo hacían en *MSH2*.

La mayor parte de las alteraciones en los genes encontradas en nuestra serie resultaron ser mutaciones puntuales, mientras que sólo en un caso se halló una gran deleción mediante técnica de MLPA, concretamente en el gen *MSH2*. Se ha señalado en la literatura la necesidad de llevar a cabo la búsqueda de grandes reordenamientos genómicos de los genes de reparación a la hora del diagnóstico del síndrome de Lynch (Di Fiore et al. 2004). Estas alteraciones pueden alcanzar hasta el 13% del total de alteraciones germinales en estos genes (Charbonnier et al. 2002; Gille et al. 2002; Taylor et al. 2003; Wang et al. 2003). En nuestro

estudio 1/5 (20%) de todas las alteraciones detectadas en *MSH2* era debida a una gran delección genómica. En las series de la literatura en que se lleva a cabo la identificación a nivel de los genes MMR, los porcentajes varían, comprendiendo del 16,7% al 45% de los casos con mutaciones identificadas (Pucciarelli et al. 2003; Durno et al. 2005; Niessen et al. 2006). En todas ellas las muestras también son reducidas, al igual que sucede con la que presentamos. Sin embargo, se puede señalar la necesidad de buscar este tipo de alteración en todos los casos en que, estudiando los genes del sistema MMR en adultos jóvenes, no se hallen mutaciones puntuales.

El estudio del gen *MSH6* no se llevó a cabo ya que, como se ha indicado en el apartado 1.3.3.1. de Resultados, fueron tres los casos en los que no se expresaba la proteína Msh6, y en todos ellos tampoco había expresión de Msh2. En estos tres casos se detectó una mutación germinal en *MSH2*. Estudios previos han subrayado que la alteración de *MSH6* es poco frecuente, y que se asocia con un fenotipo atenuado, con una edad de aparición del cáncer más avanzada (Miyaki et al. 1997). Algunas series que identifican las mutaciones en MMR en pacientes con CCR a edad precoz no estudian dicho gen, como ocurre en la de Pucciarelli et al. (2003), al considerar la baja incidencia de las mismas. Otras, no obstante, sí que lo hacen, siendo los resultados variados. Mientras que en la de Durno et al. (2005) no encuentran ninguna alteración, en la de Niessen et al (2006), hallan 4 mutaciones de 20 casos estudiados. Dichas diferencias son debidas a los distintos criterios de edad de aparición del CCR que utilizan. Mientras que en la primera es de 24 años o menos, la segunda es de 50 años, confirmando que las alteraciones en dicho gen se presentan con más frecuencia a edad más avanzada. Otro aspecto que merece tenerse en cuenta a la hora de abordar el estudio de *MSH6* es la circunstancia de que sus mutaciones pueden no asociarse a IMS, y por tanto, en estos casos la Inmunohistoquímica (IHQ) para Msh6 es una herramienta adecuada para la identificación de posibles mutaciones en el gen (Berends et al. 2002; Kolodner et al. 1999). Por estos motivos, pensamos que en la población de CCR de adulto joven la identificación de mutaciones en *MSH6* ha de realizarse en aquellos casos no sólo que presenten IMS, sino también ausencia de expresión de Msh6.

### 2.3.3 Análisis inmunohistoquímico.

#### a) Proteínas del sistema de reparación.

La IHQ de las proteínas del sistema MMR es un método que facilita la búsqueda de mutaciones en los genes de dicho sistema, ya que la ausencia de una de las proteínas apunta directamente al análisis del gen correspondiente. En este sentido, y según varios estudios recientes, la IHQ es al menos igual de válida que el análisis de la IMS a la hora de identificar las mutaciones en los genes del sistema MMR (Pinol et al. 2005; Southey et al. 2005; Stomorken et al. 2005; Engel et al. 2006; Niessen et al. 2006). No obstante, muchos autores señalan que la IHQ tampoco es suficiente como método de selección único, al no alcanzar el 100% de sensibilidad (Christensen et al. 2002; Lindor et al. 2002; Scartozzi et al. 2002; Wahlberg et al. 2002; Hendriks et al. 2003).

En nuestra serie hemos encontrado cierta dificultad a la hora de llevar a cabo el estudio de las proteínas del sistema de reparación, en especial a causa de la ausencia de material tumoral para realizar la IHQ en alguno de los pacientes. Por tanto, no podemos estimar el valor que puede tener en nuestra muestra de pacientes con CCR jóvenes. Sólo señalar que todos los tumores que presentaron falta de expresión en alguna de las proteínas fueron IMS (ver Tabla IV.27 de Resultados), y que, de los ocho tumores IMS con que se pudo contar con material, siete presentaron ausencia de expresión para alguna de las tres proteínas. Los tres casos con ausencia de expresión de Msh6, asociada a la falta de Msh2, correspondieron posteriormente a tres casos con mutaciones en *MSH2*. Es decir, hubo una buena correlación entre los resultados de la IHQ y la IMS.

En lo publicado referente al CCR en el adulto joven, la IHQ de las proteínas de reparación posee una sensibilidad de hasta un 100% a la hora de identificar posibles alteraciones de los genes del sistema MMR (Southey et al. 2005; Niessen et al. 2006). El estudio llevado a cabo por Southey et al. (2005), determina el valor predictivo positivo (VPP) para la identificación de las mutaciones de un 69%, 50% y 75%, para la inmunohistoquímica de proteínas de reparación, IMS (alta y baja), y los criterios de Ámsterdam, respectivamente, mientras que la sensibilidad para cada una de dichas estrategias del 100%, 94% y 50%. En otra serie, publicada por el grupo de Niessen et al (2006), los porcentajes varían, siendo la sensibilidad del 88%, 82% y 76%, mientras que el VPP, sin embargo, se redujo al 38%, 23% y 19%. En

este último trabajo la edad de corte fue de 50 años, mientras que en la del primero fue de 45 años.

En la mayoría de los estudios en los que se analizan las estrategias de aproximación al estudio de las mutaciones también se concluye que el uso de los criterios clínicos de Ámsterdam como único marcador para ser portador de mutación no es suficiente. Así, en el trabajo de Niessen et al (2006), casi un 25% de los portadores no presentaron ninguna historia familiar de neoplasia, mientras que llega hasta el 50% en el trabajo de Southey et al (2005), los portadores que no cumplieron criterios de Amsterdam. En nuestro trabajo, tres de las mutaciones halladas pertenecían a casos con agregación familiar (37,5%), sin cumplir los criterios de Amsterdam, mientras que en las cinco restantes sí lo hacían.

El criterio de edad precoz de aparición del CCR ya es de por sí una razón, tal vez la más importante, para plantearse el estudio de las mutaciones relacionadas con el sistema de reparación. Sin embargo, no ha de ser la única. Es necesario unir a ella tanto la IMS como la IHQ de las proteínas del sistema de reparación. No hay que olvidar tampoco los antecedentes familiares de neoplasias relacionadas. En este último supuesto, incluso, en aquellos casos en los que ambos métodos, IMS e IHQ, no determinen por sus resultados la necesidad del estudio genético, tal vez habría que realizar un estudio más profundo, ampliando el número de microsatélites, o analizando otros tumores de la familia. La valoración conjunta de esta información, tanto clínica como molecular, es la mejor estrategia para la identificación de posibles síndromes de Lynch en el CCR del adulto joven.

#### b) Otros marcadores.

Además del análisis de IHQ de las proteínas del sistema de reparación, mencionado en el apartado previo, se llevó a cabo el análisis de otras proteínas implicadas en otras funciones celulares esenciales. El objetivo de esta parte del estudio fue obtener perfiles de expresión que caracterizaran a los diferentes tumores. Se utilizó una serie de marcadores moleculares relacionados con el ciclo celular, apoptosis, proliferación y adhesión celulares, como son Cdk2, Ciclina A, Ciclina D1, Ciclina D3, Ciclina E, p16, p21, p27, RB fosforilado, Skp2, Chk2, E-cadherina,  $\beta$ -catenina, Ki-67, p53, Bcl-2, Citoqueratina 20, RAD50 y SMAD4. Estos marcadores posteriormente se correlacionaron con el riesgo de recidiva y/o mortalidad, y se intentó

identificar aspectos diferenciales desde el punto de vista general, y entre los tumores con IMS y EMS, en particular.

El tamaño muestral inicial era reducido, y se vió disminuido más aún al no poder disponer para su realización de material tumoral suficiente de todos los *probandi*. De esta manera en la mayoría de los casos se aprecian tan sólo ciertas tendencias a la significación estadística, si bien, en algunos análisis sí se alcanza. De cualquier forma, a continuación discutimos los datos más relevantes encontrados.

Uno de los extremos que también es interesante destacar es que son pocas las publicaciones en las que se valoran los marcadores tumorales que hemos analizado en la presente serie. En este sentido, por tanto, la mayor parte de los resultados obtenidos se discuten respecto a lo publicado para el CCR en general, y en menor medida en relación al grupo de edad de nuestro interés.

En primer lugar, analizamos los marcadores relacionados con el ciclo celular, como Cdk2, Cyclina A, Cyclina D1, Cyclina D3, Cyclina E, p16, p21, p27, RB fosforilado, Skp2, Chk2. Llama la atención la igualdad de expresión para la mayoría de proteínas, exceptuando la de la Cyclina E, que se halla predominantemente ausente (70% de los tumores estudiados). La Cyclina E controla la transición de la fase G1 a la S, formando complejo con Cdk2. Su elevación da como consecuencia un aumento de la velocidad de la transición G1-S. Estos niveles elevados se han encontrado en multitud de tumores, entre ellos el CCR (Keyomarsi et al. 1994; Yasui et al. 1996; Furihata et al. 1998; Yasui et al. 1999; Muller-Tidow et al. 2001). Estos valores de sobre-expresión no se detectan en el conjunto de la muestra, aunque cuando se distribuye entre IMS y EMS, sí que aparece en los primeros, como se verá más adelante. En la presente serie, el 82% (9/11) de los pacientes que fallecieron a lo largo del seguimiento, y el 100% de aquellos que recidivaron, sus tumores presentaron ausencia de expresión de Cyclina E. Este posible valor pronóstico de la Cyclina E coincide con lo publicado por Yasui et al (1996), quien refiere que su ausencia viene asociada a un desarrollo más acelerado y a la progresión más temprana del CCR en general. Esto, sin embargo, no se ha visto en otros trabajos (Sutter et al. 2002; Bondi et al. 2005).

Otro resultado que también llama la atención es la ausencia de diferencias en los valores encontrados para la proteína del RB-P, ya que los CCR suelen mostrar una expresión

incrementada de RB y de RB-P (Gope and Gope 1992; Wagner and Roemer 2005). Este incremento en la expresión es progresivo durante el proceso de carcinogénesis colorrectal (Yamamoto et al. 1999).

Con respecto a las posibles asociaciones con las características anatómico-clínicas y familiares de los casos, aquellos CCR que mostraron ausencia de expresión de p16, que es, entre otras funciones, inhibidor de RB (Goodrich et al. 1991; Lukas et al. 1995), presentaron una localización predominante en colon derecho (57%), siendo la mayoría EMS (10/11), y coincidiendo este dato con lo publicado por el grupo de Schneider-Stock et al. (2003), para el CCR esporádico.

La proteína p21 es activada por p53, inhibe a Cdk2, e induce la parada del ciclo celular en la fase G1, para que se produzca la reparación del ADN o la apoptosis. En nuestro trabajo hemos encontrado que el 77% de los casos con ausencia de expresión de p21 (10/13) resultaron ser esporádicos. De nuevo esta característica es comparable a los resultados publicados por Edmonston et al (2000), puesto que ellos relacionan la positividad de p21 con aquellos tumores que presentan IMS, siendo gran parte de ellos casos asociados al síndrome de Lynch. También el grupo de Sinicrope et al. (1998), determina que su pérdida de expresión acompaña la progresión de los CCR esporádicos, no sucediendo así en los casos relacionados con el síndrome de Lynch.

Del resto de marcadores, entre los que se hallan los de adhesión celular, proliferación, apoptosis y otros (E-cadherina,  $\beta$ -catenina, Ki-67, p53, Bcl-2, Citoqueratina 20, RAD50 y SMAD4), el resultado que llama la atención es el relacionado con la vía Wnt, siendo importante la proporción de tumores que tienen expresión de  $\beta$ -catenina en la membrana, y también ausencia de  $\beta$ -catenina en el núcleo. Dicha proteína se localiza en la membrana citoplasmática, formando parte de un complejo con APC, axina y GSK-3 $\beta$ . Cuando ese complejo no se forma correctamente, se activa la vía de Wnt y aumenta la cantidad de  $\beta$ -catenina en el citoplasma, por lo que es transportada y acumulada en el núcleo (Morin et al. 1997). Se considera que la expresión nuclear de  $\beta$ -catenina es un buen marcador de que la vía Wnt está activada (Iwamoto et al. 2000; Hinoi et al. 2001; Hao et al. 2002), y dicha activación ocurre frecuentemente en tumores colorrectales EMS, así como, aunque algo menos, en tumores IMS, incluyendo el síndrome de Lynch, independientemente de la edad de aparición del CCR (Shimizu et al. 2002). En tal sentido, la alta proporción de tumores con expresión a



nivel de membrana y ausencia de  $\beta$ -catenina en el núcleo en nuestra serie podría indicar que una parte sustancial de estas neoplasias no seguirían la vía Wnt de carcinogénesis del CCR. Posteriormente se analizarán los resultados al correlacionar la expresión de  $\beta$ -catenina con la mortalidad y la recidiva, al asociarse su falta de expresión en membrana con la pérdida por parte de la célula de funciones de adhesión, y por tanto, con una mayor facilidad para metastatizar.

Asociada también a la vía Wnt, la E-cadherina se encuentra presente en un gran número de tumores en nuestra serie. Se trata de una glicoproteína de membrana crítica para el control de la adhesión celular y la polaridad de los epitelios. Unida al citoesqueleto se activa a través de interacciones con las cateninas (Takeichi 1995; Gumbiner 1996). La interrupción del complejo cadherina-catenina se ha observado en CCR, y se ha correlacionado con la desdiferenciación tumoral, el crecimiento infiltrante, la metástasis a ganglios linfáticos, y un peor pronóstico (Behrens 1999; Nollet et al. 1999; Van Aken et al. 2001).

Estos dos aspectos, tanto el de la E-cadherina como el de la  $\beta$ -catenina, hacen pensar en un grupo de CCR en este rango de edades que podrían seguir una vía alternativa a la vía Wnt. En cuanto al ciclo celular, los marcadores presentarían una ausencia o presencia de los mismos de manera equivalente, a excepción de la Ciclina E, que se hallaría ausente en una alta proporción de tumores. Todas ellas serían características diferenciales desde el punto de vista molecular de los CCR de aparición precoz en relación al resto de CCR.

#### **2.4. Factores pronóstico. Análisis de supervivencia.**

El pronóstico del CCR que tiene lugar en el adulto joven es controvertido. Frente a algunas publicaciones que no hallan diferencias entre las supervivencias de los CCR a edad precoz y los que aparecen a edad avanzada (Chung et al. 1998), otras confieren al tumor a esta edad un peor pronóstico (Isbister et al. 1992; Molnar et al. 1994; Chiang et al. 2003). Entre otros factores, se atribuye al estadio más avanzado con que se presentan al diagnóstico, sugiriendo un posible retraso del mismo (Adloff et al. 1986). El hecho de que estas neoplasias a edad precoz presenten con más frecuencia características como la existencia de células en anillo de sello o CCR mucinosos, o una mayor tasa de CCR de bajo grado de diferenciación posiblemente contribuyan al peor pronóstico global. También se han encontrado a su vez

características moleculares que determinan un comportamiento más agresivo (Yantiss et al. 2008). La necesidad de hallar algún factor predictivo a la hora de diferenciar aquellos CCR del adulto joven que vayan a presentar una mala evolución frente a lo contrario se hace, por tanto, casi obligada.

En nuestra serie se confirman como factores de mal pronóstico asociados a mortalidad tanto los estadios tumorales avanzados como la existencia de metástasis en el momento del diagnóstico. Esto coincide con lo ya establecido para el CCR en general. En el mismo sentido aparecen la existencia de metástasis y la presencia de recidiva en el seguimiento como de mal pronóstico cuando se realiza el análisis de supervivencia. La localización del CCR a nivel del colon izquierdo se presenta también como un factor de mal pronóstico, tanto desde el punto de vista de la mortalidad como de la recidiva.

Lo reducido de la muestra no permite alcanzar significación estadística en el resto de características, tanto anatómico-clínicas como familiares o moleculares. Sin embargo, mención especial merece la  $\beta$ -catenina. La ausencia de expresión de la misma a nivel de la membrana y la presencia de la misma en el núcleo presentaron una mortalidad del 75% y 60% respectivamente. Lo mismo sucede al valorar el riesgo de recidiva. En ningún caso se alcanzó la significación estadística, lo que sí sucedió en el análisis de la supervivencia, donde la expresión en la membrana determinaría una mayor supervivencia, como se detalla en la Figura IV.5. del Apartado de Resultados. Por tanto, habría que pensar que la activación de la vía Wnt en este tipo de tumores determinaría un peor pronóstico.

En el trabajo de Liang et al (2006), se analizan los factores pronóstico en un grupo de pacientes con CCR a una edad igual o inferior de 40 años. En él se señala que la edad, la resección oncológica, la transfusión, el tipo celular, tamaño e invasión tumoral, presencia de invasión linfática o metástasis a distancia, así como la estadificación, son predictores de supervivencia en estos pacientes. Sin embargo, al llevar a cabo el análisis multivariante, sólo la transfusión y la invasión ganglionar permanecen como valores pronóstico.

Una de las características que más se analiza como factor pronóstico es la IMS, llegándose a considerar como una entidad diferente dentro del grupo de CCR de inicio precoz a aquellos CCR que la presentan (Gryfe et al. 2000). Se ha sugerido, además, en diversos estudios que la IMS determinaría una mayor supervivencia para los pacientes con CCR en general,

independiente de la edad de presentación (Lothe et al. 1993; Thibodeau et al. 1993; Bubb et al. 1996; Lukish et al. 1998; Halling et al. 1999). En la serie publicada por el grupo de Gryfe et al. (2000), que analizan los CCR que se presentaban a una edad igual o menor de 50 años. Se concluye que la IMS alta se asoció con una supervivencia prolongada, independientemente de los factores pronóstico clásicos, entre los que se encontraba el estadio de la enfermedad. En nuestro caso, a pesar de no alcanzar en ningún caso significación estadística, sí que para todos los valores de supervivencia, mortalidad, y recidiva, se presentan mejores resultados en el grupo de IMS, como se volverá a tratar en el Apartado 3 de la Discusión.

Desde nuestro punto de vista, pensamos que el criterio de edad precoz no ha de resultar de por sí un condicionante de mal pronóstico, sino que, dentro de este grupo de edad debe de existir un subgrupo que determina una evolución más o menos desfavorable, definido por medio de uno o más marcadores que lo diferencie, dejando aparte los relacionados con la estadificación de la neoplasia, entre otros. Uno de estos factores asociados a un mejor pronóstico podría ser, como se ha señalado, el de la IMS. Nuestros resultados así lo sugieren, de la misma forma que parecen ser variables de peor pronóstico aquellas neoplasias situadas a nivel del colon izquierdo, o con  $\beta$ -catenina no expresada en membrana o expresada a nivel nuclear, signo de que la vía de Wnt está activada. Ambos aspectos, además, más frecuentes en tumores EMS, que en nuestra serie parecen mostrar un peor pronóstico.

### 3. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS CÁNCERES COLORRECTALES SEGÚN LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (IMS).

La IMS es una característica que aparece en los tumores que se desarrollan dentro del síndrome de Lynch por alteraciones en el sistema de reparación de los errores de emparejamiento del ADN. Pero también hay un 15% de los cánceres colorrectales esporádicos que muestran esta característica, debido sobre todo al silenciamiento epigenético del gen *MLH1* por hipermetilación de su promotor a nivel somático (Kinzler and Vogelstein 1996).

Actualmente se conoce que, en lo referente al CCR en general, los tumores IMS y EMS expresan características clínico-patológicas diferenciales (Kim et al. 1994; Gryfe et al. 2000). Estos rasgos distintivos sugieren que la tumorigénesis de cada uno de los grupos podría estar basada en distintos genes y/o rutas (Giacomini et al. 2005).

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido el de valorar la existencia de rasgos diferenciadores entre los CCR en el adulto joven que presentan IMS y EMS. A pesar de que comparamos 29 tumores EMS y 13 IMS, y por tanto, la muestra es reducida, hemos encontrados características diferenciales, y otras que, a pesar de no alcanzar la significación, manifiestan una tendencia hacia la misma.

### **3.1. Características anatomo-clínicas.**

En primer lugar llama la atención la diferencia en la edad media al diagnóstico que presentaron ambos grupos. La edad media en el grupo de IMS fue de 36,7 años, mientras que en los EMS fue de 40 años. El componente hereditario de una gran parte de los primeros probablemente determina esta diferencia. Uno de los pocos trabajos que analizan las discrepancias en un grupo de edad equivalente, aunque el punto de corte sea de 50 años, también coincide con la precocidad del CCR en aquellos tumores con IMS, con una edad media al diagnóstico de 41,3 años frente a los 43,5 de los EMS (Gryfe et al. 2000). En el mismo sentido lo refiere el grupo de Losi et al. (2005), cuya edad de corte fue de 45 años, presentando una edad media de 38,2 y 40,1 años respectivamente.

La localización del CCR a nivel del colon también es un rasgo diferenciador entre los grupos de IMS y EMS. Nuestros resultados no presentan significación estadística, aunque sí una clara distribución predominante del colon derecho en el grupo IMS, con un 70% (9/14), mientras que para los EMS fue del 38% (11/29). En el caso de unificar las localizaciones, entre colon derecho e izquierdo, los valores se hacen aún más manifiestos. En el trabajo de Gryfe et al (2000), la proporción de tumores IMS situados a nivel del colon derecho resultó del 71%, equivalente a nuestro trabajo, mientras que para los EMS sólo alcanzó el 26%. En la serie de Losi et al. (2005), el porcentaje para los EMS se reduce hasta el 24,5% para la localización derecha, mientras que en los IMS alcanza el 64,3%. Las series que analizan el CCR en población general, sin atender a criterios de edad, confirman esta correlación, con el predominio del colon derecho para los tumores que presentan IMS (Ionov et al. 1993; Lynch et al. 1993; Thibodeau et al. 1993; Kim et al. 1994; Jass 2004).

Otra de las características de las neoplasias con IMS es la mayor frecuencia de tumores pobremente diferenciados (Kim et al. 1994; Jass 2004; Luo et al. 2005); aspecto que también

sucede en la población joven, con frecuencias que se sitúan entre el 21% y el 42% (Gryfe et al. 2000; Losi et al. 2005). Nuestros resultados muestran un 23,1% para el grupo de IMS frente al 13,8% de los tumores EMS. Otro aspecto que hay que señalar es cierta tendencia de los tumores con alto grado diferenciación a presentarse en el grupo con EMS (7% vs 0%). Esto coincide con los resultados del grupo de Losi et al (2005), cuya proporción de tumores EMS con alto grado de diferenciación alcanza el 19%.

Dentro del análisis anatómico-patológico también destaca la presencia de tumores mucoscretorios y con células en “anillo de sello”, ambas características frecuentemente asociadas a los CCR del adulto joven (Guillem et al. 1999; Chiang et al. 2003; Liang et al. 2003; O’Connell et al. 2004; Lin et al. 2005). Al separar entre IMS y EMS, los pocos trabajos que hacen esta diferenciación no hallan variaciones entre ambos grupos (Gryfe et al. 2000; Losi et al. 2005). En nuestro trabajo, sin embargo, la proporción de tumores mucoscretorios es alta en el grupo IMS (38,5%), así como la de aquellos con presencia de células en “anillo de sello” (30,8%), aspecto este último que alcanza la significación estadística, frente a los EMS. Llama la atención, además, que en nuestra serie todos los tumores con células en “anillo de sello” se presenten en el grupo IMS, y que de los cuatro casos, en tres de ellos se encontraron mutaciones germinales en los genes de reparación. Cabe plantear, en consecuencia, que al encontrarnos con un paciente con diagnóstico de CCR a una edad menor o igual de 45 años, cuyo tumor presente la característica de células en “anillo de sello”, acudir directamente al análisis de las mutaciones en los genes del sistema MMR, obviando la IMS.

La comparación llevada a cabo atendiendo al estadio de la enfermedad al diagnóstico no reveló diferencias significativas, aunque sí destaca cierto predominio del estadio III para los tumores IMS, y el del IV en los EMS (Tabla IV.20. de los Resultados). Estos datos apuntan a la posibilidad de que en los casos IMS, la prevención esté siendo, en cierta medida, efectiva.

La misma distribución de estadios III y IV aparece en el trabajo de Losi et al. (2005), con el mismo rango de edades que el nuestro, no ocurriendo así en la serie presentada por Gryfe et al. (2000), donde sí se aprecia una proporción mayor de casos en los estadios avanzados a favor de los tumores EMS, acompañada de significación estadística. Es posible, por tanto, que esto pueda ser debido bien a una adecuada estrategia de prevención, especialmente en los casos con antecedentes en la familia, o por otro lado, al valor de pronóstico favorable que se le

atribuye a la IMS (Messerini et al. 1997; Gryfe et al. 2000; Samowitz et al. 2001b; Buckowitz et al. 2005; Popat et al. 2005).

Los resultados alcanzados para la supervivencia total, supervivencia libre de enfermedad, aparición de recidiva tumoral y mortalidad son más favorables en el grupo de los tumores IMS. Aún sin alcanzar la significación estadística, estos resultados en su conjunto apuntan a una evolución más favorable de los tumores con IMS comparados con los EMS (Messerini et al. 1997; Gryfe et al. 2000; Samowitz et al. 2001b; Buckowitz et al. 2005; Popat et al. 2005). No obstante, lo publicado en la literatura es variable, ya que, aunque muchos trabajos apoyan el hecho de que los casos IMS presentan mejor supervivencia, la estimación del valor pronóstico de la IMS varía de unos a otros. Por esta razón, recientemente, Popat et al. (2005), realizaron una revisión sistemática de los trabajos publicados para conseguir una estimación más precisa y concluyeron que los cánceres colorrectales con IMS tenían un pronóstico significativamente mejor. En la serie presentada por Gryfe et al. (2000), en el CCR a edad menor o igual de 50 años se confirma que la IMS posee un valor predictivo de buen pronóstico independiente de cualquier otro, incluido el estadio tumoral.

Por otra parte, en nuestro estudio, 15 pacientes presentaron algún tipo de pólipo en el colon (33,33%), bien sincrónicos con el CCR, bien de aparición previa al diagnóstico del CCR, o en el seguimiento posterior. Como se ha señalado en el Apartado 2.1.5. de esta Discusión, no son muchas las series en la literatura en las que se analiza la aparición de pólipos en estos pacientes, y las que lo llevan a cabo, sólo refieren aquellos que se presentan sincrónicos al CCR (Liang et al. 2003). A la hora de analizar su aparición en la evolución y compararla con las características de IMS o EMS del CCR del probando, encontramos que la frecuencia en ambos grupos es importante, con un 30,8% y un 34,5%, respectivamente. La correlación con los diferentes tipos de pólipos no es valorable, al ser el número de estos reducido. Lo que sí se puede señalar, insistiendo en lo dicho en el mismo apartado previo, es que esos pacientes parecen presentar una tendencia a la formación de pólipos, característica que muy probablemente ha de tener relación con la aparición del CCR a tan temprana edad. Los IMS la presentarían por tener el sistema MMR alterado, pero también los EMS, a través de algún otro mecanismo de carcinogénesis que condiciona la predisposición a desarrollar pólipos.

### 3.2. Características familiares.

A la hora de comparar aquellos casos que pertenecían a familias que cumplían criterios clínicos de Amsterdam II, hay un predominio de los IMS, con el 53,8%, frente al 3,5% de los que presentaron EMS. De la misma forma sucedió para aquellos casos que, sin cumplir los criterios, sí que presentaban una agregación familiar de neoplasias relacionadas con el síndrome de Lynch, existiendo un 30,8% de los casos con IMS, mientras que sólo lo hicieron un 13,8% de los EMS. Al contrario ocurrió para los casos esporádicos. Mientras que un 15,4% de los IMS lo fueron, el 82,7% de los EMS se asociaron con el carácter esporádico del CCR.

Estos resultados coinciden con lo que ya conocemos, y es que una proporción importante de tumores que surgen en el entorno del síndrome de Lynch presentan IMS, como ya hemos mencionado, a causa de la alteración en el sistema de reparación de errores en el ADN (Parsons et al. 1993; Aaltonen et al. 1994; Perucho 1996). Sin embargo, existen familias en las que se presentan tumores relacionados con el síndrome de Lynch en otro miembro de la familia, aparte del CCR del probando, y que, sin embargo, muestran EMS, como ocurre en 5 de nuestros casos (17,3%). Es posible que alguno de dichos casos, en especial aquel con criterios estrictos de Amsterdam, pudiera relacionarse con el nuevo síndrome de CCR hereditario, caracterizado por EMS, inmunohistoquímica normal para las proteínas del sistema de reparación, pero que cumplen criterios de Amsterdam para el síndrome de Lynch (Valle et al. 2007; Boland 2007). No existen series de CCR en el adulto joven que valore los diferentes tipos de neoplasias en las familias de los probandos en relación a que presentn estos IMS o EMS.

Otra característica es la alta proporción de familias con neoplasias no relacionadas con el síndrome de Lynch, mayor en el grupo de IMS (53,8%), pero también considerable en el grupo de EMS (27,6%). Respecto al grupo de IMS, no se puede valorar si este grupo de neoplasias son determinadas por la alteración del sistema de reparación del ADN, al no haberse realizado el análisis de la IMS en las mismas. Tal vez la gran diversidad presentada y la repetición tan sólo del tumor de laringe (3 casos) y la leucemia en dos, hacen pensar en que sean agregaciones debidas al azar. Pero también habría que considerar la alternativa, ya que la proporción de las neoplasias se puede considerar lo suficientemente alta como para pensar que la predisposición al desarrollo de neoplasias causado por el mecanismo de carcinogénesis del sistema MMR pueda tener relación con su aparición.

En cuanto al grupo con EMS, dos aspectos importantes hacen necesario una futura investigación en busca de predisponentes genéticos de desarrollo del cáncer. Por un lado, la menor, pero existente, proporción de casos con antecedentes familiares de neoplasias, tanto relacionadas como no relacionadas con el síndrome de Lynch; por el otro, a pesar de ser muchos de ellos casos esporádicos, no hay que olvidar que la edad precoz con que se desarrolla el CCR es ya de por sí un elemento que hace pensar en el componente genético del cáncer. Actualmente se piensa que el 25-30% de los cánceres colorrectales con componente familiar, y que no pertenecen a síndromes conocidos, podría ser el resultado de alelos de moderada o baja penetrancia aún desconocidos ( de la Chapelle 2004; Johnson et al. 2005).

### **3.3. Características moleculares.**

En primer lugar analizamos la IHQ relacionada con las proteínas del sistema de reparación del ADN. Mientras que en los tumores EMS todos aquellos que fueron analizados presentaron expresión normal de las tres proteínas del sistema MMR estudiadas, fue en los IMS donde se observaron alteraciones de la expresión. En nuestra serie, por tanto, se demuestra que el análisis de la IMS es una herramienta eficaz para la selección de casos candidatos al análisis de las mutaciones en los genes de reparación. Como ya hemos señalado, además hemos encontrado una buena correlación con la IHQ.

En segundo lugar examinamos los marcadores relacionados con el ciclo celular, como Cdk2, Ciclina A, Ciclina D1, Ciclina D3, Ciclina E, p16, p21, p27, RB fosforilado, Skp2, Chk2. No hay literatura relacionada con estos marcadores en el CCR del adulto joven. En nuestro estudio, la expresión de la Ciclina E mostró diferencias significativas (ver Tabla IV.28 de Resultados). Se halla expresada en la mayoría de tumores IMS, en el 83% (5/6), mientras que en los tumores EMS sucede lo contrario, estando en gran parte de ellos, un 86%, ausente (18/21). Como ya se ha señalado, esta Ciclina controla la transición de la fase G1 a la S. En la serie publicada por Sutter et al. (2002), observaron que la sobreexpresión de la proteína alcanzaba el 77% de los CCR IMS, mientras que sólo el 32% de los EMS la presentaba. De la misma manera, la Tesis Doctoral de la Dra. Laura Valle, del CNIO, encuentra que una expresión aumentada en los IMS (58%), frente a una ausencia de la misma en los EMS que



alcanza el 64,6%. Ambos trabajos, por tanto, a pesar de no estudiar específicamente los CCR en jóvenes, coinciden con nuestros resultados.

Aunque el tamaño muestral se hace más reducido a la hora de agrupar los tumores según sean IMS o EMS, encontramos diferentes perfiles moleculares para una parte del resto de marcadores del ciclo celular, como se comenta a continuación.

La Ciclina A se expresa a niveles máximos en la fase S del ciclo celular. Sin embargo, no hay datos en la literatura sobre la relación entre ella y la presencia o no de IMS. En la Tesis Doctoral de la Dra. Laura Valle, del CNIO, donde se analizan tumores con carácter familiar, observa que los tumores IMS presentan más frecuentemente una expresión elevada de la proteína que los tumores EMS. Igual sucede en nuestro trabajo, aunque sin llegar a valores estadísticamente significativos. Por otro lado, la sobre-expresión de la Ciclina A se ha asociado a un peor pronóstico en los CCR (Handa et al. 1999; Bahnassy et al. 2004). Aunque otros estudios muestran lo contrario, y que la expresión de la proteína disminuye en las fases más avanzadas del cáncer colorrectal y asocian una mayor expresión con un mejor pronóstico de la enfermedad (Wang et al. 1996; Li et al. 2002; Bondi et al. 2005). En nuestros resultados, se apunta que la expresión de la Ciclina A en tumores IMS conllevaría una mayor supervivencia, y por tanto un mejor pronóstico (ver Tabla IV.31. de Resultados).

Las ciclinas D regulan la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular, siendo su punto máximo de actividad durante la fase G1. La D1 es la principal ciclina involucrada en la transición G1/S, y se asocia a Cdk4 y a Cdk6 para fosforilar a la proteína del Retinoblastoma (RB). En el año 2004, Moreno-Bueno et al., realizaron un estudio en cánceres de endometrio en el que estimaron una asociación entre la presencia de IMS y la sobre-expresión de Ciclina D1 en los tumores de tipo endometriode. En nuestro trabajo observamos que, cuando comparamos los tumores IMS y los tumores EMS, la expresión de Ciclina D1, es más frecuente en los IMS que en los tumores EMS. Estos resultados también coinciden con los obtenidos en la Tesis Doctoral de la Dra. Laura Valle, llevada a cabo, como se ha referido ya, en tumores CCR con componente familiar.

Existe controversia a la hora de determinar si la expresión de Ciclina D1 conferiría un mal pronóstico en el CCR (Maeda et al. 1997; Handa et al. 1999; Bahnassy et al. 2004), o, al contrario, un buen pronóstico (Holland et al. 2001; McKay et al. 2002). En nuestro trabajo

hemos hallado, como se destaca posteriormente, una asociación entre mayor supervivencia y sobre-expresión de Ciclina D1.

La proteína p27 es un inhibidor de Cdk2 e induce la parada del ciclo en G1. No existen trabajos que asocien su expresión con la diferenciación entre CCR con IMS o EMS. En nuestros resultados se aprecia una mayor expresión de la misma en tumores IMS que en los EMS.

La forma fosforilada de RB es la forma inactiva de la proteína. La activa actúa como regulador negativo de la transición G1/S. Los cánceres colorrectales muestran una expresión incrementada de RB y de RB-P (Gope and Gope 1992; Wagner and Roemer 2005). Este incremento en la expresión es progresivo durante el proceso de carcinogénesis colorrectal (Yamamoto et al. 1999), aunque no existe en la literatura de nuevo su análisis y su relación con la estratificación según la IMS. Nuestros resultados muestran una menor expresión de RB-P en los tumores IMS.

Del resto de marcadores, entre los que se hallan los de adhesión celular, proliferación, apoptosis y otros (E-cadherina,  $\beta$ -catenina, Ki-67, p53, Bcl-2, Citoqueratina 20, RAD50 y SMAD4), de nuevo destacamos aquellos resultados que, sin llegar a la significación estadística, los valores presentan diferencias reseñables, o merecen ser resaltados expresamente, como es el caso de la  $\beta$ -catenina.

En nuestro trabajo hemos encontrado una expresión normal de  $\beta$ -catenina en la membrana en los tumores IMS, aunque también en los EMS (86% para ambas) (ver Tabla IV.29. de Resultados). Nuestra serie, por tanto, contradice lo publicado en la literatura para los CCR sin criterio de edad. Así, se ha observado que, en general, los casos EMS, presentan en el 90% aproximadamente la ruta Wnt activa, con una expresión de  $\beta$ -catenina aberrante, disminuyendo este porcentaje hasta el 65% en los casos con IMS (Iwamoto et al. 2000; Hao et al. 2002; Abdel-Rahman et al. 2005; Kariola et al. 2005). A la hora de hablar del adulto joven, estas proporciones parecen mantenerse, aunque en la literatura no hay muchos estudios en este sentido. Sólo el trabajo de Losi et al (2005), que encontró que la proporción de tumores con  $\beta$ -catenina aberrante es mayor para los EMS, alcanzando un 77,2% de los mismos, mientras que los IMS sólo fue del 42,9%.

Cuando en los tumores IMS o EMS consideramos los antecedentes familiares neoplásicos, la proporción de tumores con la ruta de Wnt inactiva parece aumentar, en concreto en los EMS. En nuestro caso, observamos que si a la EMS añadimos la presencia de antecedentes, la proporción de tumores con expresión normal de  $\beta$ -catenina de membrana asciende hasta el 100% (5/5). Para los IMS se mantiene la proporción del 86%.

No hay datos analizando la expresión de  $\beta$ -catenina y los antecedentes familiares neoplásicos en el CCR del adulto joven. Sin embargo, para el CCR esporádico en el adulto mayor, los resultados son controvertidos. En el trabajo de Shitoh et al. (2001), se determina que la vía de Wnt podría estar activada en una alta proporción de los IMS esporádicos, hasta en un 77% de los casos. No obstante, en el estudio realizado por Young et al. (2001), en que se comparó la expresión nuclear de  $\beta$ -catenina en tumores IMS esporádicos y familiares, observaron que dicha expresión era más común en los casos familiares que en los esporádicos (Young et al. 2001).

Dichos hallazgos vuelven a confirmar la alta proporción de tumores, ahora además tanto IMS como EMS, en el adulto joven que hemos encontrado con expresión normal de  $\beta$ -catenina a nivel de membrana, lo que parece indicar que este tipo de neoplasias seguirían una vía alternativa a la vía Wnt de carcinogénesis del CCR. Estos presupuestos se plantean habitualmente más en tumores IMS, pero también es un dato a tener en consideración en aquellos CCR en adulto joven con EMS, y más especialmente en aquellos con antecedentes familiares de neoplásicos. Estos aspectos podrían tener relación con la vía del fenotipo metilador (CIMP) en el CCR, que parece tener peso también en el CCR en adulto joven (Ang et al. 2009).

### **3.4. Factores pronóstico.**

Ya se ha mencionado en apartados anteriores el valor propio de la IMS como factor pronóstico (Messerini et al. 1997; Gryfe et al. 2000; Samowitz et al. 2001b; Buckowitz et al. 2005; Popat et al. 2005). A la hora de diferenciar los grupos según presenten IMS o EMS, se han encontrado factores pronóstico tanto para la mortalidad como para la recidiva, así como variables que influyen en la supervivencia, aunque el tamaño muestral del grupo de IMS condiciona la significación de los resultados.

En primer lugar, se confirma la relación, por otra parte esperada, entre la presencia de metástasis al diagnóstico y la aparición de recidiva y la menor supervivencia en ambos grupos, igual que sucedía cuando se analizaba la muestra en su conjunto.

En el grupo de tumores con IMS, encontramos como factores de mal pronóstico la presencia de células en “anillo de sello” y la ausencia de expresión de p53.

Existen numerosas publicaciones que relacionan los CCR con células en “anillo de sello” con un peor pronóstico tanto en el CCR a edad precoz, como aquellos esporádicos sin criterio de edad (Nissan et al. 1999; Bittorf et al. 2004; Kang et al. 2005; Liang et al. 2006).

En cuanto a la proteína p53, es una proteína de unión al ADN que regula la transcripción de cientos de genes (Xu and el-Gewely 2001), y que resulta esencial en el mantenimiento de la parada del ciclo celular y en la regulación de la reparación del ADN, la diferenciación y la apoptosis (Roy et al. 1994). Varios estudios han demostrado que en los tumores colorrectales con EMS, p53 está más comúnmente sobre-expresado que en los tumores con IMS (Muta et al. 1996; Fujiwara et al. 1998; Gafa et al. 2000; Valentini et al. 2002; Hasegawa et al. 2004). Sin embargo, y al contrario que lo hallado en nuestro trabajo, la mayoría de estudios relacionan la acumulación nuclear de p53 en los CCR con un mal pronóstico (Starzynska et al. 1992; Harris and Hollstein 1993; Galizia et al. 2004; Paluszkiewicz et al. 2004). Aunque otras series no encuentran correlación significativa entre ambos parámetros, e incluso algunos asocian la sobre-expresión de p53 con un mejor pronóstico (Petersen et al. 2001; Allegra et al. 2003). En el trabajo de Losi et al (2005), sólo se encuentra un mayor porcentaje de sobre-expresión de p53 en los tumores IMS de menores de 45 años (66,7%), frente al 50% en que se halla alterada en los EMS, sin determinar el valor pronóstico del mismo.

En el análisis de la supervivencia, además de variables como las metástasis en el momento del diagnóstico y la aparición de recidiva, son variables que se asocian a una supervivencia mayor la ausencia de células productoras de moco (tumores mucinosos o con células en “anillo de sello”), expresión de p53, y de las ciclinas A, D1 y E (ver Tabla IV.31. del apartado Resultados).

La desregulación del ciclo celular es una de las características del cáncer. El control del ciclo celular depende de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk), que sólo se activan cuando forman complejos moleculares con las ciclinas.

En cuanto a la Ciclina A su valor pronóstico es controvertido, ya que varios trabajos relacionan su sobre-expresión con un peor pronóstico en los CCR (Handa et al. 1999; Bahnassy et al. 2004). Sin embargo, otros muestran que la expresión de la proteína disminuye en las fases más avanzadas del cáncer colorrectal y asocian una mayor expresión con un mejor pronóstico de la enfermedad (Wang et al. 1996; Li et al. 2002; Bondi et al. 2005).

Lo mismo sucede con la Ciclina D1, puesto que por un lado encontramos estudios que asocian la alta expresión de Ciclina D1 con un mal pronóstico en cáncer colorrectal (Maeda et al. 1997; Handa et al. 1999; Bahnassy et al. 2004); otros, con buen pronóstico (Holland et al. 2001; McKay et al. 2002); y además, algunos no encuentran ninguna correlación (Bartkova et al. 1994; Arber et al. 1996).

Algo distinto sucede con la Ciclina E, ya que Yasui et al. (1996), observaron en una serie de 400 pacientes una correlación inversa entre la sobre-expresión de Ciclina E y los estadios de los carcinomas de colon, lo que indicaría que la sobre-expresión de esta proteína podría predecir un buen pronóstico en este tipo de neoplasias (Yasui et al. 1996). Otros trabajos, no obstante, no hallan relación entre la expresión y el pronóstico del CCR (Sutter et al. 2002; Bondi et al. 2005)

En el caso de los tumores que presentaron EMS, llama la atención la asociación entre la localización en el colon izquierdo con un peor pronóstico en cuanto a la aparición de recidivas. Es posible que dicho resultado sea un factor de confusión, ya que dicha localización también es reflejo de la EMS. De nuevo aquí, la literatura también presenta resultados controvertidos a la hora de relacionar la localización del CCR y su valor pronóstico (Mequid et al. 2008; Sjo et al. 2008)

### **3.5. Resumen de las características diferenciales entre los tumores IMSy EMS en el adulto joven.**

En resumen, según nuestros resultados, los CCR que se diagnostican a una edad igual o menor de 45 años, y que presentan IMS tendrían las siguientes características:

- Una edad al diagnóstico menor.
- Predominio de localización a nivel del colon derecho.
- Una proporción alta de tumores mucinosos y con presencia, exclusivamente en este grupo, de células en “anillo de sello”.
- Un porcentaje mayor del habitual de tumores con bajo grado de diferenciación.
- Mejor pronóstico.
- Predisposición a acompañarse en la evolución de otros pólipos colónicos, en comparación al CCR esporádico a cualquier edad.
- Mayor frecuencia de antecedentes familiares de neoplasias relacionadas y no relacionadas con el síndrome de Lynch.
- La frecuencia de la expresión de Cdk2; Ciclina A, D1, D3 y E; p16; p21; p27; Skp2; Chk2; E-cadherina y  $\beta$ -catenina de membrana, mientras que la ausencia para RB-P;  $\beta$ -catenina nuclear; Bcl-2; CK-20 y RAD50. La expresión se mantendría cerca del 50% para Ki-67; p53 y SMAD4.
- Serían factores de mal pronóstico en los tumores IMS: la presencia de células “anillo de sello” y la ausencia de expresión de p53. A la hora del análisis de supervivencia, se añaden las ciclinas A, D1 y E, que su presencia determina una mayor supervivencia.

Por otro lado, aquellos con EMS serían:

- Una edad al diagnóstico mayor.
- Predominio de localización a nivel del colon izquierdo y recto.
- Una proporción menor que los IMS de tumores mucinosos, y con nula presencia de CCR con células en “anillo de sello”.
- Una proporción mayor respecto a los IMS de tumores con alto grado de diferenciación.
- Peor pronóstico que los IMS, debido a una menor supervivencia y mayor recidiva.
- Predisposición a acompañarse en la evolución de otros pólipos colónicos, en comparación al CCR esporádico a cualquier edad.
- Mayor frecuencia de casos esporádicos.

- Menor, aunque no despreciable, número de casos con antecedentes familiares de neoplasias no relacionadas con el síndrome de Lynch.
- Presentarían expresión para E-Cadherina;  $\beta$ -catenina de membrana; Ki-67; CK-20 y RAD50. Por otro lado, sería en especial ausente para Ciclina A, D1, D3 y E;  $\beta$ -catenina nuclear y Bcl-2. La expresión se mantendría cerca del 50% para Cdk2; p16; p21; p27; RB-P; Skp2; Chk2; p53; SMAD4.

La gran mayoría de tumores IMS presentan características propias del síndrome de Lynch, presentando una proporción importante de ellos mutaciones relacionadas con el sistema MMR. Sin embargo, los EMS manifiestan características diferenciadoras, y tal vez, incluso, respecto al CCR esporádico de edad avanzada. Una vía de carcinogénesis, alternativa a la vía Wnt, reflejada en la expresión normal de  $\beta$ -catenina de membrana, podría ser la razón de estos rasgos diferenciales, posiblemente relacionada con la vía del fenotipo metilador (CIMP) en CCR del adulto joven (Ang et al. 2009).

#### 4. DIFERENCIAS GEOGRÁFICAS ENTRE LOS CÁNCERES COLORRECTALES.

No existen análisis comparativos entre diferentes poblaciones del CCR en el adulto joven. Sin embargo, como era de esperar, se encontraron discrepancias entre los grupos de Madrid y de Segovia, justificados no sólo por las diferencias entre el tipo de población, sino también por la posible influencia del ambiente en la carcinogénesis del CCR.

Desde el punto de vista anatómico-clínico surgen discrepancias que, sin alcanzar significación estadística, al menos llaman la atención. A este respecto, merece la pena destacar que muchas de las características diferenciales de los tumores IMS las presentan en mayor proporción los casos de Segovia, con una edad al diagnóstico menor, mayor número de tumores productores de moco y de bajo grado de diferenciación, con presencia de CCR sincrónicos y metacrónicos. Sin embargo a la hora de analizar los antecedentes familiares neoplásicos, la IMS (38% vs 15%) y la presencia de mutaciones de los genes relacionados con el síndrome de Lynch (33% vs 14,3%), la proporción es mayor en el grupo de Madrid frente al de Segovia. No se han podido llevar a cabo un análisis más profundo comparando los grupos IMS y EMS entre ambas poblaciones. Parece que los tumores con EMS de ambas regiones presentarían diferencias entre sí más marcadas, indicando tal vez la heterogeneidad en las vías de

carcinogénesis de los mismos, aunque quizá también una mayor influencia del factor ambiental en este tipo de tumores.

Otro de los datos que es necesario resaltar es la estadificación tumoral al diagnóstico, que fue más avanzada la del grupo de Segovia y, por tanto, que la detección del CCR tiene lugar antes en Madrid que en Segovia. Tal vez los programas de diagnóstico precoz, asociados a un mayor número de casos con antecedentes familiares neoplásicos en la población de Madrid, sean las causas de estas diferencias.

Ya se conoce que existen diferencias interraciales e interétnicas, así como geográficas dentro del CCR (Anderson et al. 2003; Berrino et al. 2007; Gondos et al. 2008; White et al. 2008), por tanto, nuestros datos no hacen sino confirmar estos aspectos pero en el grupo de edad precoz al diagnóstico del CCR.



## **VI. CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

1. La mayoría de los CCR en el adulto joven en nuestra serie (80%) mostró un grado medio de diferenciación, una elevada frecuencia de localización en colon derecho (44,4%), un tercio de los casos fueron productores de moco y un tercio se asocia a pólipos.

2. El 40% de los casos mostró agregación familiar de CCR o de tumores asociados al síndrome de Lynch, o se ajustaron a los criterios clínicos definidos para el mismo.

3. El 31% de los tumores tuvo inestabilidad de microsatélites. El 61% de estos tumores resultó ser consecuencia de mutaciones germinales en *MLH1* o *MSH2*; la edad media de aparición fue menor que en los casos estables, así como una mayor frecuencia de antecedentes familiares positivos de CCR o de neoplasias asociadas al síndrome de Lynch respecto a los estables.

4. Más de la mitad de los tumores de nuestra serie fue diagnosticada en estadios avanzados tanto en el grupo de los estables como en los inestables. El 46,6% tenía afectación ganglionar y el 22,2% metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

5. El retraso en el diagnóstico parece tener un peso considerable en el pronóstico de estos pacientes. Tanto los estadios avanzados como la presencia de metástasis al diagnóstico se asociaron con un peor pronóstico. La localización izquierda también es un factor de mal pronóstico.

6. Aunque sin alcanzar la significación estadística, nuestros resultados apuntan a que la activación de la ruta Wnt, medida por la expresión inmunohistoquímica de la  $\beta$ -catenina, también podría ser un factor de mal pronóstico en estos tumores. En la misma dirección apuntan los resultados referentes a la expresión de ciclina E, ya que el 82% de los fallecidos y el 100% de los pacientes con recidiva tumoral, presentaron tumores con falta de expresión de esta ciclina.

7. A pesar del diagnóstico tardío, la presencia de IMS parece asociarse a un mejor pronóstico, mayor ST y SLE, menor mortalidad, pero no en todos los casos. Aquellos tumores IMS en los que se identificaron células en “anillo de sello” y/o falta de expresión de p53 podrían tener un peor pronóstico.

8. La inestabilidad de microsátélites utilizando el microsátélite Bat26 y la inmunohistoquímica de las proteínas de reparación son herramientas útiles para seleccionar y dirigir el estudio genético de los genes de reparación. En nuestra serie encontramos una buena correlación entre ambas. Además, para la selección de pacientes candidatos también parece útil considerar la presencia de células en “anillo de sello”.

9. La frecuencia de neoplasias sincrónicas y metacrónicas (6,7%) y, en especial, la frecuente asociación con polipos que muestran los CCR del adulto joven acentúan la necesidad de establecer pautas consensuadas de seguimiento en estos pacientes. El desarrollo de pólipos por parte de estos pacientes debe de guardar una estrecha relación con la aparición precoz del CCR y es posible que exista una secuencia carcinogénica acortada, circunstancia que debe de ser valorada a la hora de pautar la periodicidad del seguimiento.

10. El mal pronóstico de algunos de estos CCR junto con el riesgo de desarrollar neoplasias sincrónicas y metacrónicas hacen plantear una posible reevaluación de las técnicas quirúrgicas para el CCR en este tipo de población, llegando en algunos casos a programar la necesidad de resecciones más extensas.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-816.
- Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, et al. (1994) Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 54:1645-1648.
- Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A (1998) Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338:1481-1487.
- Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen HJ (1999) Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 81:214-218.
- Abdel-Rahman WM, Ollikainen M, Kariola R, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Nystrom-Lahti M, Knuutila S, Peltomaki P (2005) Comprehensive characterization of HNPCC-related colorectal cancers reveals striking molecular features in families with no germline mismatch repair gene mutations. *Oncogene* 24:1542-1551.
- Adloff M, Arnaud JP, Schloegel M, Thibaud D, Bergamaschi R (1986). Colorectal cancer in patients under 40 years of age. *Dis Colon Rectum* 29: 322-25.
- Ahlquist DA, Shuber AP (2002) Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers. *Clin Chim Acta* 315:157-168.
- Ahn J, Urist M, Prives C (2004) The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)* 3:1039-1047.
- Alazzouzi H, Alhopuro P, Salovaara R, Sammalkorpi H, Jarvinen H, Mecklin JP, Hemminki A, Schwartz S, Jr., Aaltonen LA, Arango D (2005) SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 11:2606-2611.
- Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnston PG, Wolmark N, Wieand HS (2003) Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol* 21:241-250.
- Alonso A, Benavides M, Blanco I, Brunet J, García -Foncillas J, Mayordomo JI, Pérez P, Urioste M (2006). Cáncer hereditario. *Sociedad Española de Oncología Médica*.
- American Gastroenterological Association (2001). American Gastroenterological Association medical position statement: hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 121: 195-197.
- Anderson WF, Umar A, Brawley OW (2003). Colorectal carcinoma in black and white race. *Cancer Metastasis Rev* 22: 67-82.
- Ang PW, Li WQ, Soong R, Iacopetta B (2009) BRAF mutation is associated with the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer from young patients. *Cancer Letters* 273: 221-224.
- Arber N, Hibshoosh H, Moss SF, Sutter T, Zhang Y, Begg M, Wang S, Weinstein IB, Holt PR (1996) Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 110:669-674.
- Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S, El-Serafi M (2004) Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol* 4:22.

- Bartek J, Lukas J (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3:421-429.
- Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J (1994) The PRAD-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 58:568-573.
- Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, et al (2001). 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colon cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 19: 1865-78.
- Behrens J (1999) Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 18:15-30.
- Bendardaf R, Lamlum H, Pyrhonen S (2004) Prognostic and predictive molecular markers in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 24:2519-2530.
- Bendardaf R, Lamlum J, Ristamäki R, Korkelia E, Syrjänen K, Pyrhönen S (2007) Thymidilate shynthase and microsatellite instability in colorectal cancer: implications for disease free survival, treatment response and survival with metastases. *Acta Oncol* 16: 1-8.
- Berends MJ, Hollema H, Wu Y, van Der Sluis T, Mensink RG, ten Hoor KA, Sijmons RH, de Vries EG, Pras E, Mourits MJ, Hofstra RM, Buys CH, Kleibeuker JH, van Der Zee AG (2001) MLH1 and MSH2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer. *Int J Cancer* 92:398-403.
- Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RG, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, de Vries EG, Hollema H, Karrenbeld A, Buys CH, van der Zee AG, Hofstra RM, Kleibeuker JH (2002) Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 70:26-37
- Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, Santaquilani M; EUROCORE Working group (2007). Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCORE-4 study. *Lancet Oncol* 8: 773-83.
- Bishop DT, Hall NR (1994). The genetics of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 30A: 1.946-1.956.127.
- Bittorf B, Merkel S, Matzel KE, Wein A, Dimmler A, Hohenberger W (2004). Primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum. *Langenbecks Arch Surg* 389: 178-83.
- Boardman LA, Johnson RA, Petersen GM, Oberg AL, Kabat BF, Slusser JP, et al. (2007a). Higher frequency of diploidy in young-onset microsatellite-stable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 13: 2323-28.
- Boardman LA, Morlan BW, Rabe KG, Petersen GM, Lindor NM, Nigon SK, Goldberg J, Galliger S (2007b). Colorectal cancer risks in relatives of young-onset cases: is risk the same across all first-degree relatives? *Clin Gastroenterol Hepatol* 5: 1195-1198.
- Boland CR (2007). Clinical uses of microsatellite instability testing in colorectal cancer: an ongoing challenge. *J Clin Oncol* 25: 754-56.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998) 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* 58:5248-5257.
- Bondi J, Husdal A, Bukholm G, Nesland JM, Bakka A, Bukholm IR (2005) Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *J Clin Pathol* 58:509-514.
- Boyle P (1995) Progress in preventing death from colorectal cancer. *Br J Cancer* 72:528-530



- Boyle P, Ferlay J (2005) Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16:481-488
- Brensinger JD, Laken SJ, Luce MC, Powell SM, Vance GH, Ahnen DJ et al (1998). Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3' mutation in the APC gene. *Gut* 43: 548-552.
- Bronner MP (2003). Gastrointestinal Polyposis Syndromes. *Am J Med Genet* 122: 335-341.
- Bubb VJ, Curtis LJ, Cunningham C, Dunlop MG, Carothers AD, Morris RG, White S, Bird CC, Wyllie AH (1996) Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 12:2641-2649.
- Buckowitz A, Knaebel HP, Benner A, Blaker H, Gebert J, Kienle P, von Knebel Doeberitz M, Kloor M (2005) Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer* 92:1746-1753.
- Buess G, Mentges K, Manncke M, Starlinger M, Becker HD (1992) Technique and results of transanal endoscopic microsurgery in early rectal cancer. *Am J Surg* 163: 63-70).
- Buglioni S, D'Agnano I, Cosimelli M, Vasselli S, D'Angelo C, Tedesco M, Zupi G, Mottolese M (1999) Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2. *Int J Cancer* 84:545-552.
- Bukholm IK, Nesland JM (2000) Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch* 436:224-228.
- Burke W, Petersen G, Lynch P, Botkin J, Daly M, Garber J et al (1997). Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. I. Hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cancer Genetics Studies Consortium. JAMA* 277: 915-919.
- Buttin BM, Powell MA, Mutch DG, Babb SA, Huettner PC, Edmonston TB, Herzog TJ, Rader JS, Gibb RK, Whelan AJ, Goodfellow PJ (2004) Penetrance and expressivity of MSH6 germline mutations in seven kindreds not ascertained by family history. *Am J Hum Genet* 74:1262-1269.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392:300-303.
- Caldes T, Godino J, de la Hoya M, Garcia Carbonero I, Perez Segura P, Eng C, Benito M, Diaz-Rubio E (2002) Prevalence of germline mutations of MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from Spain. *Int J Cancer* 98:774-779
- Castells A y Marzo M (Eds) (2004). *Guía de práctica clínica de prevención del Cáncer colorrectal*. Asociación española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria, Centro Cochrane Iberoamericano.
- Castellvi-Bel S, Castells A, Strunk M, Ferrandez A, Piazuolo E, Mila M, Pinol V, Rodriguez-Moranta F, Andreu M, Lanás A, Pique JM (2005) Genomic rearrangements in MSH2 and MLH1 are rare mutational events in Spanish patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Lett* 225:93-98
- Chan TL, Yuen ST, Chung LP, Ho JWC, Kwan KYM, Chan ASY, Ho JCY, Leung SY, Wyllie AH (1999) Frequent microsatellite instability and mismatch repair gene mutations in young Chinese patients with colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 1221-1226.
- Chao A, Gilliland F, Willman C, et al (2000) Patient and tumor characteristics of colon cancers with microsatellite instability: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 539-44.
- Charbonnier F, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Martin C, Buisine MP, Puisieux A, Frebourg T (2002) MSH2 in contrast to MLH1 and MSH6 is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 62:848-853
- Chiang JM, Chen MC, Changchien CR, Chen JS, Tang R, Wang JY, et al. (2003). Favorable influence of age on tumor characteristics of sporadic colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 46: 904-10.

- Christensen M, Katballe N, Wikman F, Primdahl H, Sorensen FB, Laurberg S, Orntoft TF (2002) Antibody-based screening for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma compared with microsatellite analysis and sequencing. *Cancer* 95:2422-2430.
- Chung DC, Rustgi AK (2003). The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* 138: 560-570.
- Chung YFA, Eu KW, Machin D, Ho JMS, Nyam DCNK, Leong AFPK, Ho YH, et al. (1998). Young age is not a poor prognostic marker in colorectal cancer. *Br J Surg* 85: 1255-59.
- Codina A, Farrés R, Olivet F (2003) Estadificación preoperatoria del Cáncer Colorrectal. *Cir Esp*; 73: 17-19.
- Cohen A, Minsky B, Schilsky (1997) *Cancer: Principles and practice of oncology*. 5th ed. p. 1144-97.
- Craig AL, Hupp TR (2004) The regulation of CHK2 in human cancer. *Oncogene* 23:8411-8418.
- Cui X, Shirai Y, Wakai T, Yokoyama N, Hirano S, Hatakeyama K (2004) Aberrant expression of pRb and p16(INK4), alone or in combination, indicates poor outcome after resection in patients with colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 35:1189-1195.
- Dai CY, Furth EE, Mick R, Koh J, Takayama T, Niitsu Y, Enders GH (2000) p16(INK4a) expression begins early in human colon neoplasia and correlates inversely with markers of cell proliferation. *Gastroenterology* 119:929-942.
- D'Amours D, Jackson SP (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:317-327.
- de Jong AE, Morreau H, Nagengast FM, Mathus-Vliegen EM, Kleibeuker JH, Griffioen G, Cats A, Vasen HF (2005) Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 100: 139-143.
- de Jong AE, Morreau H, Van Puijtenbroek M, Eilers PH, Wijnen J, Nagengast FM, Griffioen G, Cats A, Menko FH, Kleibeuker JH, Vasen HF (2004) The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology* 126:42-48
- de Jong AE, van Puijtenbroek M, Hendriks Y, Tops C, Wijnen J, Ausems MG, Meijers-Heijboer H, Wagner A, van Os TA, Brocker-Vriends AH, Vasen HF, Morreau H (2004) Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10:972-980
- de la Chapelle A (2003) Microsatellite instability. *N Engl J Med* 349:209-210.
- de la Chapelle A (2004) Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 4:769-780.
- de Vos tot Nederveen Cappel WH, Buskens E, van Duijvendijk P, Cats A, Menko FH, Griffioen G et al (2003). Decision analysis in the surgical treatment of colorectal cancer due to a mismatch repair gene defect. *Gut* 52: 1752-55.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE (2001) Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109:121-124.
- Desch CE, Benson AB III, Smith TJ, Flynn PJ, Krause C (1999). Recommended colorectal cancer surveillance guidelines by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 17: 1312-21
- Di Fiore F, Charbonnier F, Martin C, Frerot S, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Buisine MP, Nilbert M, Lindblom A, Frebourg T (2004) Screening for genomic rearrangements of the MMR genes must be included in the routine diagnosis of HNPCC. *J Med Genet* 41:18-20
- Diaz-Llopis M, Menezo JL (1988) Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium in familial adenomatous polyposis. *Arch Ophthalmol* 106:412-413.

- Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J (1997) Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 57:4749-4756.
- Dunlop MG (2002). Guidance on gastrointestinal surveillance for hereditary non-polyposis colorectal cancer, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis, and Peutz-Jeghers syndrome. *Gut* 51: V21-27.
- Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al (1997). Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 6: 105-10.
- Durno C, Aronson M, Bapat B, Cohen Z, Galliger S (2005). Family history and molecular features of children, adolescents, and young adults with colorectal carcinoma. *Gut* 54: 1146-50.
- Duval A, Hamelin R (2002) Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 62:2447-2454.
- Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S, Barusevicius A, Rose D, Kovatich AJ, Boman B, Fry R, Fishel R, Palazzo JP (2000) Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* 31:1506-1514.
- Engel C, Forberg J, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Plaschke J, Kloor M, et al (2006). Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 118: 115-22.
- Engstrom PF, Benson AB III, Cohen A, Doroshow J, Kiel K, et al (1996). NCCN colorectal cancer practice guidelines: the National Comprehensive Cancer Network. *Oncology (Huntingt)* 10(Suppl 11): 140-74.
- ESMO (2001). ESMO minimum clinical recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of colon cancer. *Ann Oncol* 12: 1053-54.
- Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, et al (2006). Colorectal cancer in US adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer* 107: 1153-61.
- Fante R, Benatti P, di Gregorio C, et al (1997). *Am J Gastroenterol* 92: 1505-1509.
- Fazio VW (1991) Curative local therapy of rectal cancer. *Int J Colorect Dis* 6: 66.
- Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF (2001) The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10:721-733.
- Fearon ER (1995) Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 768:101-110.
- Fearon ER, Pierceall WE (1995) The deleted in colorectal cancer (DCC) gene: a candidate tumour suppressor gene encoding a cell surface protein with similarity to neural cell adhesion molecules. *Cancer Surv* 24:3-17.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18: 581- 592.
- Fernebro E, Bendahl PO, Dictor M, Persson A, Ferno M, Nilbert M (2004) Immunohistochemical patterns in rectal cancer: application of tissue microarray with prognostic correlations. *Int J Cancer* 111:921-928.
- Flamen P, Hoekstra OS, Homans F, Van Cutsem E, Maes A, et al (2001). Unexplained rising carcinoembryonic antigen (CEA) in the postoperative surveillance of colorectal cancer: the utility of positron emission tomography (PET). *Eur J Cancer* 37: 862-69
- Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, Booker S, Lynch HT, Jass JR, Green JS, Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR (1998) Accumulated clonal genetic

alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 153:1063-1078.

Furihata M, Ohtsuki Y, Sonobe H, Shuin T, Yamamoto A, Terao N, Kuwahara M (1998) Prognostic significance of cyclin E and p53 protein overexpression in carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Br J Cancer* 77:783-788.

Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, Lanza G (2000) Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 89:2025-2037.

Gafanovich A, Ramu N, Krichevski S, et al (1999) Microsatellite instability and p53 mutations in pediatric secondary malignant neoplasms. *Cancer* 85: 504-510.

Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P, Imperatore V, Romano C, Ciardiello F, Agostini B, Pignatelli C (2004) Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res* 10:3490-3499.

García Alfonso P, Muñoz A, García S (2003). Tratamiento paliativo del cáncer colorrectal. *Cir Esp* 73: 46-51.

Gardner EJ (1962) Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance for a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas and epidermal cysts. *Am J Hum Genet* 14:376-390.

Gardner RJ, Kool D, Edkins E, Walpole IR, Macrae FA, Nasioulas S et al (1997). The clinical correlates of a 3' truncating mutation (codons 1982-1983) in the adenomatous polyposis coli gene. *Gastroenterology*; 113: 326-331.

Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, Machado JC, Pinto E, Seruca R, Halling K, MacLeod P, Powell SM, Jackson CE, Ponder BA, Caldas C (1998) Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 58:4086-4089.

Georgiades IB, Curtis LJ, Morris RM, Bird CC, Wyllie AH (1999). Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence of chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene* 18: 7933-40.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-1715.

Giacomini CP, Leung SY, Chen X, Yuen ST, Kim YH, Bair E, Pollack JR (2005) A gene expression signature of genetic instability in colon cancer. *Cancer Res* 65:9200-9205.

Giannini G, Rinaldi C, Ristori E, Ambrosini MI, Cerignoli F, Viel A, Bidoli E, Berni S, D'Amati G, Scambia G, Frati L, Screpanti I, Gulino A (2004) Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 23:2640-2647.

Giannini G, Ristori E, Cerignoli F, Rinaldi C, Zani M, Viel A, Ottini L, Crescenzi M, Martinotti S, Bignami M, Frati L, Screpanti I, Gulino A (2002) Human MRE11 is inactivated in mismatch repair-deficient cancers. *EMBO Rep* 3:248-254.

Giardiello FM, Brensinger JD, Luce MC, Petersen GM, Cayouette MC, Krush AJ et al (1997). Phenotypic expression of disease in families that have mutations in the 5' region of the adenomatous polyposis coli gene. *Ann Intern Med* 126: 514-519.

Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM (2001). AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 121: 198-213.

Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, Wijnen JT, van Schooten RJ, Dommering CJ, Meijer GA, Craanen ME, Nederlof PM, de Jong D, McElgunn CJ, Schouten JP, Menko FH (2002) Genomic deletions of

- MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer* 87:892-897
- Gondos A, Bray F, Brewster DH, Coebergh JW, Hakulinen T, Janssen-Heijnen ML, Kurtinaitis J, Brenner H; EUNICE Survival Working Group (2008). Recent trends in cancer survival across Europe between 2000 and 2004: a model-based period analysis from 12 cancer registries. *Eur J Cancer* 44: 1463-75.
- Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, Lee WH (1991) The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 67:293-302.
- Gope R, Gope ML (1992) Abundance and state of phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in human colon cancer. *Mol Cell Biochem* 110:123-133.
- Grady WM (2003). Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology* 124: 1.574-1.594.
- Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Miselevich I, Resnick MB, Trougouboff P, Tomsho LD, Kim E, Low M, Almog R, Rennert G, Gruber SB (2003) Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 27:563-570.
- Griffin PM, Liff JM, Greenberg RS, et al (1991) Adenocarcinomas of the colon and rectum in persons under 40 years old. A population-based study. *Gastroenterology* 100: 1033-1040.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H et al (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*; 66: 589-600.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S (2000) Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 342:69-77.
- Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE (1998) E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 392:402-405.
- Guillem JG, Bastar AI, Ng J, et al (1996). Clustering of colorectal cancer in families of probands under 40 years of age. *Dis Colon Rectum* 39: 1004-9.
- Guillem JG, Puig-La Calle J, Cellini C, Murray M, Ng J, et al (1999). Varying features of early age-of-onset "sporadic" and Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer patients. *Dis Colon Rectum* 42: 36-42.
- Gulberg P, Guttler F (1993) A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 21:2261-2262.
- Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357.
- Hall NR, Fiana Pj, Ward B, et al (1994). Genetic susceptibility to colorectal cancer in patients under 45 years of age. *Br J Surg* 81: 1485-9.
- Halling KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, Moon-Tasson L, Mahoney MR, Sargent DJ, O'Connell MJ, Witzig TE, Farr GH Jr, Goldberg RM, Thibodeau SN (1999). Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst.* 91(15):1295-303.
- Harned RK, Williams SM (1982) Familial polyposis coli and periampullary malignancy. *Dis Colon Rectum* 25:227-229.
- Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B, et al. (1995) The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 332:839-847.

- Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Sotamaa K, Prior TW, Westman J, Panescu J, Fix D, Lockman J, Comeras I, de la Chapelle A (2005) Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 352:1851-1860.
- Handa K, Yamakawa M, Takeda H, Kimura S, Takahashi T (1999) Expression of cell cycle markers in colorectal carcinoma: superiority of cyclin A as an indicator of poor prognosis. *Int J Cancer* 84:225-233.
- Hao X, Frayling IM, Willcocks TC, Han W, Tomlinson IP, Pignatelli MN, Pretlow TP, Talbot IC (2002) Beta-catenin expression and allelic loss at APC in sporadic colorectal carcinogenesis. *Virchows Arch* 440:362-366.
- Hao XP, Ilyas M, Talbot IC (1997) Expression of Bcl-2 and p53 in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Pathobiology* 65:140-145.
- Harfe BD, Jinks-Robertson S (2000). DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* 34: 359-99.
- Harris CC, Hollstein M (1993) Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329:1318-1327.
- Harris GJ; Church JM, Senagore AJ, Lavery IC, Hull TL, Strong SA, et al (2002) Factors affecting local recurrence of colonic adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 45: 1029-34.
- Hasegawa A, Fukushima T, Mashiko M, Nakano K, Suzuki S, Endo Y, Ohki S, Hatakeyama Y, Koyama Y, Inoue N, Takebayashi Y, Sekikawa K, Takenoshita S (2004) Alterations of the K-ras and p53 genes and microsatellite instability in sporadic colorectal carcinomas. *Anticancer Res* 24:2047-2052.
- Hawkins NJ, Tomlinson I, Meagher A, Ward RL (2001). Microsatellite-stable diploid carcinoma: a biologically distinct and aggressive subset of sporadic colorectal cancer. *Br J Cancer* 84: 232-36.
- Haydon AM, Jass JR (2002) Emerging pathways in colorectal cancer development. *Lancet Oncol* 3: 83-88.
- Hazebroek EJ (2002) The Color Study Group, COLOR: a randomized clinical trial comparing laparoscopic and open resection for colon cancer. *Surg Endosc* 359: 2224-29.
- Heald RJ, Smedh RK, Kald A, Sexton R, Moran BJ (1997) Abdominoperineal escisión of the rectum – an endangered operation. *Dis Colon Rectum* 40: 747-51.
- Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H (2000) Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 119:921-928.
- Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, Tops C, Breuning M, Brocker-Vriends A, Vasen H, Fodde R, Morreau H (2003) Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol* 162:469-477.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6870-6875.
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479.
- Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, Carrano A, Pagano M, Krausz MM, Hershko A (2001) Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* 91:1745-1751.
- Hill DA, Furman WL, Billups CA, Riedley SE, Cain AM, Rao BN, Pratt CB, Spunt SL (2007) Colorectal carcinoma in childhood and adolescence: a clinicopathological review. *J Clin Oncol* 25: 5808-5814.

- Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, Loda M, Appelman HD, Cho KR, Fearon ER (2001) Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol* 159:2239-2248.
- Ho A, Dowdy SF (2002) Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 12:47-52.
- Ho JW, Yuen ST, Chung LP, et al (2000). Distinct clinical features associated with microsatellite instability in colorectal cancers of young patients. *Int J Cancer* 89: 356-360.
- Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R (1997) BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 57:300-303.
- Hobbs R, Kerr D, Young A (2001) *ABC of Colorectal Cancer*. BMJ Books.
- Holland TA, Elder J, McCloud JM, Hall C, Deakin M, Fryer AA, Elder JB, Hoban PR (2001) Subcellular localisation of cyclin D1 protein in colorectal tumours is associated with p21(WAF1/CIP1) expression and correlates with patient survival. *Int J Cancer* 95:302-306.
- Hughes LJ, Michels VV (1992) Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *Am J Med Genet* 43:1023-1025.
- Iacopetta B (2003) TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat* 21:271-276.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-561.
- Isbister WH (1992). Colorectal cancer below 40 in the Kingdom of Saudi Arabia. *Aust N Z J Surg* 62: 468-72.
- Iwamoto M, Ahnen DJ, Franklin WA, Maltzman TH (2000) Expression of beta-catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis* 21:1935-1940.
- Jagelman DG, DeCosse JJ, Bussey HJ (1988) Upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Lancet* 1:1149-1151.
- Jass JR (2004) HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer* 3:93-100.
- Jass JR, Stewart SM (1992) Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 33:783-786.
- Jass JR, Stewart SM, Stewart J, Lane MR (1994). Hereditary non-polyposis colorectal cancer-morphologies, genes and mutations. *Mutat Res* 310: 125-33.
- Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J, Leggett BA (2002) Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *Eur J Cancer* 38:858-866.
- Jenkins MA, Baglietto L, Dite GS, et al (2002) After hMSH2 and hMLH1-what next? Analysis of three-generational, population-based, early-onset colorectal cancer families. *Int J Cancer* 102: 16-171.
- Jeong SY, Shin KH, Shin JH, Ku JL, Shin YK, Park SY, Kim WH, Park JG (2003) Microsatellite instability and mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 46:1069-1077.
- Johnson V, Lipton LR, Cummings C, Eftekhar Sadat AT, Izatt L, Hodgson SV, Talbot IC, Thomas HJ, Silver AJ, Tomlinson IP (2005) Analysis of somatic molecular changes, clinicopathological features, family history, and germline mutations in colorectal cancer families: evidence for efficient diagnosis of HNPCC and for the existence of distinct groups of non-HNPCC families. *J Med Genet* 42:756-762.

- Kaklamani L, Savage A, Mortensen N, Tsiotos P, Doussis-Anagnostopoulou I, Biddolph S, Whitehouse R, Harris AL, Gatter KC (1996) Early expression of bcl-2 protein in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal neoplasia. *J Pathol* 179:10-14.
- Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY (2005). A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 48: 1161-68.
- Kariola R, Abdel-Rahman WM, Ollikainen M, Butzow R, Peltomaki P, Nystrom M (2005) APC and beta-catenin protein expression patterns in HNPCC-related endometrial and colorectal cancers Short communication. *Fam Cancer* 4:187-190.
- Katsumata K, Sumi T, Tomioka H, Aoki T, Koyanagi Y (2003) Induction of apoptosis by p53, bax, bcl-2, and p21 expressed in colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 8:352-356.
- Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB (1994) Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 54:380-385.
- Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 145:148-156.
- Kim NG, Choi YR, Baek MJ, Kim YH, Kang H, Kim NK, Min JS, Kim H (2001) Frameshift mutations at coding mononucleotide repeats of the hRAD50 gene in gastrointestinal carcinomas with microsatellite instability. *Cancer Res* 61:36-38.
- Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761, 763.
- Knudsen AL, Bisgaard ML, Bulow S (2003) Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* 2:43-55.
- Knudson AG (2002) Cancer genetics. *Am J Med Genet* 111:96-102.
- Kodner IJ, Fry RD, Fleshman JW, Birnbaum EH (1994). Colon, recto y ano. En: Schwartz SI (ed) et al. *Principios de cirugía* (7ª ed): 1229-1345.
- Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, et al (1999). Germ-line MSH6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 59: 5068-74.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4:844-847.
- Kubota Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubbs RR, Fazio VW (1992) Ki-67-determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma. A multivariate analysis. *Cancer* 70:2602-2609.
- Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A, Peltomaki P (2000) Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol* 156:1773-1779.
- Lamlum H, Al Tassan N, Jaeger E, Frayling I, Sieber O, Reza FB, Eckert M, Rowan A, Barclay E, Atkin W, Williams C, Gilbert J, Cheadle J, Bell J, Houlston R, Bodmer W, Sampson J, Tomlinson I (2000) Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q. *Hum Mol Genet* 9:2215-2221.
- Lanza G, Gafa R, Maestri I, Santini A, Matteuzzi M, Cavazzini L (2002) Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Mod Pathol* 15:741-749.
- Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J (1989) Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. *J Clin Oncol* 7: 1447-56.



- Lavery IC, López-Kostner F, Fazio VW, Fernández-Martín M, Milsom JW, Church JM (1997) Chances of cure are not compromised with sphincter-saving procedures for cancer of the lower third of the rectum. *Surg* 122: 779-85.
- Li JQ, Miki H, Ohmori M, Wu F, Funamoto Y (2001) Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 32:945-953.
- Li JQ, Miki H, Wu F, Saoo K, Nishioka M, Ohmori M, Imaida K (2002) Cyclin A correlates with carcinogenesis and metastasis, and p27(kip1) correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms. *Hum Pathol* 33:1006-1015.
- Li JQ, Wu F, Masaki T, Kubo A, Fujita J, Dixon DA, Beauchamp RD, Ishida T, Kuriyama S, Imaida K (2004) Correlation of Skp2 with carcinogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in colorectal tumors. *Int J Oncol* 25:87-95.
- Liang H, Wang XN, Wang BG, Liu N, Wang DC, Hao XS (2006). Prognostic factors of young patients with colon cancer after surgery. *World J Gastroenterol* 12: 1458-1462.
- Liang JT, Huang KC, Cheng AL, Jeng YM, Wu MS, Wang SM (2003). Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *Br J Surg* 90: 205-14.
- Lin JT, Wang WS, Yen CC, Liu JH, Yang MH, Chao TC, Chen PM, Chiou TJ (2005). Outcome of colorectal carcinoma in patients under 40 years of age. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 900-905.
- Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, Walsh-Vockley C, Petersen GM, Walsh MD, Leggett BA, Young JP, Barker MA, Jass JR, Hopper J, Gallinger S, Bapat B, Redston M, Thibodeau SN (2002) Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 20:1043-1048.
- Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al (2005) Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: Familial colorectal cancer type X. *JAMA* 293:1979-1985.
- Liu B, Farrington SM, Peterson GM, et al (1995). Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med* 1: 348-52.
- Lledó S (ed) (2000). *Guía clínica de Cirugía Colorrectal*. Arán Ediciones S.A.
- Lledó S, García-Granero E, García-Armengol J (2003). Tratamiento quirúrgico y resultados del cáncer de recto. *Cir Esp* 73: 25-29.
- Llor X, Pons E, Xicola RM, et al (2005) Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res* 11:7304-7310.
- Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M (1997) Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 3:231-234.
- López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B (2002) Informe sobre la salud de los españoles. Cáncer. Area de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.
- Losi L, Di Gregorio C, Pedroni M, Ponti G, Roncucci L, Scarselli A, et al. (2005). Molecular genetic alterations and clinical features in early-onset colorectal carcinomas and their role for the recognition of hereditary cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* 100: 2280-2287.
- Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, et al. (1993). Genomic instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 12: 2641-49.
- Loy TS, Calaluze RD (1994) Utility of cytokeratin immunostaining in separating pulmonary adenocarcinomas from colonic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 102:764-767.

- Lucci-Cordisco E, Zito I, Gensini F, Genuardi M (2003) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions. *Am J Med Genet* 122A:325-334.
- Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J (1995) Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 375:503-506.
- Lukish JR, Muro K, DeNobile J, Katz R, Williams J, Cruess DF, Drucker W, Kirsch I, Hamilton SR (1998) Prognostic significance of DNA replication errors in young patients with colorectal cancer. *Ann Surg* 227:51-56.
- Luo DC, Cai Q, Sun MH, Ni YZ, Ni SC, Chen ZJ, Li XY, Tao CW, Zhang XM, Shi DR (2005) Clinicopathological and molecular genetic analysis of HNPCC in China. *World J Gastroenterol* 11:1673-1679.
- Lynch HT (1996). Is there a role for prophylactic subtotal colectomy among hereditary nonpolyposis colorectal cancer germline mutation carriers? *Dis Colon Rectum* 39:109-110.
- Lynch HT, de la Chapelle A (1999) Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 36:801-818.
- Lynch HT, de la Chapelle A (2003) Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348:919-932.
- Lynch HT, Krieglger M, Christiansen TA, Smyrk T, Lynch JF, Watson P (1998). Laryngeal carcinoma in a Lynch syndrome II kindred. *Cancer* 62:1007-13
- Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavaliere RJ, Boland CR (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 104:1535-1549.
- Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, Lanspa S, Cavaliere J, Lynch J et al (1995). Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* 76: 2.427-2.433.
- Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ, Marcus J, Smyrk T, Fitzgibbons RJ, Jr., Krieglger M, Lynch JF (1988) Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum* 31:439-444.
- Macek M, Jr., Mercier B, Mackova A, Miller PW, Hamosh A, Ferec C, Cutting GR (1997) Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the CFTR gene. *Hum Mutat* 9:136-147.
- Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9:935-944.
- Maeda K, Chung YS, Kang SM, Ogawa M, Onoda N, Nakata B, Nishiguchi Y, Ikehara T, Okuno M, Sowa M (1997) Overexpression of cyclin D1 and p53 associated with disease recurrence in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 74:310-315.
- Maekawa M, Sugano K, Ushiyama M, Fukayama N, Nomoto K, Kashiwabara H, Fujita S, Kakizoe T (2001) Heterogeneity of DNA methylation status analyzed by bisulfite-PCR-SSCP and correlation with clinico-pathological characteristics in colorectal cancer. *Clin Chem Lab Med* 39:121-128.
- Maitra A, Molberg K, Albores-Saavedra J, Lindberg G (2000) Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *Am J Pathol* 157:1105-1111.
- Manne U, Weiss HL, Grizzle WE (2000) Bcl-2 expression is associated with improved prognosis in patients with distal colorectal adenocarcinomas. *Int J Cancer* 89:423-430.
- Marble K, Banerjee S, Greenwald L (1992) Colorectal carcinoma in young patients. *J Surg Oncol* 51: 179-182.

- Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JK (2002) Focus on colon cancer. *Cancer Cell* 1:233-236.
- Marsischky GT, Lee S, Griffith J, Kolodner RD (1999) 'Saccharomyces cerevisiae MSH2/6 complex interacts with Holliday junctions and facilitates their cleavage by phage resolution enzymes. *J Biol Chem* 274:7200-7206.
- Maul JS, Warner NR, Kuwada SK, Burt RW, Cannon-Albright LA (2006) Extracolonic cancers associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the Utah Population Database. *Am J Gastroenterol.* 101:1591-6.
- McGregor DK, Wu TT, Rashid A, Luthra R, Hamilton SR (2004) Reduced expression of cytokeratin 20 in colorectal carcinomas with high levels of microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 28:712-718.
- McKay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Loane JF, Ahmed FY, Cassidy J, McLeod HL, Murray GI (2002) Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. *J Pathol* 196:386-393.
- Mead LJ, Jenkins MA, Young J, Royce SG, Smith L, St. John JB, Macrae F, Giles GG, Hopper JL, Southey MC (2007) Microsatellite instability markers for identifying early-onset colorectal cancers by germ-line mutations in DNA mismatch repair genes. *Clin Cancer Res* 13: 2865-69.
- Mecklin JP, Jarvinen HJ (2005) Surveillance in Lynch syndrome. *Fam Cancer* 4:267-271.
- Mequid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N (2008). Is there a difference in survival between right versus left-sided colon cancers? *Ann Surg Oncol* 15: 2388-94.
- Messerini L, Vitelli F, De Vitis LR, Mori S, Calzolari A, Palmirotta R, Calabro A, Papi L (1997) Microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal carcinomas: relationship to clinico-pathological variables. *J Pathol* 182:380-384.
- Mitry E, Benhamiche AM, Jouve J-L, Clinard F, Finn-Faivre C, Faivre J (2001) Colorectal adenocarcinoma in patients under 45 years of age: comparison with older patients in a well-defined French population. *Dis Colon Rectum* 44: 380-387.
- Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T (1999b) Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 18:3098-3103.
- Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T (1997) Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 17:271-272.
- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, et al (1993). An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer. *JAMA* 270: 943-47.
- Molnar L, Koves I, Besznyak I (1994). Malignant colorectal tumours in young adults. *Acta Chir Hung* 34: 133-38.
- Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, Sanchez-Estevez C, Marcos R, Hardisson D, Cigudosa JC, Palacios J (2004) Molecular alterations associated with cyclin D1 overexpression in endometrial cancer. *Int J Cancer* 110:194-200.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275:1787-1790.
- Mortensen NJM, Ramírez JM, Takeuchi N, Smilgin Humphreys MM (1995) Colonic J-pouch anal anastomosis after rectal excision for carcinoma: functional outcome. *Br J Surg* 82: 611-13.

- Mourra N, Zeitoun G, Buecher B, Finetti P, Lagarde A, Adelaide J, Birnbaum D, Thomas G, Olschwang S (2007) High frequency of chromosome 14 deletion in early-onset colon cancer. *Dis Colon Rectum* 50: 1881-1886.
- Muller A, Giuffre G, Edmonston TB, Mathiak M, Roggendorf B, Heinmoller E, Brodegger T, Tuccari G, Mangold E, Buettner R, Ruschoff J (2004) Challenges and Pitfalls in HNPCC Screening by Microsatellite Analysis and Immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 6:308-31.
- Muller W, Burgart LJ, Krause-Paulus R, Thibodeau SN, Almeida M, Edmonston TB, Boland CR, Sutter C, Jass JR, Lindblom A, Lubinski J, MacDermot K, Sanders DS, Morreau H, Muller A, Olliani C, Orntoft T, Ponz De Leon M, Rosty C, Rodriguez-Bigas M, Ruschoff J, Ruzkiewicz A, Sabourin J, Salovaara R, Moslein G (2001) The reliability of immunohistochemistry as a prescreening method for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)--results of an international collaborative study. *Fam Cancer* 1:87-92.
- Muller-Tidow C, Metzger R, Kugler K, Diederichs S, Idos G, Thomas M, Dockhorn-Dworniczak B, Schneider PM, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H (2001) Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 61:647-653.
- Muta H, Noguchi M, Perucho M, Ushio K, Sugihara K, Ochiai A, Nawata H, Hirohashi S (1996) Clinical implications of microsatellite instability in colorectal cancers. *Cancer* 77:265-270.
- Nakamura B, Suzuki, Baba S (1997). Resection of liver metastases of colorectal carcinoma. *World J Surg* 21: 741-47.
- Navarro M, Piulats JM (2003). Seguimiento del cáncer colorrectal. *Cir Esp* 73: 58-62.
- Nicholls RJ (1997) Surgery for rectal carcinoma. En: Nicholls RJ, Dozois RR, editors. *Surgery of the colon and rectum*. New York: Churchill-Livingstone; p.427-73.
- Niessen RC, Berends MJW, Wu Y, Sijmons RH, Hollema H, Ligtenberg MJL, et al (2006). Identification of mismatch repair gene mutations in young patients with colorectal cancer and in patients with multiple tumours with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 55: 1781-88.
- Nissan A, Guillem JG, Paty PB, Wong WD, Cohen AM (1999). Signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: a matched control study. *Dis Colon Rectum* 42(9): 1176-80.
- Nollet F, Berx G, van Roy F (1999) The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2:77-85.
- Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group (1992). Expectancy or primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: A randomized trial. *J Clin Oncol* 10: 896-903.
- Nordlinger B, Guiget M, Vaillant JC, Ballardur P, Boudjema. Bachellier PH, et al (1996). Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver: a prognostic scoring system to improve case selection. *Cancer* 771: 1254-62
- Oates G, Finan P, Marks C, Bartram C, Reznik R, Shepherd N (1997) Handbook for the clinicopathological assessment and staging of colorectal cancer. UK Co-ordinating Committee on Cancer Research, London.
- O'Connell JB, Maggard MA, Livingston EH, Yo CK (2004) Colorectal cancer in the young. *Am J Surg* 187: 343-348.
- Offit K (1998) *Clinical Cancer Genetics*. Wiley-Liss, New York.
- Offit K (2004) MSH6 Mutations in Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer: Another Slice of the Pie. *J Clin Oncol* 22:4449-4451.
- Okuno M, Ikehara T, Nagayama M, et al (1987) Colorectal cancer in young adults. *Am J Surg* 154: 264-268.

- Oliveira F, Napoli CC, Rossi BM, Toshiiko W, Aguilar S Jr, Monteiro EM, Vierira ML, Lopes A (2004) Frequency of extra-colonic tumors in hereiditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) in Brazilian families: An analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. *Fam Cancer* 3: 41-47.
- Paluszkiewicz P, Berbec H, Pawlowska-Wakowicz B, Cybulski M, Paszkowska A (2004) p53 protein accumulation in colorectal cancer tissue has prognostic value only in left-sided colon tumours. *Cancer Detect Prev* 28:252-259.
- Paraf F, Jothy S (2000) Colorectal cancer before the age of 40. *Dis Colon Rectum* 43: 1222-1226.
- Parramore JB, Wei JP, Yeh KA (1998). Colorectal cancer in patients under forty: Presentation an outcome. *Am Surg* 64: 563-68.
- Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P (1993) Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 75:1227-1236.
- Paz Bouza JI. Patología no tumoral del intestino. En: Fariña J (1990). *Anatomía patológica*. Salvat Editores.
- Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, et al. (1993) Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 53:5853-5855.
- Peltomaki P, Vasen H (2004). Mutations associated with HNPCC predisposition - Update of ICG-HNPCC/INSIGHT mutation database. *Dis Markers* 20: 269-76.
- Perucho M (1996) Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 377:675-684.
- Petersen S, Thames HD, Nieder C, Petersen C, Baumann M (2001) The results of colorectal cancer treatment by p53 status: treatment-specific overview. *Dis Colon Rectum* 44:322-333; discussion 333-324.
- Pharoah P, Caldas C (1999) Molecular genetics and the assessmente of human cancers. *Expert reviews in molecular medicine*; 11, March: 1-19.
- Pinol V, Andreu M, Castells A, Paya A, Bessa X, Rodrigo J (2004) Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicentre, prospective, nationwide study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16:39-45.
- Pinol V, Castells A, Andreu M, Castellvi-Bel S, Alenda C, Llor X et al (2005). Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistchemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 293: 1986-94.
- Popat S, Hubner R, Houlston RS (2005) Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 23:609-618.
- Porschen R, Bermann A, Loffler T, Haack G, Rettig K, Anger Y, et al (2001). Fluorouracil plus leucovorin as effective adjuvant chemotherapy in curatively resected stage III colon cancer: results of the trial adjCCA-01. *J Clin Oncol* 19: 1787-94.
- Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B, Hengels KJ, Borchard F (1991) Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 47:686-691.
- QUASAR Collaborative Group (2000). Comparison of fluorouracil wiyh additional levamisole, higher-dose folinic acid, or both, as adjuvant chmotherapy for colorectal cancer: a randomised trial-QUASAR Collaborative Group. *Lancet* 355: 1588-96.
- Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS (1986) Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. *Lancet* 1: 996-99.

- Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA (2004) Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res* 568:275-282
- RCSE (Royal College of Surgeons of England) and ACGBI (Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland) (1996) Guidelines for the management of colorectal cancer. June.
- Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S (2003) Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349:247-257.
- Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S (1997a) A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 89:1758-1762.
- Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Pekka-Mecklin J, Myrhoj T, Rozen P, Bertario L et al (1997b) Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. International Collaborative Group on HNPCC. *Ann Surg* 225: 202-207
- Roig JV, Solama A, Alós R (2003). *Cir Esp* 73: 20-24.
- Rosati G, Chiacchio R, Reggiardo G, De Sanctis D, Manzione L (2004) Thymidylate synthase expression, p53, bcl-2, Ki-67 and p27 in colorectal cancer: relationships with tumor recurrence and survival. *Tumour Biol* 25:258-263.
- Rovella V, Carrara S, Cogliandolo S, et al (2001) Familial microsatellite-stable non-polyposis colorectal cancer: incidence and characteristics in a clinic-based population. *Ann Oncol* 12: 813-18.
- Roy B, Beamon J, Balint E, Reisman D (1994) Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53 expression in some tumors. *Mol Cell Biol* 14:7805-7815.
- Rubin BP, Skarin AT, Pisick E, Rizk M, Salgia R (2001) Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev* 10:77-82.
- Rustgi AK (1994). Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med* 331: 1.694-1.702.
- Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Manavis J, Rudzki B, Shen L, Suthers G (2002) Correlation of mismatch repair genes immunohistochemistry and microsatellite instability status in HNPCC-associated tumours. *Pathology* 34:541-547.
- Salahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A (2001) Microsatellite Instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* 81:535-541.
- Saleh HA, Jackson H, Khatib G, Banerjee M (1999) Correlation of bcl-2 oncoprotein immunohistochemical expression with proliferation index and histopathologic parameters in colorectal neoplasia. *Pathol Oncol Res* 5:273-279.
- Salovaara R, Roth S, Loukola A, Launonen V, Sistonen P, Avizienyte E, Kristo P, Jarvinen H, Souchelnytskyi S, Sarlomo-Rikala M, Aaltonen LA (2002) Frequent loss of SMAD4/DPC4 protein in colorectal cancers. *Gut* 51:56-59.
- Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M, Gruenthal K, Leppert MF, Slattery ML (2001a) The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 121:830-838.
- Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, Slattery ML (2001b) Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:917-923.

- Samowitz WS, Slaterry ML, Kerber RA (1995) Microsatellite instability in human colonic cancer is not a useful clinical indicator of familial colorectal cancer. *Gastroenterology* 109: 1765-71.
- Savas N, Dagli U, Akbulut S, Yuksel O, Sahin B (2007) Colorectal cancer localization in young patients: should we expand the screening program? *Dig Dis Sci* 52: 798-802.
- Scartozzi M, Bianchi F, Rosati S, Galizia E, Antolini A, Loretelli C, Piga A, Bearzi I, Cellerino R, Porfiri E (2002) Mutations of hMLH1 and hMSH2 in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with microsatellite instability and abnormalities of mismatch repair protein expression. *J Clin Oncol* 20:1203-1208.
- Scheithauer W, Rosen H, Kornek G, Sebesta C, Depisch D (1993). Randomized comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *BMJ* 306: 752-55.
- Schiemann U, Mueller-Koch Y, Gross M, et al (2004) Extended microsatellite analysis in microsatellite stable, MSH2 and MLH1 mutation-negative HNPCC patients: genetic reclassification and correlation with clinical features. *Digestion* 69: 166-176.
- Schneider-Stock R, Boltze C, Peters B, Hopfner T, Meyer F, Lippert H, Roessner A (2003) Differences in loss of p16INK4 protein expression by promoter methylation between left- and right-sided primary colorectal carcinomas. *Int J Oncol* 23:1009-1013.
- Schoen RE (2002). The case for population-based screening for colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2:65-70.
- Schwandner O, Schiedeck TH, Bruch HP, Duchrow M, Windhoevel U, Broll R (2000) p53 and Bcl-2 as significant predictors of recurrence and survival in rectal cancer. *Eur J Cancer* 36:348-356.
- Schwartz RA, Torre DP (1995) The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol* 33:90-104.
- Scott IS, Morris LS, Bird K, Davies RJ, Vowler SL, Rushbrook SM, Marshall AE, Laskey RA, Miller R, Arends MJ, Coleman N (2003) A novel immunohistochemical method to estimate cell-cycle phase distribution in archival tissue: implications for the prediction of outcome in colorectal cancer. *J Pathol* 201:187-197.
- Scott N, Jackson P, Al-Jaberi T, Dixon MF, Quirke P, Finan PJ (1995) Total mesorectal escisión and local recurrence: a study of tumour spread in the mesorectum distal to rectal cancer. *Br J Surg* 82: 1031-33.
- Seow-Choen F, Goh HS (1995) Prospective randomized trial comparing J colonic pouch-anal anastomosis and straight coloanal reconstruction. *Br J Surg* 82: 608-10.
- Shapira M, Ben-Izhak O, Linn S, Futerman B, Minkov I, Hershko DD (2005) The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 103:1336-1346.
- Shepherd NA, Richman PI, England J (1988) Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol* 155:213-219.
- Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677.
- Shitoh K, Furukawa T, Kojima M, Konishi F, Miyaki M, Tsukamoto T, Nagai H (2001) Frequent activation of the beta-catenin-Tcf signaling pathway in nonfamilial colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer* 30:32-37.
- Simone C, Resta N, Bagella L, Giordano A, Guanti G (2002) Cyclin E and chromosome instability in colorectal cancer cell lines. *Mol Pathol* 55:200-203.
- Sinicropo FA, Hart J, Michelassi F, Lee JJ (1995) Prognostic value of bcl-2 oncoprotein expression in stage II colon carcinoma. *Clin Cancer Res* 1:1103-1110.

- Sinicrope FA, Roddey G, Lemoine M, Ruan S, Stephens LC, Frazier ML, Shen Y, Zhang W (1998) Loss of p21WAF1/Cip1 protein expression accompanies progression of sporadic colorectal neoplasms but not hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 4:1251-1261.
- Sjo OH, Lunde OC, Nygaard K, Sandvik L, Nesbakken A (2008). Tumour location is a prognostic factor for survival in colonic cancer patients. *Colorectal Dis* 10: 33-40.
- Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ (2003) American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2003. *CA Cancer J Clin* 53: 27-43.
- Smith RA, von Eschenbach AC, Wender R, Levin B, Byers T, Rothenberger D, Brooks D, Creasman W, Cohen C, Runowicz C, Saslow D, Cokkinides V, Eyre H (2001) American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. Also: update 2001--testing for early lung cancer detection. *CA Cancer J Clin* 51:38-75; quiz 77-80.
- Soravia C, Berk T, Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S et al (1998). Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet*; 62: 1.290-1.301.
- Southey MC, Jenkins MA, Mead L, Whitty J, Trivett M, Tesoriero AA, Smith LD, Jennings K, Grubb G, Royce SG, Walsh MD, Barker MA, Young JP, Jass JR, St John DJ, Macrae FA, Giles GG, Hopper JL (2005) Use of molecular tumor characteristics to prioritize mismatch repair gene testing in early-onset colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23:6524-6532
- Starzynska T, Bromley M, Ghosh A, Stern PL (1992) Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 66:558-562.
- Stone JG, Robertson D, Houlston RS (2001) Immunohistochemistry for MSH2 and MHL1: a method for identifying mismatch repair deficient colorectal cancer. *J Clin Pathol* 54:484-487.
- Stormorken AT, Bowitz-Lothe IM, Noren T, Kure E, Aase S, Wijnen J, Apold J, Heimdal K, Moller P (2005) Immunohistochemistry identifies carriers of mismatch repair gene defects causing hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23:4705-4712.
- Storojeva I, Boulay JL, Heinimann K, Ballabeni P, Terracciano L, Laffer U, Mild G, Herrmann R, Rochlitz C (2005) Prognostic and predictive relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Oncol Rep* 14:241-249.
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-76.
- Suter CM, Martin DI, Ward RL (2004) Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet* 36:497-501.
- Sutter T, Dansranjav T, Lubinski J, Debniak T, Giannakudis J, Hoang-Vu C, Dralle H (2002) Overexpression of cyclin E protein is closely related to the mutator phenotype of colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 17:374-380.
- Suzuki H, Matsumoto K, Terabe M (1992) Ki-67 antibody labeling index in colorectal carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 15:317-320.
- Takeichi M (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7:619-627.
- Tanami H, Tsuda H, Okabe S, Iwai T, Sugihara K, Imoto I, Inazawa J (2005) Involvement of cyclin D3 in liver metastasis of colorectal cancer, revealed by genome-wide copy-number analysis. *Lab Invest*.
- Tang Y, Katuri V, Srinivasan R, Fogt F, Redman R, Anand G, Said A, Fishbein T, Zasloff M, Reddy EP, Mishra B, Mishra L (2005) Transforming growth factor-beta suppresses nonmetastatic colon cancer through Smad4 and adaptor protein ELF at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res* 65:4228-4237.



- Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR (2003) Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat* 22:428-433
- Terdiman JP, Levin TR, Allen BA et al (2002) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in young colorectal cancer patients: high-risk clinic versus population-based registry. *Gastroenterology* 122: 940-947.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260:816-819.
- Thomas GV, Szigeti K, Murphy M, Draetta G, Pagano M, Loda M (1998) Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. *Am J Pathol* 153:681-687.
- Tollenaar RA, van Krieken JH, van Slooten HJ, Bruinvels DJ, Nelemans KM, van den Broek LJ, Hermans J, van Dierendonck JH (1998) Immunohistochemical detection of p53 and Bcl-2 in colorectal carcinoma: no evidence for prognostic significance. *Br J Cancer* 77:1842-1847.
- Tot T (1999) Adenocarcinomas metastatic to the liver: the value of cytokeratins 20 and 7 in the search for unknown primary tumors. *Cancer* 85:171-177.
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8681-8686.
- Traverso G, Shuber A, Levin B, Johnson C, Olsson L, Schoetz DJ, Jr., Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW, Vogelstein B (2002) Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 346:311-320.
- Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al (2005). Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 352: 2696-704.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S (2004) Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96:261-268.
- Valentini AM, Renna L, Armentano R, Pirrelli M, Di Leo A, Gentile M, Caruso ML (2002) Mismatch repair, p53 and beta-catenin proteins in colorectal cancer. *Anticancer Res* 22:2083-2088.
- Valera V, Yokoyama N, Walter B, Okamoto H, Suda T, Hatakeyama K (2005) Clinical significance of Ki-67 proliferation index in disease progression and prognosis of patients with resected colorectal carcinoma. *Br J Surg* 92:1002-1007.
- Valle L, Perea J, Carbonell P, Fernández V, Dotor A, Benítez J, Urioste M (2007). Clinicopathologic and Pedigree Differences in Amsterdam I-Positive Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Families According to Tumor Microsatellite Instability Status. *J Clin Oncol* 25: 781-86.
- Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M (2001) Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* 439:725-751.
- Vasen HF (2005) Clinical Description of the Lynch Syndrome [Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)]. *Fam Cancer* 4:219-225.
- Vasen HF, Mecklin JP, Watson P, Utsunomiya J, Bertario L, Lynch P, Svendsen LB, Cristofaro G, Muller H, Khan PM, et al. (1993) Surveillance in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an international cooperative study of 165 families. The International Collaborative Group on HNPCC. *Dis Colon Rectum* 36:1-4.
- Vasen HF, Nagengast FM, Khan PM (1995). Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* 345: 1183-84.

- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT (1999) New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116:1453-1456.
- Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC (1989) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 92 ( Pt 4):531-540.
- Vibert E, Canedo L, Adam R (2005). Strategies to treat primary unresectable colorectal liver metastases. *Semin Oncol* 32 (6 Supl. 8): 33-39.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532.
- Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD, Fox E (2002) Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* 62:3485-349.
- Wagner A, Hendriks Y, Meijers-Heijboer EJ, de Leeuw WJ, Morreau H, Hofstra R, Tops C, Bik E, Brocker-Vriends AH, van Der Meer C, Lindhout D, Vasen HF, Breuning MH, Cornelisse CJ, van Krimpen C, Niermeijer MF, Zwinderman AH, Wijnen J, Fodde R (2001) Atypical HNPCC owing to MSH6 germline mutations: analysis of a large Dutch pedigree. *J Med Genet* 38:318-322.
- Wagner S, Roemer K (2005) Retinoblastoma protein is required for efficient colorectal carcinoma cell apoptosis by histone deacetylase inhibitors in the absence of p21Waf. *Biochem Pharmacol* 69:1059-1067.
- Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, Propping P, Mangold E (2003) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J Cancer* 103:636-641
- Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB, 3rd, Hamilton SR (2001) Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 344:1196-1206.
- Watson P, Lynch HT (1994) The tumor spectrum in HNPCC. *Anticancer Res* 14:1635-1639
- Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, Jarvinen H, Lynch HT (1994) The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med* 96:516-520.
- Wexner SD, Rotholtz NA (2000) Surgeon influenced variables in resectional rectal cancer surgery. *Dis Colon Rectum* 43: 1606-27.
- White A, Liu CC, Xia R, Burau K, Cormier J, Chan W, Du XL (2008). Racial disparities and treatment trends in a large cohort of elderly African Americans and Caucasians with colorectal cancer, 1991 to 2002. *Cancer* 113: 3400- 09.
- Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Moller P, Stormorken A, Meijers-Heijboer H, Lindhout D, Menko F, Vossen S, Moslein G, Tops C, Brocker-Vriends A, Wu Y, Hofstra R, Sijmons R, Cornelisse C, Morreau H, Fodde R (1999) Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet* 23:142-144.
- Wijnen J, Khan PM, Vasen H, Menko F, van der Klift H, van den Broek M, van Leeuwen-Cornelisse I, Nagengast F, Meijers-Heijboer EJ, Lindhout D, Griffioen G, Cats A, Kleibeuker J, Varesco L, Bertario L, Bisgaard ML, Mohr J, Kolodner R, Fodde R (1996) Majority of hMLH1 mutations responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer cluster at the exonic region 15-16. *Am J Hum Genet* 58:300-307.
- Wijnen J, Vasen H, Khan PM, Menko FH, van der Klift H, van Leeuwen C, van den Broek M, van Leeuwen-Cornelisse I, Nagengast F, Meijers-Heijboer A, et al. (1995) Seven new mutations in

hMSH2, an HNPCC gene, identified by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 56:1060-1066.

Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, Zwinderman AH, van der KH, Mulder A, et al (1998). Clinical findings for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med* 339: 511-18.

Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE (1990) Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 323:1664-1672

Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J et al (2003). Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 124: 544-560.

Wolmark N, Wieand S, Lembersky B, et al (2004). A phase III trial comparing oral UFT to FULV in stage II and III carcinoma of the colon; Results of NSABP protocol C-06. *Proc AM Soc Clin Oncol* 22: 247s [abstract 3508].

Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Macdonald GA (2000) Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg* 87:1197-1202.

Wu JT, Kakar S, Nelson RL, Mihalov ML, Hayward B, Gilbert PB, Ghosh L (2005) Prognostic significance of DCC and p27Kip1 in colorectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13:45-54.

Xie D, Sham JS, Zeng WF, Lin HL, Che LH, Wu HX, Wen JM, Fang Y, Hu L, Guan XY (2003) Heterogeneous expression and association of beta-catenin, p16 and c-myc in multistage colorectal tumorigenesis and progression detected by tissue microarray. *Int J Cancer* 107:896-902.

Xu H, el-Gewely MR (2001) P53-responsive genes and the potential for cancer diagnostics and therapeutics development. *Biotechnol Annu Rev* 7:131-164.

Yamamoto H, Soh JW, Monden T, Klein MG, Zhang LM, Shirin H, Arber N, Tomita N, Schieren I, Stein CA, Weinstein IB (1999) Paradoxical increase in retinoblastoma protein in colorectal carcinomas may protect cells from apoptosis. *Clin Cancer Res* 5:1805-1815.

Yang HB, Chow NH, Sheu BS, Chan SH, Chien CH, Su IJ (1999) The role of bcl-2 in the progression of the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Anticancer Res* 19:727-730.

Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK, Rennert H, Pirog EC, Banner BF, Chen YT (2008). Clinical, Pathologic, and Molecular Features of Early-onset Colorectal Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. Nov 26. [Epub]

Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, Yokozaki H, Semba S, Shimamoto F, Tahara E (1996) Expression of cyclin E in human gastric adenomas and adenocarcinomas: correlation with proliferative activity and p53 status. *J Exp Ther Oncol* 1:88-94.

Yasui W, Naka K, Suzuki T, Fujimoto J, Hayashi K, Matsutani N, Yokozaki H, Tahara E (1999) Expression of p27Kip1, cyclin E and E2F-1 in primary and metastatic tumors of gastric carcinoma. *Oncol Rep* 6:983-987.

Yiu R, Qiu H, Lee SH, García Aguilar J (2005) Mechanisms of microsatellite instability in colorectal cancer patients in different age groups. *Dis Colon Rectum* 48: 2061-2069.

Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, George J, Goldblatt J, Walpole I, Robin SA, Borten MM, Stitz R, Searle J, McKeone D, Fraser L, Purdie DR, Podger K, Price R, Buttenshaw R, Walsh MD, Barker M, Leggett BA, Jass JR (2001) Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol* 159:2107-2116.

Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M, Lothe RA, Gleeson CM, Russell SE, Muzeau F, Flejou JF, Hoang-Xuan K, Lidereau R, Thomas G, Hamelin R (1998) Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer* 21:101-107.

## **VIII. ANEXOS**



## ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO.

### **HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE EXCEDENTES DE TEJIDO O SANGRE CON FINES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

#### Finalidad y descripción del proceso

Este documento tiene como objeto solicitar su autorización escrita para la donación gratuita de parte de la muestra sobrante de tejido o sangre que le van a extraer, con el fin de utilizar dicho sobrante en investigación biomédica relacionada con el cáncer. Es importante que lea detenidamente esta hoja de consentimiento informado, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

La principal vía de obtener dichos tejidos o sangre que permitan la investigación biomédica son las muestras sobrantes de las extracciones que se hacen con fines diagnósticos. Parte de la muestra de tejido o sangre no es necesaria para el correspondiente estudio y para establecer un diagnóstico y por ello, es normalmente destruida.

Usted como paciente puede donar el sobrante de su muestra para que, en lugar de ser destruido, pueda ser utilizado en investigación biomédica relacionada con el cáncer. La finalidad de la donación es dotar a los investigadores de tejido o sangre para que puedan desarrollar avances en el terreno del conocimiento sobre el cáncer, en particular sobre su aparición, evolución y tratamiento.

El consentimiento que ahora presta no supone para usted ningún riesgo o molestia adicional ya que únicamente va a autorizar la investigación con muestras sobrantes de tejido o sangre, que de otra forma se desecharían. Para la obtención de este material, no se llevará a cabo ninguna prueba o intervención distinta de aquella en la que se obtiene la muestra de tejido o sangre para su estudio.

La donación de este sobrante de tejido/ sangre es voluntaria por lo que, si Ud. da el consentimiento para su uso, en cualquier momento puede revocarlo. En caso de producirse esta revocación ello no supondrá ningún cambio en la relación con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico /tratamiento y/o seguimiento. En caso de revocación su muestra dejará de formar parte de la investigación aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarán parte de la misma.

#### Carácter altruista de la donación

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación. En todo caso, usted renuncia a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderle en el futuro y que sea, lógicamente, renunciabile. Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo como resultado de su participación en este estudio. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de la muestra incorporada y de los resultados de la investigación corresponderá al Hospital 12 de Octubre y, en su caso, al investigador. Las muestras podrán ser cedidas a otros grupos de investigación bajo acuerdos de colaboración y siempre para la investigación biomédica del cáncer.

### Protección de datos y confidencialidad

Los datos personales que se recojan sobre Usted, serán confidenciales y procesados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria y relativa a la investigación biomédica vigente, tratándose los mismos únicamente de acuerdo con los objetivos en el presente comunicado descritos, por lo que cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tienen carácter estrictamente confidencial. Asimismo, se informa que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

En el momento que usted consienta el uso de excedente de muestra para los fines de investigación aplicada descrito, dicho excedente (incluyendo terapias experimentales) será sometido a un proceso de disociación. Es decir, sólo será identificado por un número y/o un código constando todos sus datos debidamente codificados, por lo que los investigadores implicados nunca conocerán su identidad o dato alguno que pudiera llegar a identificarle; sin embargo, los mismos, sí podrán en todo caso acceder a otros datos como su sexo o edad, pero siempre manteniendo la debida confidencialidad conforme a la legislación vigente.

De igual modo, sus datos personales serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, con la finalidad de gestionar el uso del excedente cedido por usted para los fines de investigación descrito en el presente comunicado, pudiendo ejercer en cualquier momento, los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal.

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio / proyecto de investigación manteniéndose durante el desarrollo del mismo.

### Información sobre resultados del estudio

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio / proyecto de investigación manteniéndose durante el desarrollo del mismo. Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para Ud.

Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser tanto clínica como genéticamente relevantes para Ud e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así Ud lo estima oportuno. Un facultativo del



Hospital 12 de Octubre se compromete a ofrecerle consejo genético, una vez obtenidos y evaluados los resultados del estudio.

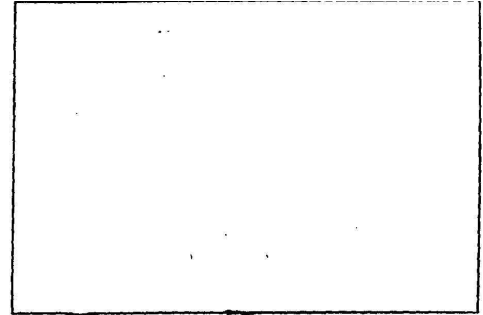
Asimismo, podría obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a Ud decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de esta hoja.

### La muestra

La muestra formará parte de un banco de muestras o tumores hasta su uso en el proyecto de investigación pudiendo ser cedida a otros investigadores, los que a su vez podrán realizar ensayos relacionados con la finalidad para la que Ud haya donado la muestra. Estos investigadores no tendrán en ningún momento, como ya se ha indicado anteriormente, acceso a su identidad.

*Le Agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento del cáncer.*

|   |   |
|---|---|
| DATOS DEL PACIENTE  |   |
| Apellidos   |   |
| Nombre  |   |
| Dirección   |   |
| <b>DNI</b>  | <b>Nº historia clínica</b>  |
| Autoriza la comunicación de la información relevante derivada de la investigación   | <b>SI</b> <input type="checkbox"/> <b>NO</b> <input type="checkbox"/> |
| Firma   | Fecha   |
| <i>Manifiesto que he recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas</i> |   |



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

D.N.I. del paciente: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nombre del Médico que informa: \_\_\_\_\_

Nº Colegiado: \_\_\_\_\_

### UNIDAD DE CÁNCER FAMILIAR. ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS PREDISPONENTES A CÁNCER DE COLON NO ASOCIADO A POLIPOSIS (CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO POLIPÓSICO)

En la mayoría de las ocasiones el cáncer de colon se presenta con carácter esporádico. Existen algunas familias en las que se observa que el número de casos es superior a lo que cabría esperar en la población general, sin que ello se acompañe de poliposis intestinal y acompañados de una elevada incidencia de tumores como el de estómago, vías biliares, endometrio u ovario entre otros. Estudios recientes han puesto de manifiesto que algunas de estas familias presentan mutaciones en alguno de sus genes que son los responsables de este hecho.

Estas mutaciones se transmiten de padres a hijos, igual que se transmiten otros caracteres físicos (como, por ejemplo, el color del pelo) y su presencia supone un aumento del riesgo de desarrollar a lo largo de la vida un cáncer de colon, recto, endometrio y en menor medida de otros tumores como los mencionados anteriormente.

La presencia de una de las mutaciones citadas en una persona no significa que se tenga la certeza absoluta de que este individuo vaya a desarrollar este tipo de tumor, únicamente indica que existe un riesgo mayor al de la población general.

Por el contrario, la ausencia de dicha mutación no puede garantizar la no aparición del cáncer, puesto que es posible que existan otras mutaciones hoy en día desconocidas y que por lo tanto no pueden ser estudiadas o simplemente que no hayan sido detectadas y por otro lado siempre persiste el riesgo de desarrollar un cáncer de forma esporádica (no hereditario).

Su caso ha sido valorado por una Unidad de Consejo Genético en Cáncer Familiar que, a la vista de sus antecedentes familiares, ha considerado la posibilidad de proceder a un estudio molecular con el fin de determinar si posee alguna alteración genética de las que hoy en día conocemos como responsables del "Síndrome de Cáncer de Colon Hereditario no Polipósico".

El análisis se realiza sobre una muestra de sangre extraída a tal efecto una vez otorgado el consentimiento, valorándose de forma exclusiva factores genéticos relacionados con este síndrome sin que pueda ser utilizada para otros fines ni para estudiar otros aspectos que no sean los relacionados con este tipo de tumores. En ocasiones y previo al estudio de mutaciones en sangre debe procederse a un estudio del tejido tumoral para lo cual puede ser preciso solicitar muestras de tejido al servicio de Anatomía patológica correspondiente.

La información sobre los resultados es estrictamente confidencial y únicamente será facilitada a la persona estudiada y a quienes ella nos autorice por escrito. Estos datos quedarán bajo la custodia de la Unidad de Consejo Genético que le atiende, sin que consten en su historial clínico y no podrán ser cedidos a ninguna entidad o persona sin su autorización expresa. Los datos podrán ser utilizados con el fin de realizar estudios epidemiológicos, garantizando en todo momento el anonimato. Si, no obstante lo anteriormente expuesto, en algún momento usted decide que esta información sea destruida, podrá solicitarlo por escrito a la persona responsable de la Unidad que le ha estudiado.

Si su análisis genético es negativo, es decir, no se encuentra ningún tipo de mutación que suponga especial predisposición al cáncer, se le indicarán cuáles son las medidas de prevención a tomar y que dependerán de la existencia o no de casos de portadores de la mutación conocidos en su familia.

Si su análisis genético es positivo se le informará sobre el riesgo existente, así como de las alternativas de prevención disponibles en la actualidad.

En ocasiones se puede obtener un resultado que denominamos no informativo. Este tipo de resultados implica que no se conoce en la actualidad las repercusiones que ciertas alteraciones detectadas puede tener sobre el riesgo de padecer cáncer de colon.

*Continúa al dorso*

**04** *ES*

Cuando la existencia de la mutación en la familia ha sido confirmada, debe saber que otros miembros de su familia pueden haberla heredado: de usted (en caso de sus descendientes) o de sus antepasados (en caso de otros familiares como tíos o primos). La Unidad de Consejo Genético en ningún caso contactará con ellos por propia iniciativa para advertirles de esta circunstancia, ya que esta información es estrictamente confidencial. Es decisión personal suya informar a dichos familiares con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cuál es su riesgo individual con respecto a estos tumores.

De igual manera debe conocer que este tipo de pruebas pueden repercutir en su estado emocional y/o psicológico, tanto positiva como negativamente.

Si usted decide que no desea realizarse un estudio genético, sepa que su decisión será respetada en todo momento y recibirá el asesoramiento genético apropiado a su caso. De igual manera debe saber que existen modelos teóricos que permiten conocer de manera aproximada su riesgo de padecer determinados tipos de cáncer, los cuales podrían aplicársele si no desea realizarse este tipo de test.

Comentarios del médico que informa: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### AUTORIZACIÓN

Yo, \_\_\_\_\_, he sido informado oralmente y por escrito sobre las características, beneficios y problemas que plantea el estudio genético en el cáncer.

He comprendido esta información y cualquier duda surgida me ha sido aclarada por el médico.

Por lo anterior **OTORGO MI CONSENTIMIENTO** para que se proceda al estudio de factores genéticos predisponentes al cáncer sobre una muestra de sangre que me será extraída a tal efecto y análisis de tejido tumoral si ello fuera necesario.

Firma: \_\_\_\_\_ Firma tutor (caso de menor o incapacitado legalmente): \_\_\_\_\_ Firma Médico: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Autorizo para que las personas abajo indicadas puedan ser informadas sobre los resultados del estudio realizado.

Nombre \_\_\_\_\_ TF \_\_\_\_\_  
Nombre \_\_\_\_\_ TF \_\_\_\_\_  
Nombre \_\_\_\_\_ TF \_\_\_\_\_  
Nombre \_\_\_\_\_ TF \_\_\_\_\_

Fdo.: D. /D<sup>a</sup>

Fecha:

### REVOCACIÓN

En ejercicio del derecho que tengo de anular el consentimiento prestado manifiesto mi voluntad de revocarlo y solicito se proceda a la destrucción de las muestras sanguíneas extraídas y de la información de ellas obtenida.

Firma:

Fecha:

