



**INCIDÈNCIA I CARACTERÍSTIQUES DEL CÀNCER COLORECTAL
HEREDITARI NO POLIPOSIS A ESPANYA:
AVALUACIÓ D'ESTRATÈGIES PER A LA SEVA IDENTIFICACIÓ**

**Tesi presentada per Virgínia Piñol Sánchez per optar al grau de
Doctora en Medicina**

Directors:

Antoni Castells i Garangou

Josep Maria Piqué i Badia

Barcelona, febrer de 2006

AUTORITZACIÓ DEL DIRECTOR DE TESI

**EL DR ANTONI CASTELLS I GARANGOU, METGE CONSULTOR DEL
SERVEI DE GASTROENTEROLOGIA DE L'HOSPITAL CLÍNIC DE
BARCELONA,**

CERTIFICA:

Que la memòria que du per títol “Incidència i característiques del càncer colorectal hereditari no poliposi a Espanya: avaluació d’estratègies per a la seva identificació”, presentada per Virgínia Piñol Sánchez per optar al grau de Doctora en Medicina, ha sigut realitzada sota la meva direcció. Un cop finalitzada autoritzo la seva presentació per a ser jutjada per el tribunal corresponent.

**I per a que quedi constància als efectes oportuns, firmo la present a
Barcelona, a març de 2006.**

Dr Antoni Castells i Garangou

AUTORITZACIÓ DEL DIRECTOR DE TESI

**EL DR JOSEP MARIA PIQUÉ I BADIA, METGE CONSULTOR SENIOR DEL
SERVEI DE GASTROENTEROLOGIA DE L'HOSPITAL CLÍNIC DE
BARCELONA,**

CERTIFICA:

Que la memòria que du per títol “Incidència i característiques del càncer colorectal hereditari no poliposi a Espanya: avaluació d’estratègies per a la seva identificació”, presentada per Virgínia Piñol Sánchez per optar al grau de Doctora en Medicina, ha sigut realitzada sota la meva direcció. Un cop finalitzada autoritzo la seva presentació per a ser jutjada per el tribunal corresponent.

**I per a que quedi constància als efectes oportuns, firmo la present a
Barcelona, a març de 2006.**

Dr Josep Maria Piqué i Badia

Dedicada al meu avi

INDEX

| | |
|--|----------|
| • AGRAÏMENTS | pàgina15 |
| • PRESENTACIÓ | p21 |
| • AJUTS AL GRUP D'INVESTIGACIÓ | p23 |
| • ABREVIATURES | p25 |
| • ANTECEDENTS DEL TEMA | p27 |
| 1. Epidemiologia del càncer colorectal | p29 |
| 2. Càncer colorectal esporàdic | p33 |
| 2.1. Característiques clíniques | p33 |
| 2.2. Característiques moleculars | p34 |
| 3. Càncer colorectal familiar | p38 |
| 3.1. Característiques clíniques | p40 |
| 3.2. Característiques moleculars | p40 |
| 4. Poliposi adenomatosa familiar | p41 |
| 4.1. Característiques clíniques | p41 |
| 4.2. Característiques moleculars | p43 |
| 4.3. Estratègies de cribratge | p45 |
| 5. Càncer colorectal hereditari no poliposi | p46 |
| 5.1. Característiques clíniques | p46 |
| 5.2. Criteris diagnòstics | p47 |
| 5.3. Característiques moleculars | p48 |
| 5.4. Estratègia per a la identificació del CCHNP | p50 |
| 5.5. Estratègia de cribratge | p54 |
| 5.6. Tractament | p56 |
| 5.7. Vigilància post-resecció | p57 |

| | |
|--|-----|
| • JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE LA TESI | p59 |
| Justificació general | p61 |
| Justificació i objectius de l'estudi 1 | p63 |
| Justificació i objectius de l'estudi 2 | p65 |
| Justificació i objectius de l'estudi 3 | p67 |
| • PUBLICACIONS DERIVADES DE LA TESI DOCTORAL | p69 |
| • COMUNICACIONS A CONGRESSOS DERIVATS DE LA TESI DOCTORAL | p73 |
| • ARTICLES | p77 |
| Article 1 | p79 |
| Article 2 | p81 |
| Article 3 | p83 |
| • DISCUSSIÓ | p85 |
| • CONCLUSIONS | p95 |
| • BIBLIOGRAFIA | p99 |

AGRAÏMENTS

A en Toni Castells, per el seu continu suport, comprensió i positivisme encomanable. Ha sigut tot un plaer poder treballar amb una persona com tu.

A en Josep M^a Piqué, per haver-me donat l'oportunitat de treballar en un ambient de feina agradable. La seva capacitat de lideratge i templança són admirables.

A tots els membres del grup *EPICOLON*, i en especial a la Montse Andreu i l'Artemio Payá, sense ells aquesta tesi no existiria.

Als meus companys de despatx, Ignasi Elizalde i Francisco Rodríguez, amb els que he passat moltes bones estones. Gràcies pel vostre bon humor i manera d'entendre la vida.

A la resta de companys del servei de gastroenterologia, Faust Feu, Julià Panés, Salvador Navarro, Micky Sans i Josep Llach, per la seva amistat i ensenyances.

A les enfermeres, auxiliars i secretàries del servei i de la sala de gastro, amb les que he compartit 4 anys d'apasionants xerrades durant el cafè.

Als companys de beca, especialment a en Xavi Bessa, Sergi Castellví, Meritxell Mollà, Antonio Soriano, Maria Pellisé i Meritxell Gironella que m'han ajudat i aconsellat durant el temps que m'he dedicat a aquesta vessant de la professió. Hem tingut molts bons moments.

Als meus companys de residència, en especial a Mireia Peñalva, amb els que vaig compartir el dia a dia de 4 anys especials.

A tot el personal de l'Institut de Malalties Digestives, i en especial als de la UCI, amb qui vaig compartir moltes hores de guàrdia i entrepans.

Als meus nous companys de digestiu de l'Hospital Josep Trueta, Doroteo Acero, Montse Figa, Ferran Gonzàlez-Huix, Manoli Hombrados, Xavier Aldeguer, Esther Fort, Carme López, enfermeres i secretàries. És un plaer treballar amb vosaltres.

Als meus pares, que sempre han estat al meu costat, aconsellant-me i orientant-me, i alhora deixant-me fer el meu camí.

A la meua avia, germana i Jose amb qui sempre puc contar.

A la meua nombrosa família gallega, per la seva càlida acollida.

A en Jaime, en Iago i al que està en camí. Són la meua vida.

PRESENTACIÓ

La present Tesi Doctoral està estructurada seguint les directrius de la normativa per a la presentació de tesi doctorals com a compendi de publicacions, aprovada per el Consell del Departament de Medicina de la Universitat de Barcelona el 17 de maig de 1997.

Els estudis que formen aquesta Tesi Doctoral pertanyen a una mateixa línia d'investigació, dirigida a conèixer la incidència i característiques del càncer colorectal hereditari no poliposi a Espanya. Els resultats dels estudis han aportat informació rellevant i novedosa en aquest camp i han sigut recollits en 3 articles originals, publicats en revistes d'amplia difusió internacional amb un factor d'impacte global de 29 punts.

AJUTS PER A LA REALITZACIÓ DE LA TESI DOCTORAL

Els treballs que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han sigut efectuats amb el suport dels següents ajuts i beques personals i al grup d'investigació:

- Beca de l'Hospital Clínic de Barcelona per al projecte d'investigació "Alteració dels mecanismes implicats en la reparació dels errors de replicació de l'ADN a les formes familiars de càncer colorectal". Becària: Virgínia Piñol.
- Beca de Formació de Personal Investigador de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer per alumnes de tercer cicle de la Universitat de Barcelona. Becària: Virgínia Piñol.
- Beca de Fondo de Investigación Sanitaria FIS 01/0104-02 per al projecte "Utilidad del estudio del fenómeno de inestabilidad de microsatélites en el cribado del cáncer colorrectal hereditario". Investigador principal: Antoni Castells.
- Ajut de Merck Sharp & Dhome per al projecte "*Cox-2 expression in colorectal cancer exhibiting altered DNA mismatch repair mechanism*". Investigador principal: Antoni Castells.

ABREVIATURES

CCR: càncer colorectal

CCHNP: càncer colorectal hereditari no poliposi

PAF: poliposi adenomatosa familiar

APC: adenomatous polyposis coli

DCC: deleted in colorectal cancer

ADN: àcid desoxiribonucleòtid

TGF-beta: factor de creixement tumoral beta

COX-2: ciclooxigenasa 2

IHQ: immunohistoquímica

IMS: inestabilitat de microsatèl.lits

ANTECEDENTS DEL TEMA

1. Epidemiologia del càncer colorectal

El càncer colorectal (CCR) és una de les neoplàsies més freqüents als països occidentals. Al nostre país, el CCR és la segona neoplàsia més freqüent en homes i dones darrera del càncer de pulmó i de mama, respectivament. Si es consideren ambdós sexes conjuntament ocupa el primer lloc en incidència, estimant-se en torn a 19.000 nous casos per any, i representa la segona causa de mort per càncer¹. La supervivència ha millorat en els últims anys, sent la supervivència mitjana als 5 anys comparable a la dels països europeus (49,5% per càncer de còlon i 43% per a càncer de recte)². Malgrat aquests avanços, a Espanya el CCR causa aproximadament l'11% de les defuncions per càncer en homes i el 15% en dones³. Les taxes brutes de mortalitat per càncer de còlon i recte l'any 2000 varen ser 24,50 (4.726 defuncions) i 8,93 (1.722 defuncions) per 100.000, respectivament, en homes, i 19,97 (4.029 defuncions) i 5,72 (1.155 defuncions) per 100.000, respectivament, en dones³.

Els factors dietètics, hereditaris i l'estil de vida són factors etiològics reconeguts en el desenvolupament de CCR. En quant a la dieta, les primeres evidències del seu efecte sobre el desenvolupament del CCR deriven de la observació d'importants diferències en la incidència d'aquesta neoplàsia entre diverses àrees geogràfiques (augment en relació amb la dieta occidental). Malgrat la constatació d'aquest fet des de fa dècades, encara no ha sigut possible determinar de manera inequívoca quins aliments o nutrients en són els principals responsables. Tanmateix, diversos estudis mostren una associació inversa entre el consum de fibra, vegetals i fruita, i el risc de CCR⁴⁻⁷, mentre que es detecta una relació directa amb el consum de carn vermella⁸ i greixos⁹. En quant a l'estil de vida s'estima que l'exercici físic regular redueix el risc de

CCR en un 40%¹⁰, presentant el consum de tabac¹¹ i d'alcohol⁹ una relació directa amb el risc de desenvolupar CCR.

El paper dels factors heredo-familiars en el desenvolupament del CCR està ben establert, de manera que en funció d'aquesta característica podem classificar al CCR en 5 grups (figura 1): esporàdic, familiar, càncer colorectal hereditari no associat a poliposi (CCHNP), associat a poliposi adenomatosa familiar (PAF), i altres (principalment el CCR desenvolupat en el context d'una malaltia inflamatòria intestinal)¹²⁻¹⁴.

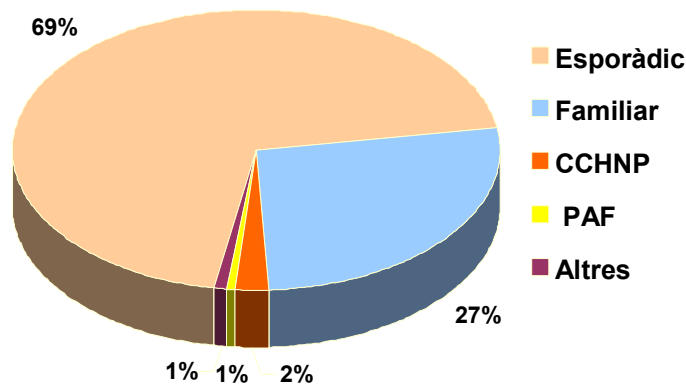


Figura 1. Classificació del CCR.

En la majoria de casos no existeix cap factor de risc associat, a excepció de que succeeix majoritàriament en individus d'edat superior a 50 anys, motiu pel qual s'anomena CCR esporàdic. Per altra banda, en aproximadament el 3% dels casos, aquest tumor apareix en el context d'una malaltia hereditària, en especial CCHNP, PAF o altres síndromes polipòsiques¹². En un percentatge menor de casos (inferior a l'1%), el CCR complica una malaltia inflamatòria intestinal de llarga evolució. Per últim, en una proporció encara no ben definida (10-30%), existeixen diversos graus d'agregació familiar d'aquesta neoplàsia,

encara que sense arribar a complir els criteris establerts per a les formes hereditàries esmentades prèviament^{13, 14}.

Malgrat que la PAF i el CCHNP representen una proporció reduïda del total de neoplàsies colorectals, tenen una gran importància des d'un punt de vista fisiopatològic, clínic i terapèutic¹². En primer lloc, els coneixements adquirits en relació als factors que participen en el desenvolupament d'aquestes malalties hereditàries han permès conèixer els mecanismes implicats en el CCR esporàdic, ja que alguns dels gens que es troben mutats a nivell germinal a la PAF i al CCHNP també tenen un paper clau en aquesta darrera situació¹⁵. En segon lloc, la identificació dels gens responsables ha permès establir el diagnòstic presimptomàtic dels individus portadors de mutacions en aquests gens i, per tant, en risc de desenvolupar la malaltia, amb la consegüent repercussió en les estratègies de cribratge¹⁶. Per últim, el diagnòstic molecular d'ambdues formes de CCR possibilita l'adopció de mesures terapèutiques més radicals, diferents de les emprades a les formes esporàdiques, la qual cosa hauria de tenir un impacte favorable en el pronòstic d'aquests malalts.

Independentment de la naturalesa hereditària o esporàdica, el desenvolupament del CCR contempla la seqüència adenoma-carcinoma¹⁵. Així, múltiples estudis epidemiològics i d'intervenció han permès caracteritzar la història natural d'aquesta neoplàsia, la qual s'origina a la majoria de casos a partir d'una lesió premaligna, l'adenoma o pòlip adenomatós¹⁷. Des d'un punt de vista fisiopatològic, a la actualitat està ben establert que existeixen dues vies patogèniques ben diferenciades¹⁸. La primera d'elles, coneguda com a via supressora o de inestabilitat cromosòmica, implicada en el desenvolupament

de la majoria de tumors esporàdics, comporta l'activació de determinants oncogèns (*K-ras*) i la inhibició de gens supressors (*DCC*, *APC*, *SMAD4*, *TP53*)¹⁵. L'acúmulo d'aquestes alteracions moleculars, independentment de l'ordre en que s'han adquirit, és el responsable de la transformació neoplàstica. A banda d'aquesta via, existeix un segon mecanisme que consisteix en l'acúmulo d'errors durant la replicació de l'ADN com a conseqüència de la presència de mutacions en gens responsables de la seva reparació (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, *hMSH6*)¹². Aquests errors s'acumulen de manera predominant en fragments repetitius d'ADN (microsatèl·lits) repartits al llarg de tot el genoma, el que comporta l'aparició de mutacions en diversos gens diana. Aquesta via mutadora o d'instabilitat de microsatèl·lits està implicada en el CCHNP i en el 15-20% dels CCR suposadament esporàdics¹².

2. Càncer colorectal esporàdic

El CCR esporàdic és aquell que es desenvolupa en individus sense cap antecedent familiar o personal de risc de CCR, i compren entre un 65% i 85% dels casos de CCR, segons les sèries¹²⁻¹⁴. En absència d'aquests antecedents, l'edat és la condició que més determina el risc de CCR, de manera que del total de pacients amb CCR més del 85% són diagnosticats després dels 60 anys^{19, 20}. El coneixement d'aquest fet és important a l'hora de dissenyar programes de prevenció del CCR, al considerar-se als individus majors de 50 anys sense cap altre factor de risc com a població de risc mitjà i tributària de seguir programes de cribratge (determinació de sang oculta en femta anual o bianual, realització d'una sigmoidoscòpia cada 5 anys o d'una colonoscòpia cada 10 anys)^{14, 19, 21-23}.

2.1. Característiques clíniques

L'edat de presentació habitual del CCR esporàdic oscil·la entre la sisena i vuitena dècada de la vida, a diferència de les formes hereditàries en les que el diagnòstic sol ser abans dels 50 anys.

El CCR no sol donar símptomes fins a fases avançades, el que condiciona que la majoria de pacients presentin tumors que han envaït tota la paret intestinal i/o han afectat els ganglis locoregionals. En funció de la localització del tumor la forma de presentació varia. Així, els tumors del còlon esquerre es manifesten en general en forma de rectorràgia i/o canvis en el ritme deposicional (restrenyiment o falsa diarrea), condicionats per la reducció de la llum del còlon, podent arribar a presentar un quadre d'obstrucció intestinal. Per altra banda, els tumors del còlon dret acostumen a causar

hemorràgia oculta i els símptomes referits per el pacient són els atribuïbles a l'anèmia crònica secundària.

Una complicació poc freqüent del càncer de còlon, però que empitjora el pronòstic és la perforació intestinal, la qual provoca una peritonitis fecal o la formació d'un abscess.

El càncer de recte pot comportar una síndrome anorectal, amb urgència rectal, tenesme i diarrea amb moc i sang. No és infreqüent l'emissió de femtes acintades. Quan la seva extensió supera els confins de la paret rectal, el pacient pot queixar-se de símptomes urinaris atribuïbles a invasió vesical.

A més dels símptomes locals, el CCR causa sovint símptomes generals, com astènia, anorèxia, pèrdua de pes o febre, i també poden aparèixer símptomes secundaris a la presència de metàstasi a distància.

2.2. Característiques moleculars

Estudis epidemiològics i d'intervenció han permès conèixer la història natural del CCR, havent-se establert que l'adenoma o pòlip adenomatós es una lesió premaligna que precedeix en la majoria d'ocasions a l'aparició del càncer²⁴, de manera que la seva extirpació redueix o fins i tot anul·la el risc de desenvolupar aquesta neoplàsia¹⁷. A banda de la seva importància clínica, la constatació de la seqüència adenoma-carcinoma ha sigut fonamental en la caracterització dels mecanismes moleculars que participen en el desenvolupament del CCR¹⁵. En aquest model seqüencial, el desenvolupament del CCR reflecteix l'activació de determinats oncògens (*K-ras*) i la inhibició de diversos gens supressors (*APC*, *SMAD4*, *DCC* i *TP53*)¹⁵ (figura 2). L'acúmul d'alteracions en aquests gens, independentment de l'ordre en que s'han

adquirit, és el responsable de la transformació i progressió neoplàstica¹⁵. Aquesta via es coneix com supressora o d'instabilitat cromosòmica, en contraposició a la via mutadora o d'instabilitat de microsatèl·lits, associada de forma característica al CCHNP.

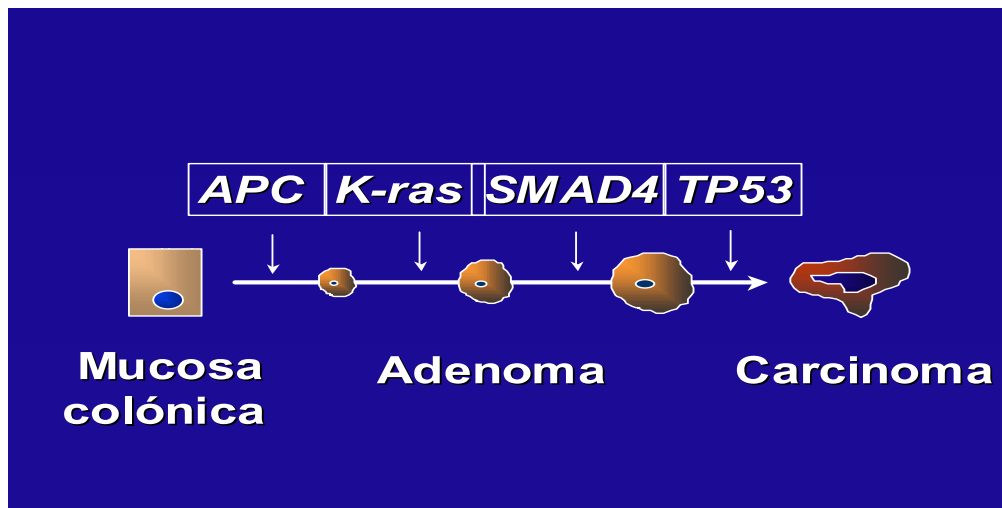


Figura 2. Model carcinogenètic implicat en el càncer colorectal esporàdic

La presència de mutacions en el gen *APC* constitueix un fenomen precoç i clau per al desenvolupament dels adenomes. Aquest gen participa en la regulació de la migració cel·lular a través de la interacció amb els microtúbuls, de l'adhesió cel·lular mediada per β -catenina i E-cadherina, i de la transducció de senyal Wingless-Wnt dependent de β -catenina. Així, la pèrdua o mutació d'*APC*, responsable de la degradació de β -catenina, comporta alteracions en la migració i adhesió de la cèl·lula, així com un increment de l'activitat transcripcional *Tcf* - *c-Myc* que indueix la proliferació cel·lular²⁵.

A banda de l'activació de la via APC- β -catenina-Tcf, la progressió des d'adenoma fins carcinoma requereix l'acúmulo d'altres canvis genètics o

cromosòmics. Entre les diferents mol·lècules implicades destaca el proto-oncogen *K-ras*. La proteïna codificada per aquest gen, *p21*, pot trobar-se en dos estats funcionals segons el grau de fosforilització. La forma activa (p21-GTP) afavoreix l'activació de la cascada MAP quinasa, que té per finalitat promoure la síntesi de ADN. Aquesta funció està regulada per la seva activitat GTPasa intrínseca, la qual afavoreix el retorn a la forma inactiva (p21-GDP). La presència de mutacions en el gen *K-ras* comporta l'activació permanent de p21, el que incrementa la transducció de senyal que resultarà en un augment de l'activitat proliferativa de la cèl·lula.

Una alteració cromosòmica molt freqüent en el CCR és la presència de pèrdues al·lèliques en el braç llarg del cromosoma 18²⁶. L'observació de delecions al·lèliques en un determinat cromosoma és suggestiu de la presència d'un gen supressor, els quals habitualment requereixen la inactivació de les dues còpies per a perdre la seva funcionalitat. Mitjançant anàlisis de pèrdua d'heterozigositat, ha sigut possible identificar dos gens, *DCC* i *SMAD4*, els quals poden estar implicats en la patogènia del CCR. En relació al gen *DCC* –*deleted in colon cancer*–, s'ha comprovat que la manca d'expressió de la proteïna que codifica es correlaciona amb una menor probabilitat de supervivència en malalts afectes de CCR. Per altra banda, el gen *SMAD4* codifica una proteïna que participa en la mediació intracel·lular de la resposta al TGF- β . Estudis realitzats amb animals deficients han demostrat que la pèrdua aïllada de *SMAD4* no indueix l'aparició de tumors intestinals, però que quan aquesta s'associa a la pèrdua d'APC es desenvolupen adenomes que malignitzen fàcilment. TGF- β és una família de petits polipèptids amb diverses funcions en el creixement i desenvolupament cel·lular. La resposta de la cèl·lula

al TGF- β depèn de receptors específics localitzats a la superfície cel·lular (RI i RII). La presència de mutacions en el gen *RII* (presentes en el 20% dels CCR) o *SMAD4*, responsable d'alguns casos de poliposi juvenil, comporta que la cèl·lula s'escapi del control negatiu exercit pel TGF- β sobre la proliferació cel·lular²⁷.

El gen supressor *TP53* està localitzat al braç curt del cromosoma 17. La proteïna codificada per aquest gen, p53, inhibeix el creixement cel·lular actuant com a factor de transcripció, de tal manera que promou la transcripció de gens que codifiquen proteïnes amb activitat supressora. Així, en el moment que es produeix una lesió de l'ADN hi ha un ràpid increment del nivells de p53, el que comporta l'aturada del cicle cel·lular en fase G₁, donant temps a la cèl·lula per a que repari el dany genètic. Quan la reparació no és possible, p53 indueix apoptosi. Les cèl·lules amb mutacions o pèrdues al·lèliques de *TP53* no poden dur a terme aquestes funcions, per la qual cosa són incapaces d'aturar el procés neoplàstic²⁸.

Per últim, és important fer constar que probablement existeixen altres gens involucrats en la patogènia del CCR esporàdic. De fet, diversos estudis han demostrat la presència de pèrdues d'heterozigositat en altres cromosomes (8p, 5q, 22q), el que suggereix la possible participació d'altres gens supressors avui per avui desconeguts^{29, 30}.

3. Càncer colorectal familiar

Estudis de cohorts i de casos i controls indiquen que els individus amb familiars de primer grau afectes d'adenoma o CCR tenen un risc de desenvolupar aquesta neoplàsia superior al de la població general, així com de patir-la més precoçment¹³. Aquest subgrup, al que s'anomena *CCR familiar* per així distingir-lo de les formes inequívocament hereditàries, representa el 25-30% del total de casos de càncer de còlon i de recte¹²⁻¹⁴.

L'edat de diagnòstic del CCR i el nombre de familiars afectes són les variables que s'han vist associades a un major risc de presentar un CCR en els diferents estudis³¹⁻³⁵. La revisió de Burt¹³ analitza el risc de CCR tenint en compte el nombre de familiars afectes i l'edat (Taula 1) i els agrupa segons el risc associat (Taula 2).

Taula 1. Risc de càncer colorectal en funció del nombre de familiars afectes i de l'edat de diagnòstic del cas índex.

| <i>Estudi</i> | <i>OR pel risc de CCR amb 1 familiar de primer grau afecte</i> | <i>OR pel risc de CCR amb 2 familiars de primer grau afectes</i> | <i>OR pel risc de CCR en familiars en funció de l'edat de diagnòstic del cas índex</i> |
|----------------|--|--|--|
| St John et al. | 1,8 (1,2-2,7) | 5,7 (1,7-19,3) | <45 anys: 3,7 (1,5-9,1) |
| Fuchs et al. | 1,72 (1,34-2,19) | 2,75 (1,34-5,63) | <45 anys: 5,4 (1,9-14,6) |
| Ahsan et al. | 1,74 (1,24-2,45) | - | <50 anys: 4,4 (2,2-8,5) |

Taula 2. Risc familiar de càncer colorectal

| <i>Situació familiar</i> | <i>Risc acumulat de CCR</i> |
|--|-----------------------------|
| Risc en població general (EE.UU.) | 6% |
| Un familiar de primer grau ^a amb CCR | 2-3 vegades ^d |
| Dos familiars de primer grau amb CCR | 3-4 vegades ^d |
| Un familiar de primer grau amb CCR diagnosticat ≤ 50 anys | 3-4 vegades ^d |
| Un familiar de segon ^b o tercer ^c grau amb CCR | ~1,5 vegades ^d |
| Dos familiars de segon grau amb CCR | ~2-3 vegades ^d |
| Un familiar de primer grau amb adenoma colorectal | ~2 vegades ^d |

^aFamiliars de primer grau: pares, germans i fills

^bFamiliars de segon grau: avis, oncles i nebots

^cFamiliars de tercer grau: besavis i cosins

^dIncrement respecte al risc de la població general

Així, s'ha descrit de manera constant que el risc de desenvolupar CCR en individus amb familiars de primer grau afectes d'aquesta neoplàsia és 2-3 vegades superior al de la població general¹³. Un estudi prospectiu demostra que el risc de CCR en individus amb un familiar de primer grau afecte de CCR és, aproximadament, el mateix a l'edat de 40 anys que el de la població general a l'edat de 50 anys³¹.

La presència de familiars de segon (avis, tiets i nebots) o tercer (besavis i cosins) grau afectes de CCR també s'ha vist associada a un increment discret del risc d'aquesta neoplàsia³⁶.

3.1. Característiques clíniques

A banda de la història familiar, fins el moment no existeix cap paràmetre clínic que permeti identificar als individus amb CCR familiar. La importància de caracteritzar, mitjançant la realització d'arbres genealògics i recollida sistemàtica de tots els antecedents familiars de CCR o altres neoplàsies relacionades, els llinatges afectes de CCR familiar radica en la possibilitat de poder oferir-els-hi mesures preventives específiques. Aquestes mesures inclourien, entre altres, programes de cribratge més agressius que els proposats a la població general (ja sigui per la periodicitat i/o l'edat d'inici dels mateixos)^{13, 19, 37}, consell genètic quan s'hagin caracteritzat els gens implicats, o l'administració d'agents quimioprolifèctics.

3.2. Característiques moleculars

A l'actualitat, no es coneix el mecanisme responsable d'aquesta agregació familiar, encara que probablement constitueix un trastorn genètic complex o multifactorial. En ell, la càrrega genètica (mutacions o polimorfismes) definiria la susceptibilitat per a la transformació neoplàstica, mentre que els factors ambientals modularien la mateixa. En quant a les anomalies genètiques que podrien ser responsables d'aquesta entitat, existeixen múltiples possibilitats. Així, a banda de mutacions poc penetrants en els gens responsables de la PAF i del CCHNP³⁸, podrien estar implicats polimorfismes de gens involucrats en diversos processos intracel·lulars (metabolisme de carcinògens, metilació de l'ADN, modificadors microambientals, metabolisme de fàrmacs, gens supressors de tumor i oncogens, entre d'altres)³⁸, etc.

4. Poliposi adenomatosa familiar

La PAF és una malaltia hereditària autosòmica dominant causada per una mutació germinal del gen *APC* (*adenomatous polyposis coli*), que es caracteritza per la presència de múltiples pòlips adenomatosos colònics amb elevat risc de transformació neoplàstica. La seva incidència s'estima en un cas per 10.000-20.000 habitants i afecta ambdós sexes per igual, representant menys de l'1% del total de casos de CCR. Aproximadament un terç dels casos de PAF són deguts a mutacions *de novo* del gen *APC*, mancant en aquests individus, per tant, història familiar.

4.1. Característiques clíniques

Des d'un punt de vista fenotípic, es caracteritza per la presència de nombrosos pòlips adenomatosos (més de 100) distribuïts al llarg del budell gros (figura 3) i que acostumen a aparèixer a la segona dècada de la vida. Aquesta malaltia presenta un alt potencial de malignització, de tal manera que si no s'efectua tractament quirúrgic, la pràctica totalitat de malalts desenvoluparan un CCR abans dels 50 anys. El diagnòstic sol efectuar-se entre la segona i la quarta dècades de la vida. Sovint els pacients presenten manifestacions extraintestinals, entre les que destaquen adenomes gastroduodenals, hipertròfia pigmentària de la retina o tumors desmoides, situació que es coneix com síndrome de Gardner^{12, 13, 24}.

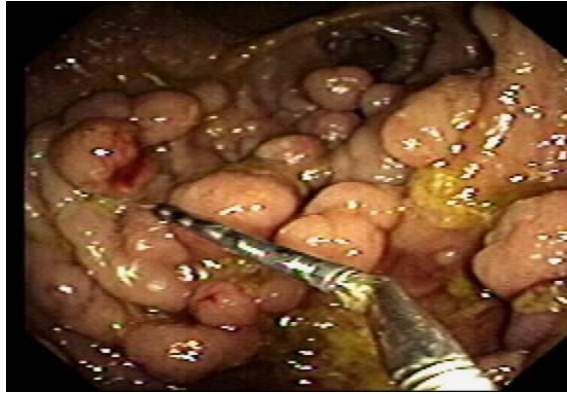


Figura 3. Visió endoscòpica de pòlips en la PAF

El tractament de la PAF és quirúrgic, ja sigui mitjançant proctocolectomia total amb reservori, o colectomia subtotal amb preservació del recte i anastomosi ileorectal¹². La selecció d'una tècnica quirúrgica depèn fonamentalment de les manifestacions de l'individu o de la família, recomanant-se la colectomia total en la majoria de pacients i reservant la subtotal per aquells casos en els que existeixen pocs pòlips en el recte i el fenotip familiar és lleu, o per a les formes atenuades³⁹. Tanmateix, alguns estudis suggereixen que la localització de les mutacions podria contribuir a decidir el tipus d'intervenció. Així, estaria indicat realitzar una colectomia subtotal quan les mutacions estiguessin localitzades en els codons 0-200 o posteriors als 1500, mentre que altres autors recomanarien posposar la colectomia quan les mutacions es troben entre els codons 1445 i 1580 degut a l'elevat risc de desenvolupar tumors desmoides després de la intervenció^{40, 41}.

En els darrers anys, s'ha demostrat que els adenomes del pacients amb PAF presenten sobreexpressió de ciclooxigenasa 2 (COX-2), la isoforma induïble d'aquest enzim el qual participa en el metabolisme de les prostaglandines⁴². Paral·lelament, s'ha observat que la utilització d'antiinflamatoris no esteroïdals redueix el nombre de pòlips que presenten

aquests pacients⁴². Aquests resultats també s'han observat amb la utilització d'inhibidors específics de COX-2⁴³, mentre que estudis experimentals amb ratolins deficientes per a *APC* (*APC^{Min}* o *APC^{Δ716}*) i per a COX-2 han confirmat la importància patogènica d'aquest isoenzima i el potencial efecte beneficiós d'aquests fàrmacs⁴². No obstant, la utilització d'inhibidors selectius de COX-2 està limitada als pacients tractats quirúrgicament amb preservació del recte, per tal d'evitar l'aparició de nous pòlips en aquest segment⁴².

4.2. Característiques moleculars

L'any 1991, mitjançant estudis de lligament genètic i posterior clonatge posicional, va ser possible identificar el gen responsable d'aquesta entitat, *APC-adenomatous polyposis coli*-, localitzat al braç llarg del cromosoma 5⁴⁴.

El gen *APC* juga un paper clau en la regulació de la migració cel·lular a través de la interacció amb els microtúbuls, de l'adhesió cel·lular mediada per β -catenina i E-cadherina, i de la transducció de senyal dependent de la via Wntless-Wnt. Així, la pèrdua o mutació d'*APC*, responsable de la degradació de β -catenina, comporta alteracions en la migració i adhesió de la cèl·lula, així com un increment de l'activitat transcripcional *Tcf-c-Myc* que indueix la proliferació cel·lular^{25, 45}.

La presència de mutacions germinals en el gen *APC* ha permès el diagnòstic molecular de la malaltia i, consegüentment, la seva aplicació en el cribratge familiar de la mateixa⁴⁵. La distribució de les mutacions en *APC* és molt heterogènia, encara que la majoria introdueixen prematurament un codó de finalització, el que resulta en la síntesi d'una proteïna truncada. Per altra banda, existeix una bona correlació genotip-fenotip, de tal manera que la

localització de la mutació condiona l'espectre clínic de la malaltia^{46, 47}. En aquest sentit, s'ha descrit una variant anomenada *PAF atenuada* la qual es caracteritza per un inici més tardà i un menor nombre de pòlips localitzats de manera preferent en el còlon dret, i que s'associa a mutacions en l'extrem 5' o 3' del gen *APC*. Els casos amb major nombre de pòlips habitualment s'associen a mutacions entre els codons 1285 i 1465, el desenvolupament d'hipertròfia pigmentària de la retina a mutacions en els codons 542-1309, i l'aparició de múltiples manifestacions extracolòniques a mutacions en els codons 1465, 1546 i 2621, tal i com es mostra a la Figura 4. Per últim, els malalts en els que no es possible detectar mutacions en *APC* (20-40%) presenten un fenotip molt més lleu, tant pel que fa a les manifestacions extracolòniques com en relació al número de pòlips en el còlon⁴⁸. Aquests darreres dades, així com les importants diferències fenotípiques entre les famílies afectes suggereix la possible existència d'altres gens implicats que exerceixin un paper modificador⁴⁹.

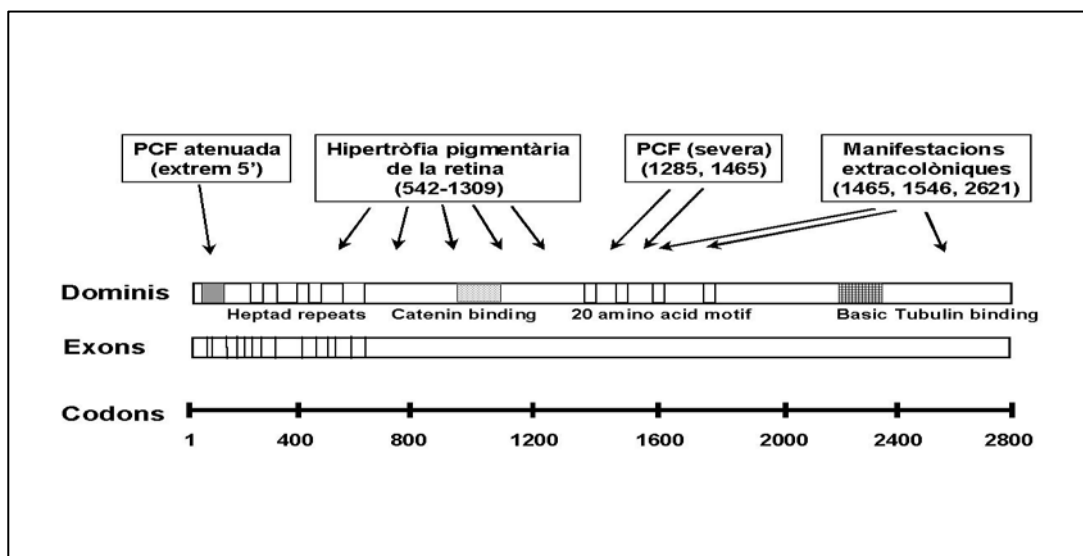


Figura 4. Correlació genotip-fenotip a la poliposi adenomatosa familiar

Les tècniques emprades en el diagnòstic molecular són l'anàlisi de lligament i la prova de la proteïna truncada. L'anàlisi de lligament es realitza en famílies amb PAF mitjançant marcadors altament polimòrfics del gen *APC* (microsatèl·lits) i permet establir l'haplotip lligat a la malaltia sense identificar la mutació causant. La tècnica molecular que s'utilitza majoritàriament per detectar les mutacions germinals en els pacients de PAF i les seves variants es la prova de la proteïna truncada⁵⁰.

4.3. Estratègia de cribratge

L'estratègia recomanada per al cribratge de la PAF es basa en mesures de consell genètic que inclouen la realització de l'anàlisi mutacional del gen *APC* i l'assessorament als familiars en relació a risc que comporta la malaltia, la importància que té el seguiment i la transcendència que pot tenir el resultat de la prova genètica^{45, 46}. En els individus portadors de mutacions o en aquells en els que no ha estat possible determinar la seva presència, el cribratge contempla la pràctica d'una sigmoidoscòpia anual. Si s'estableix el diagnòstic de poliposi, a banda d'indicar el tractament quirúrgic, cal fer un estudi d'extensió que inclogui fibrogastroscòpia, ortopantomografia i estudi del fons d'ull per tal de descartar la presència de manifestacions extracolòniques.

5. Càncer colorectal hereditari no poliposi

El CCHNP o síndrome de Lynch és una malaltia hereditària amb patró autosòmic dominant deguda a mutacions germinals en els gens reparadors de l'ADN. Malgrat tractar-se de la forma de CCR hereditari més freqüent, en la actualitat s'accepta que aquesta entitat representa entre l'1% i el 5% del total de casos de CCR^{51, 52}. S'ha de tenir present que existeixen importants variacions en relació a l'estimació de la seva incidència fruit del limitat nombre d'estudis poblacionals i, probablement, de diversitats geogràfiques. No obstant, el factor més determinant per a les discordances en quant a la seva freqüència de presentació és la dificultat per a establir-ne la seva definició i, consegüentment, el seu diagnòstic.

5.1. Característiques clíniques

El CCHNP es caracteritza pel desenvolupament precoç de CCR, habitualment abans dels 50 anys d'edat, localitzar-se preferentment al còlon dret, i tenir una elevada tendència a presentar neoplàsies sincròniques o metacròniques, bé en el propi còlon i recte o en altres òrgans (endometri, estómac, sistema urinari, ovari, vies biliars, budell prim^{53,54}). Menys freqüentment, poden presentar-se tumors cerebrals (glioblastomes) o cutanis (queratoacantomes, adenomes sebàcics o adenocarcinomes sebàcics), combinacions que reben el nom de síndrome de Turcot i síndrome de Muir-Torre, respectivament, i constitueixen variants del CCHNP⁵⁵.

Histològicament, el CCR presenta unes característiques relativament constants, donat que es tracten de tumors amb abundant presència de moc, pobrament diferenciats i amb infiltració limfocitària^{12, 56, 57}.

5.2. Criteris diagnòstics

El diagnòstic clínic de CCHNP s'estableix a partir de la història familiar, i la seva definició es basa en els criteris establerts a la reunió d'Amsterdam⁵⁸ (Taula 3).

Taula 3. Criteris de Amsterdam

- Tres o més familiars afectes de CCR, un d'ells familiar de primer grau dels altres dos, i
 - Dos o més generacions successives afectes, i
 - Un o més familiars afectes de CCR diagnosticat abans dels 50 anys d'edat, i
 - Exclusió de la PAF en els casos de CCR.
-

Darrerament, s'han ampliat els criteris diagnòstics per augmentar la seva sensibilitat, donant més protagonisme a les neoplàsies extracolòniques (criteris d'Amsterdam II)⁵⁹ (Taula 4).

Taula 4. Criteris de Amsterdam II

- Tres o més familiars afectes d'una neoplàsia associada al CCHNP (CCR, càncer d'endometri, budell prim, urèter o pelvis renal), un d'ells familiar de primer grau dels altres dos, i
 - Dos o més generacions successives afectes, i
 - Un o més familiars afectes de CCR diagnosticat abans dels 50 anys d'edat, i
 - Exclusió de la PAF en els casos de CCR.
-

5.3. Característiques moleculars

El CCHNP és conseqüència de la presència de mutacions germinals en els gens reparadors dels errors de replicació de l'ADN. Fins al moment actual es coneixen 5 gens que formen part d'aquesta maquinaria reparadora: *MSH2* localitzat a la regió cromosòmica 2p16, *MLH1* localitzat a la regió cromosòmica 3p21, *PMS1* i *PMS2* localitzats a les regions cromosòmiques 2q31 i 7q11, respectivament, i *MSH6* localitzat a la regió cromosòmica 2p16. Es coneixen unes 300 mutacions germinals en aquests gens que predisposen a CCHNP, de les quals un 59% és troben en el gen *MLH1* i un 38% en el gen *MSH2*, éssent rares les mutacions a la resta de gens^{53, 54}.

Des del punt de vista molecular, el malfuncionament del sistema de reparació d'errors de replicació de l'ADN es tradueix en l'acúmul de mutacions somàtiques a dos nivells. Per una banda, a nivell de microsatèl·lits, que són petits fragments repetitius d'ADN distribuïts al llarg de tot el genoma^{60, 61} i majoritàriament localitzats en ADN intrònic i que, per tant, la seva afectació presumiblement no té un significat patològic. El fenomen d'instabilitat de microsatèl·lits (figura 5) constitueix un marcador fenotípic del CCHNP¹⁶, estant present en més del 95% de CCR en pacients amb CCHNP, mentre que tan sols el presenten un 15% dels tumors de pacients amb CCR esporàdic¹⁶.

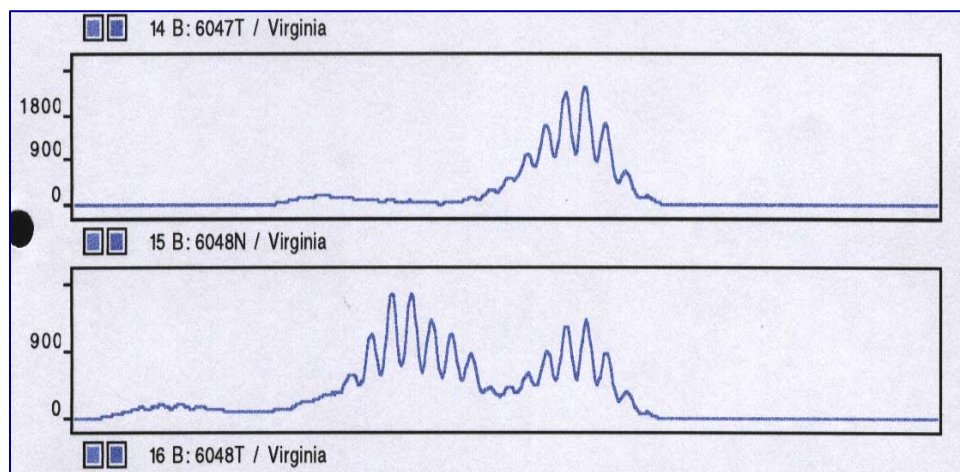


Figura 5. Anàlisi del fenomen d'inestabilitat de microsatèl·lits mitjançant el marcador *BAT-26*. El cas que es presenta correspon a un tumor inestable.

Per altra banda, la segona conseqüència del malfuncionament del sistema de reparació d'errors de replicació de l'ADN és l'afectació d'unitats repetitives de l'ADN incloses dins els marcs de lectura de diferents gens (*TGF- β* , *IGFR11*, *BAX*, entre d'altres), alguns dels quals juguen papers fonamentals a la regulació del creixement, diferenciació o mort cel·lular^{57, 61} i, per tant, a l'oncogènesi.

En condicions normals, la reparació d'aquests errors de replicació de l'ADN (errors d'aparellament i petites insercions o delecions d'una o dues bases) s'inicia per la unió d'heterodímers MSH2-MSH6 al fragment danyat (figura 6). Aquesta primera fase va seguida per un canvi conformacional d'aquestes mol·lècules, el que facilita la unió del complex MLH1-PMS2. Posteriorment, és produeix l'escissió de la cadena d'ADN afecta i la síntesi

d'una de nova. Quan s'han de reparar insercions/delecions més llargues, probablement intervén el complex MSH2-MSH3⁶¹.

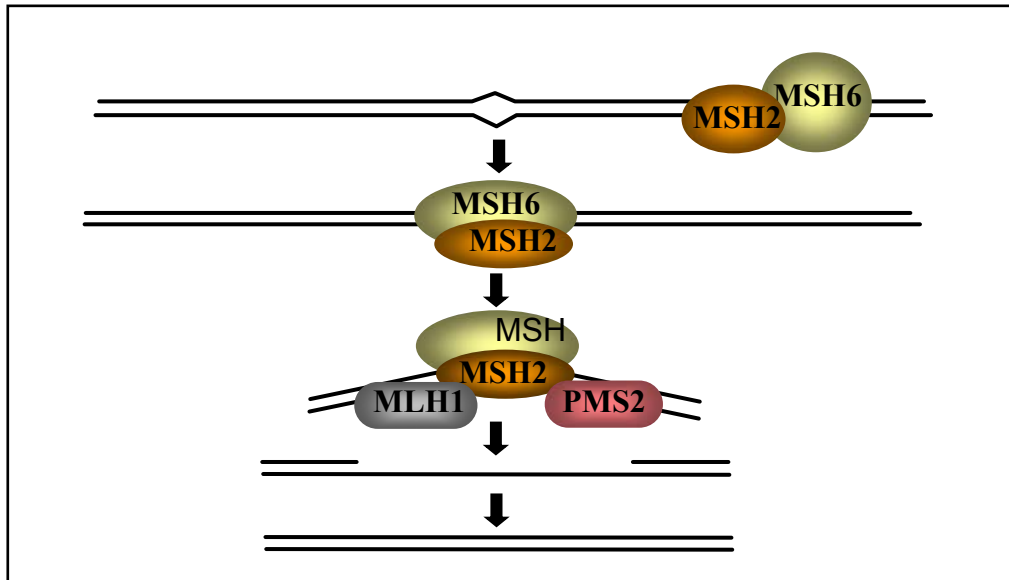


Figura 6. Mecanisme de reparació dels errors de replicació de l'ADN.

5.4. Estratègia per a la identificació del CCHNP

L'estratègia diagnòstica acceptada a l'actualitat per a la identificació dels pacients afectes de CCHNP consisteix en la detecció del fenomen d'instabilitat de microsatèl·lits en el si del tumor. Aquesta es basa en el fet de que més del 95% dels pacients amb CCHNP presenten aquesta alteració¹⁶. En aquest sentit, la detecció d'instabilitat de microsatèl·lits a nivell del tumor tradueix una deficiència en el sistema de reparació de l'ADN i, per tant, fa sospitar l'existència d'una mutació en els gens responsables.

Una alternativa a la detecció del fenomen d'instabilitat de microsatèl·lits seria la immunohistoquímica per a les proteïnes codificades pels gens reparadors esmentats (figura 7). Així, la manca d'expressió d'alguna de elles és

indicativa de la presència de mutacions en el corresponent gen codificant. Per altra banda, s'ha de tenir present que la falta d'expressió d'aquestes proteïnes també pot ser deguda a mecanismes epigenètics, com és la metilació de promotors dels gens reparadors, principalment *MLH1*, mecanisme que explicaria la presència d'instabilitat de microsatèl·lits en alguns casos de CCR esporàdic.

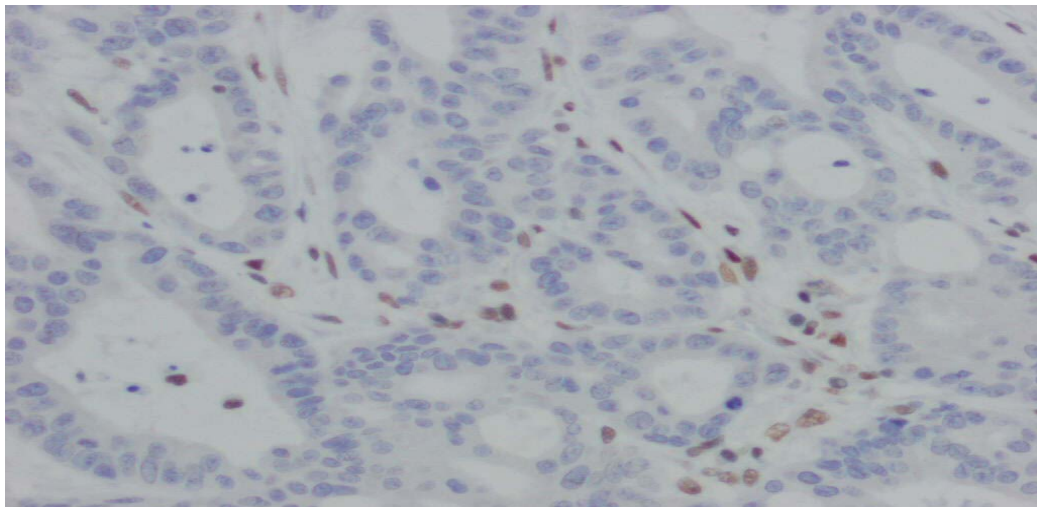


Figura 7. Estudi immunohistoquímic d'expressió de proteïnes reparadores d'errors de replicació de l'ADN. El cas que es presenta correspon a un tumor on hi ha manca d'expressió de MLH1.

Finalment, la prova diagnòstica del CCHNP és la detecció de mutacions germinals en algun dels gens reparadors, la qual cosa es realitza mitjançant tècniques moleculars diverses que inclouen SSCP (*single-strand conformation polymorphism*), DHPLC o seqüenciació directa.

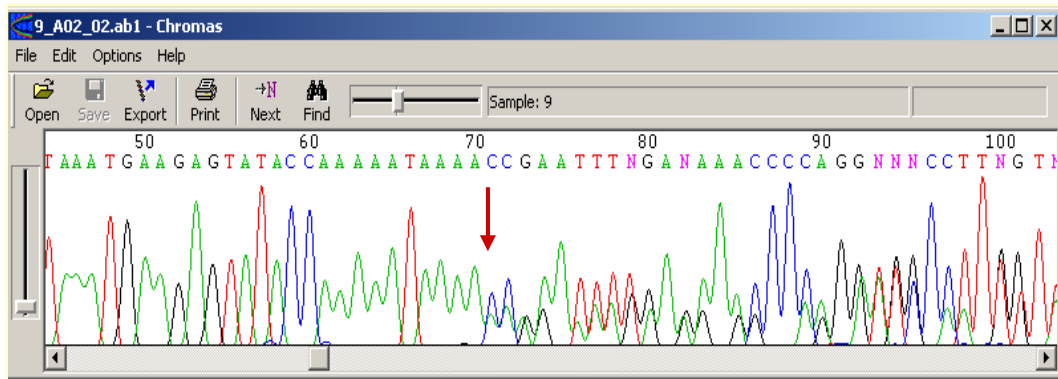


Figura 8. Estudi de seqüenciació directa. El cas mostra una mutació a l'exó 11 de *MSH2*.

La majoria de pacients (45%-65%) que compleixen els criteris d'Amsterdam de CCHNP presenten mutacions germinals en alguns dels gens reparadors de l'ADN⁶². Malgrat això, en una proporció no despreciable de famílies que compleixen aquests criteris o que tenen una marcada història familiar de CCR no és possible identificar aquestes mutacions⁶³⁻⁶⁵. Contràriament, famílies que no compleixen els criteris d'Amsterdam poden presentar mutacions germinals en aquests gens^{66, 67}. Aquestes situacions indicarien que, per una banda, probablement existeixen altres gens responsables de corregir errors de replicació de l'ADN desconeguts fins el moment i que, per altra, els criteris clínics no són suficientment sensibles per a detectar totes les famílies amb CCHNP.

Com s'ha comentat, el diagnòstic clínic del CCHNP es basa en els criteris d'Amsterdam II, però la baixa sensibilitat d'aquests ha dut a establir uns criteris menys restrictius que permetin identificar una proporció major de pacients afectes de CCHNP. Aquests criteris, establerts a Bethesda⁶⁸ (taula 5), varen ser desenvolupats per identificar pacients amb una elevada probabilitat

de patir un CCHNP, als quals estaria indicat determinar la presència del fenomen d'instabilitat de microsatèl·lits en el si del tumor. En els pacients amb instabilitat de microsatèl·lits hauria d'investigar-se la presència de mutacions en els gens reparadors de l'ADN⁶⁸.

Taula 5. Criteris de Bethesda

- Pacients amb CCR que pertanyen a famílies que compleixen els criteris d'Amsterdam
 - Pacients amb dos neoplàsies associades al CCHNP, incloent CCR sincrònic o metacrònic i càncer extracolònic (endometri, ovari, gàstric, hepatobiliar, budell prim, urèter o pelvis renal)
 - Pacients amb CCR i un familiar de primer grau amb CCR, neoplàsia extracolònica associada al CCHNP o adenoma colorectal; un dels càncers diagnosticat abans dels 45 anys d'edat o l'adenoma abans dels 40 anys d'edat
 - Pacients amb CCR o càncer d'endometri diagnosticat abans dels 45 anys d'edat
 - Pacients amb CCR localitzat al còlon dret i histològicament indiferenciat diagnosticat abans dels 45 anys d'edat
 - Pacients amb CCR tipus cèl·lules en anell de segell (format per més del 50% de cèl·lules en anell de segell) diagnosticat abans dels 45 anys de edat
 - Pacients amb adenoma colorectal diagnosticat abans dels 40 anys de edat
-

S'ha suggerit que l'anàlisi previ de la presència d'instabilitat de microsatèl·lits podria obviar-se en aquells pacients que compleixen algun dels

tres primers criteris de Bethesda (Taula 5)⁶⁹. En aquests pacients, donat la major probabilitat de presentar mutacions en els gens implicats en el CCHNP, podria efectuar-se l'anàlisi mutacional directament.

Recentment, el *National Cancer Institute* ha revistat els criteris de Bethesda, proposant unes noves recomanacions per a la selecció dels pacients en els que s'hauria de descartar la presència de mutacions germinals en els gens responsables del CCHNP. Aquests criteris es coneixen com *Criteris de Bethesda revisats*⁷⁰ (Taula 6)

Taula 6. Criteris de Bethesda revisats

- Pacients amb CCR diagnosticat abans dels 50 anys.
 - Pacients amb CCR sincrònic o metacrònic o amb una altra neoplàsia associada al CCHNP (endometri, estómac, ovari, pàncrees, vies urinàries, cervell, budell prim) amb independència de l'edat.
 - Pacients amb CCR amb infiltració limfocitària, cèl.lules en anell de segell o creixement medular diagnosticat abans dels 60 anys.
 - Pacients amb un o més familiars de 1er grau amb una neoplàsia associada al CCHNP diagnosticada abans dels 50 anys.
 - Pacients amb dos o més familiars de 1er o 2on grau amb una neoplàsia associada al CCHNP, amb independència de l'edat.
-

5.5. Estratègia de cribratge

L'anàlisi genètic dels gens reparadors de l'ADN permet el diagnòstic presimptomàtic dels familiars en risc^{16, 71, 72}. Així, aquesta anàlisi mutacional hauria d'oferir-se als familiars de primer grau (pares, germans i fills) d'individus

portadors d'una mutació germinal en alguns d'aquests gens. Amb aquesta estratègia s'aconsegueix optimitzar la relació cost-eficàcia del cribratge del CCHNP⁷³, de manera que el seguiment endoscòpic pot centrar-se únicament en aquells membres portadors de mutacions.

El seguiment colonoscòpic en el CCHNP està dirigit a la identificació i ressecció de pòlips adenomatosos, així com a la detecció de carcinomes en fases inicials del seu desenvolupament¹⁹. En els darrers anys s'ha demostrat que la vigilància periòdica mitjançant colonoscòpies millora el pronòstic dels individus pertanyents a famílies amb criteris de CCHNP, al haver-se demostrat que la realització en individus que pertanyen a famílies amb CCHNP d'una colonoscòpia cada 3 anys durant un període de 15 anys s'associa a una disminució del 62% en la incidència de CCR ($p=0,02$) i del 66% en la mortalitat global ($p=0,003$) en relació amb la no realització de cribratge⁷⁴. L'interval idoni entre exploracions no està ben establert, encara que el fet que alguns estudis hagin descrit la aparició de CCR als dos o tres anys d'haver-se realitzat una colonoscòpia negativa⁷⁴⁻⁷⁶ i la més ràpida progressió des d'adenoma a carcinoma en el CCHNP⁵⁴ justificaria un interval d'1 ó 2 anys entre exploracions. Encara que sense evidències directes es recomana iniciar el cribratge endoscòpic a partir dels 20-25 anys o 10 anys abans de l'edat de diagnòstic del CCR en el familiar afecte més jove, escollint la opció més precoç^{16, 71, 77}.

En quant a les neoplàsies extracolòniques associades al CCHNP en individus portadors de mutacions en els gens responsables, el registre de càncer de Finlàndia ha permès establir la seva incidència: 60% per el càncer d'endometri, 13% per al d'estómac, 12% per al d'ovari, 4% per al de vies

urinàries, 3,7% per al cerebral, 3,3% per al de pelvis renal, i 2% per al de vies biliars⁷⁸. Tant els individus que han desenvolupat CCR como els familiars en risc tenen una major probabilitat de presentar una neoplàsia extracolònica, el que podria justificar el cribratge de les mateixes⁷⁹. Malgrat tot, a diferència del que succeeix en relació amb el CCR, no està demostrada la eficàcia d'aquestes estratègies^{23, 68, 80}, encara que s'assumeix que el benefici podria ser major en aquelles famílies en les que existeix una major agregació d'una determinada neoplàsia extracolònica⁷⁹. Al ser el càncer d'endometri la neoplàsia extracolònica més freqüent, la majoria de grups recomanen la realització d'una ultrasonografia pèlvica anual o bianual a partir dels 25-35 anys d'edat^{23, 79}.

En resum, les recomanacions actuals en els pacients pertanyents a famílies amb criteris de CCHNP contemplen la realització de l'anàlisi mutacional dels gens *hMSH2* i *hMLH1*^{16, 70}. En els individus portadors de mutacions o en aquells casos en els que no és possible determinar-ne la seva presència, estarà indicat el cribratge endoscòpic. A més, en funció del predomini de neoplàsies d'un altre origen en el si d'una determinada família, és convenient efectuar altres exploracions dirigides a descartar la seva presència.

5.6. Tractament

Donat que els pacients amb CCHNP presenten un risc incrementat de desenvolupar tumors metacrònics¹⁹, tenen una ràpida progressió des d'adenoma a carcinoma⁵⁴ i que en moltes ocasions el carcinoma s'origina en lesions planes difícils de tractar endoscòpicament⁸¹, alguns grups recomanen la realització d'una resecció extensa (colectomia total o proctocolectomia) per al tractament de les neoplàsies colorectals⁷⁹. L'edat, la presència de comorbiditat,

la opinió del pacient, així com la localització del tumor són factors a tenir en compte en la decisió terapèutica⁷⁹.

No existeixen dades que recomanin la realització d'una colectomia profilàctica en pacients en risc o en portadors de mutacions en els gens responsables del CCHNP⁷⁹.

5.7. Vigilància post-resecció

Es ben conegut el fet que després del tractament quirúrgic del CCR en pacients amb CCHNP existeix un elevat risc de lesions metacròniques, havent-se observat que la meitat dels pacients sotmesos a una resecció colònica segmentaria presenten una segona neoplàsia colorectal als 10 anys⁵³. A més, el risc de desenvolupar un carcinoma de recte en els pacients tractats mitjançant colectomia total és del 12% després d'un període de seguiment de 12 anys⁸². Aquesta situació justifica la vigilància endoscòpica després de la cirurgia⁸².

Finalment, és important assenyalar que, a l'actualitat, no existeixen dades que demostrin la utilitat de les estratègies de quimioprofilaxi en el CCHNP^{53 43}.

JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

Justificació general

El càncer colorectal és una de les neoplàsies més prevalents als països occidentals, sent la tercera causa de mort¹. Des d'un punt de vista epidemiològic es pot classificar el CCR en 5 grups: esporàdic, familiar, hereditari no associat a poliposi (CCHNP), associat a poliposi adenomatosa familiar (PAF) i associat a la malaltia inflamatòria intestinal)¹²⁻¹⁴. Actualment no es coneix la incidència d'aquests 5 grups de CCR a Espanya ja que la majoria d'estudis han estat realitzats als Estats Units o en països del nord d'Europa⁹².

El CCHNP és el tipus més freqüent de CCR hereditari, oscil·lant entre l'1 i el 5% dels total de casos de CCR i les mutacions germinals en els gens reparadors dels errors de replicació de l'ADN, principalment *MSH2* i *MLH1*, constitueixen la seva base genètica^{82,83}. La instauració dels criteris d'Amsterdam⁵⁸ va ser cabdals per a definir el CCHNP i identificar la seva base molecular. Posteriorment aquests criteris varen ser modificats per considerar-se massa restrictius (criteris d'Amsterdam II)⁵⁹. Després, l'any 1996, el *National Cancer Institute* va proposar els criteris de Bethesda, els quals tenien com objectiu identificar aquells pacients amb una major probabilitat de CCHNP i que haurien de ser avaluats mitjançant estudi d'inestabilitat de microsatèl·lits i/o anàlisi genètic⁶⁸. Aquests criteris han estat recentment revisats⁹⁹, però fins a l'actualitat no s'ha avaluat el seu rendiment.

En relació a la base molecular de la síndrome de Lynch o CCHNP se sap que més del 90% de casos presenta inestabilitat de microsatèl·lits, pel que determinar si un tumor presenta aquesta alteració pot ser una estratègia adequada per a seleccionar els individus tributaris d'ulterior estudi genètic. Per altra banda, la majoria de mutacions en els gens *MSH2* i *MLH1* comporten

l'anul·lació de l'expressió de les proteïnes codificades per aquests. D'aquesta manera, l'absència d'expressió de les proteïnes reparadores de l'ADN determinada mitjançant tècniques immunohistoquímiques podria traduir la presència d'instabilitat de microsatèl·lits. Fins el moment actual no s'ha realitzat cap estudi que compari ambdues tècniques en la detecció d'individus amb CCHNP i per tant no hi ha una estratègia definida per a identificar aquests individus ni indicar quins serien tributaris d'anàlisi genètic.

Per últim, un altre aspecte a tenir present és que els pacients amb antecedent de neoplàsia colorectal tenen un major risc de presentar una neoplàsia sincrònica o metacrònica, situació coneguda com a multicentricitat tumoral, la qual cosa justifica la realització de programes de vigilància postoperatòria¹⁴. Poder identificar aquests individus de major risc pot tenir importants implicacions clíniques, especialment en relació a les mesures preventives, ja sigui per a la administració d'agents quimioprolifèctics que inhibeixin el desenvolupament i/o progressió de noves lesions, o per a la realització d'estratègies de vigilància postresecció de CCR diferenciades en funció del risc personal de multicentricitat tumoral. Els estudis realitzats fins el moment actual en aquest sentit s'han centrat en la recurrència d'adenomes després de la polipectomia, no existint dades en quant a factors predictius de multicentricitat tumoral en pacients amb CCR.

Justificació i objectius de l'estudi 1

Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain. A multicenter, prospective, nation-wide study (European Journal of Gastroenterology and Hepatology 2004;16,1:39-45)

El CCR és la tercera causa de mort per càncer als països occidentals, incrementant-se el seu risc en aquells individus amb història familiar de CCR, especialment en aquells que pertanyen a famílies amb trastorns hereditaris⁸². El CCHNP és el tipus més freqüent de CCR hereditari i està causat per mutacions germinals en els gens reparadors dels errors de replicació de l'ADN^{82, 83}. Malgrat caracteritzar-se pel desenvolupament de CCR en edats joves, tendència al desenvolupament de lesions colorectals sincròniques i metacròniques i de neoplàsies a altres òrgans, no hi ha cap fenotipus específic^{16, 58, 84, 85}, i el seu diagnòstic clínic es basa en la història familiar, concretament en el compliment dels criteris d'Amsterdam II⁵⁹.

La freqüència del CCHNP és incerta, oscil·lant entre l'1 i el 5% dels total de casos de CCR. Aquesta variabilitat probablement és deguda a inconsistències en els criteris emprats per al seu diagnòstic⁸⁶⁻⁸⁹, així com diferències en la població estudiada^{12, 52, 68, 90, 91}. En aquest sentit, és important assenyalar que la majoria d'estudis han estat realitzats als Estats Units o en països del nord d'Europa⁹², no havent-hi cap estudi que hagi avaluat la incidència de CCHNP a Espanya.

Per altra banda, existeix un grup heterogeni i molt més nombrós de pacients que presenten agregació de CCR sense arribar a complir els criteris

definitoris de càncer hereditari. D'aquest grup, anomenat CCR familiar^{93, 94}, tampoc se'n coneix la seva incidència i característiques a Espanya.

Per tant, el primer estudi d'aquesta Tesi Doctoral va anar dirigit a recollir informació clínico-epidemiològica del CCHNP i d'altres formes de CCR familiar a Espanya en el si d'un estudi prospectiu, multicèntric, en poblacional general.

Els seus objectius específics van ser:

1. Establir la freqüència de CCHNP i CCR familiar a Espanya
2. Comparar les característiques personals dels pacients amb CCR en funció de l'agregació familiar
3. Avaluar la magnitud i característiques de la història familiar dels pacients amb CCR
4. Avaluar l'impacte de la utilització dels criteris de Bethesda en el diagnòstic clínic del CCHNP

Justificació i objectius de l'estudi 2

Synchronous colorectal neoplasms in patients with colorectal cancer: predisposing individual and familial factors (Diseases of Colon and Rectum 2004; 47:1192-1200)

La seqüència adenoma-carcinoma és la via patogènica més freqüent en el CCR, estant ben caracteritzada des del punt de vista epidemiològic, clínic, patològic i molecular^{15, 95}. El risc de presentar una neoplàsia sincrònica o metacrònica es troba augmentat després de presentar una primera neoplàsia colorectal, situació coneguda com a multicentricitat tumoral, la qual cosa justifica la realització de programes de vigilància postoperatòria¹⁴.

Les característiques associades a la multicentricitat tumoral en pacients amb adenomes colorectals són prou conegudes^{96, 97}. Tanmateix, aquesta situació ha estat molt menys estudiada en pacients amb CCR. La caracterització d'aquests individus pot tenir importants implicacions clíniques, especialment en relació a les mesures preventives, ja sigui per a la potencial administració d'agents quimioprolifèctics que inhibeixin el desenvolupament i/o progressió de noves lesions, o per a la realització d'estratègies de vigilància postresecció de CCR diferenciades en funció del risc personal de multicentricitat tumoral.

El segon estudi d'aquesta Tesi Doctoral va anar dirigit a caracteritzar els individus amb neoplàsies colorectals sincròniques, una situació sovint associada al CCHNP. Els objectius específics d'aquest estudi van ser:

1. Determinar la freqüència de neoplàsies colorectals sincròniques en pacients amb CCR
2. Identificar les característiques personals i familiars associades a aquesta situació de multicentricitat tumoral

Justificació i objectius de l' estudi 3

Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (JAMA 2005; 293:1986-1994)

Les mutacions germinals en els gens reparadors dels errors de replicació de l'ADN, principalment *MSH2* i *MLH1*, constitueixen la base genètica del CCHNP. L'incorrecte funcionament d'aquesta maquinària reparadora comporta l'aparició de mutacions al llarg de tot el genoma i, més concretament, en seqüències repetitives de nucleòtids conegudes com a microsatèl·lits. Aquesta alteració es coneix com el fenomen d'instabilitat de microsatèl·lits^{12, 16, 98}.

L'establiment dels criteris d'Amsterdam I⁵⁸ va ser cabdals per a definir el CCHNP i identificar la seva base molecular. Tanmateix, des d'un punt de vista clínic aquests criteris de seguida es van demostrar massa restrictius, el que va justificar la seva posterior modificació (criteris d'Amsterdam II)⁵⁹. L'any 1996 el *National Cancer Institute* va proposar els criteris de Bethesda, els quals pretenien identificar aquells pacients amb una major probabilitat de CCHNP i que, conseqüentment, haurien de ser avaluats mitjançant estudi d'instabilitat de microsatèl·lits i/o anàlisi genètic⁶⁸. Posteriorment, a l'any 2004 aquests criteris han estat revisats⁹⁹, però fins a l'actualitat no s'havia avaluat el seu rendiment.

El fet de que més del 90% de casos de CCHNP presentin instabilitat de microsatèl·lits suggereix que determinar si un tumor presenta aquesta alteració pot ser una estratègia adequada per a seleccionar els individus tributaris

d'ulterior estudi genètic. Per altra banda, la majoria de mutacions en els gens *MSH2* i *MLH1* comporten l'anul·lació de l'expressió de les proteïnes codificades per aquests. Així, l'absència d'expressió de les proteïnes reparadores de l'ADN determinada mitjançant tècniques immunohistoquímiques podria traduir la presència d'instabilitat de microsatèl·lits. És important assenyalar, no obstant, que no sempre és així ja que un gen mutat pot generar una proteïna anòmala que sigui detectada per immunohistoquímica. Per altra banda, excepcionalment, poden existir mutacions germinals en pacients amb tumors que no presenten instabilitat de microsatèl·lits. Aquests fets han condicionat que, fins a l'actualitat, no hi hagi una estratègia única universalment acceptada per a la identificació dels individus afectes de CCHNP.

Així, el tercer estudi d'aquesta Tesi Doctoral va anar dirigit a establir l'estratègia més efectiva i eficient per al diagnòstic del CCHNP. Més concretament, en el si d'un estudi prospectiu i multicèntric, es va comparar el rendiment diagnòstic de l'anàlisi d'instabilitat de microsatèl·lits amb el de la immunohistoquímica per a *MSH2* i *MLH1*, bé directament o prèvia selecció segons els criteris revisats de Bethesda, per a la identificació de mutacions germinals en els gens *MSH2* i *MLH1* en pacients amb CCR.

PUBLICACIONES ORIGINALS

Els resultats dels estudis que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han sigut recollits en les següents publicacions:

1. "Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain. A multicenter, prospective, nation-wide study".

Piñol V, Andreu M, Castells A, Payá A, Bessa X, Jover R, for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association.

European Journal of Gastroenterology and Hepatology 2004;16,1:39-45.

Factor d'impacte: 1,84

2. "Synchronous colorectal neoplasms in patients with colorectal cancer: predisposing individual and familial factors".

Piñol V, Andreu M, Castells A, Payá A, Bessa X, Jover R, for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association.

Diseases of Colon and Rectum 2004; 47:1192-1200.

Factor d'impacte: 2,34

3. "Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer".

Piñol V, Castells A, Andreu M, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, Xicola RM, Rodríguez-Moranta F, Payá A, Jover R, Bessa X, for the

Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association.

JAMA 2005; 293:1986-1994.

Factor d'impacte: 24,8

COMUNICACIONS A CONGRESSOS

Els resultats dels treballs que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han sigut presentats en els congressos internacionals que es relacionen a continuació.

- Piñol V, for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. "Incidence of HNPCC and other familial forms: a nation-wide, population-based study from Spain". 103rd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. San Francisco, maig de 2002. *Gastroenterology* 2002; 122: A594.
- Piñol V, for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. "Predisposing individual and familial factors to synchronous colorectal neoplasms in patients with colorectal cancer: a multicenter, prospective, nation-wide study". 104th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. Orlando, maig de 2003. *Gastroenterology* 2003; 124: A551.
- Castells A, for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. 106th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. Chicago, maig de 2005. *Gastroenterology* 2005; 128: A-62.

ARTICLES

ARTICLE 1

“Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain. A multicenter, prospective, nation-wide study”

ARTICLE 2

“Synchronous colorectal neoplasms in patients with colorectal cancer: predisposing individual and familial factors”.

ARTICLE 3

“Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer”

DISCUSSIÓ

La present Tesi Doctoral la formen tres estudis que pretenen caracteritzar les diferents formes familiars de CCR a Espanya, fent especial èmfasi en conèixer les característiques epidemiològiques, clíniques i moleculars del CCHNP, determinar el risc de patir una segona neoplàsia colorectal, i avaluar l'efectivitat de les diferents estratègies per identificar portadors de MSH2/MLH1 en persones que aconsegueixen algun dels criteris de Bethesda modificats.

La força global dels estudis, enmarcats dins el projecte Epicolon, radica en el gran nombre de pacients inclosos de manera prospectiva i seguint uns criteris ben definits, i també en la informació recollida respecte a característiques demogràfiques, clíniques, familiars i relacionades amb el tumor. A més, el fet que el disseny de l'estudi sigui de base poblacional fa que els pacients inclosos siguin representatius de la població del nostre país, el que permet estimar de manera precisa la freqüència de les diferents formes familiars de CCR.

En el primer estudi d'aquesta Tesi Doctoral es demostra que un 2,5% dels casos de CCR diagnosticats *de novo* a Espanya aconsegueixen els criteris clínics de CCHNP (criteris d'Àmsterdam), una xifra semblant a la d'estudis realitzats a altres països occidentals^{38, 52}. Per altra banda, si es tenen en compte els criteris de Bethesda, els quals es varen desenvolupar per identificar pacients amb alt risc de CCHNP, prop d'un 20% del total de CCR els aconsegueixen i, conseqüentment, haurien de ser sotmesos a un estudi molecular.

Els pacients que formen el grup de CCR familiar, definit com aquells amb història familiar de càncers relacionats amb el CCHNP però que no compleixen

els criteris d'Amsterdam, constitueixen un grup força important des del punt de vista clínic i logístic. De fet, la freqüència de CCR familiar (27% en el present estudi) és molt major que la de CCHNP. La comparació entre els casos índex va evidenciar que els pacients amb CCR familiar eren més grans en el moment del diagnòstic i tenien menys història personal de càncers relacionats amb el CCHNP que els pacients pertanyents a famílies amb CCHNP, mentre que tenien una major prevalença de adenomes sincrònics que els pacients amb CCR esporàdic. Encara que el CCR familiar representa un grup de pacients molt heterogeni, aquestes diferències suggereixen uns mecanismes carcinogènics diferents del CCHNP (via mutadora) i del CCR esporàdica (via supressora). La identificació d'uns criteris clínics que permetessin diferenciar els veritables casos de CCR familiar podrien contribuir a clarificar la base molecular d'aquest trastorn, d'una manera semblant a com els criteris d'Amsterdam varen ser crucials per identificar els gens involucrats en el CCHNP. També és important remarcar que una correcta caracterització clínica i molecular d'aquest subgrup de pacients pot tenir una repercusió important en el cribatge i vigilància del CCR, ja que podria afavorir una aproximació més cost-efectiva.

En el segon estudi d'aquesta Tesi Doctoral es fa èmfasi en la importància d'identificar pacients amb CCR i tendència a desenvolupar una segona neoplàsia colorectal, ja que són pacients amb pitjor pronòstic i que molt probablement es podrien beneficiar de mesures preventives específiques, especialment d'una vigilància postresecció més intensiva i de tractaments quimiopreventius dirigits^{14, 100}. En aquest sentit, es tracta de la primera investigació dirigida específicament a determinar les característiques

individuals i familiars associades amb la presència de neoplàsies colorectals sincròniques en pacients amb CCR, com a primer pas cap a intentar determinar quins són els paràmetres que predisposen a la multicentricitat tumoral.

La multicentricitat del CCR s'ha analitzat prèviament en altres estudis que investigaven la recurrència d'adenomes colònics després de la polipectomia endoscòpica. En aquests treballs s'ha vist que la mida, el component vellós, el número i la localització dels adenomes determinaven el risc de lesions metacròniques^{96, 97, 101}. De manera complementària a aquesta informació, els resultats del present estudi suggereixen que uns paràmetres de fàcil obtenció, com són l'antecedent personal d'adenoma colorectal i les característiques del tumor primari (la localització proximal, l'estadi TNM II i la presència de component mucós), es correlacionen amb la multicentricitat tumoral en quant a l'existència d'adenomes o carcinomes colorectals sincrònics en els pacients amb CCR.

El tercer estudi d'aquesta Tesi Doctoral avalua diferents estratègies per a identificar portadors de mutacions en els gens *MSH2/MLH1* en base a l'acompliment dels criteris revisats de Bethesda, la immunohistoquímica (IHQ) per a proteïnes reparadores i la inestabilitat de microsatèl·lits (IMS), així com llur combinació. La força de l'estudi radica en diversos punts. A banda de que, com s'ha assenyalat prèviament, es va realitzar en població general i va incloure un gran nombre de pacients (el major reportat fins a l'actualitat en estudis de característiques semblants), cal destacar que la IMS i la IHQ es varen fer de manera sistemàtica, paral·lela i cega en tots els malalts, els resultats varen ser avaluats en funció de la presència de mutacions germinals i, per últim, l'anàlisi inclou una avaluació de costos. Els resultats de l'estudi

suggereixen que l'estudi de la IMS i la IHQ de proteïnes reparadores són estratègies equivalents en termes d'eficàcia i cost-eficàcia, i que quan qualsevol d'aquests mètodes es realitza en pacients prèviament seleccionats d'acord als criteris revisats de Bethesda el seu rendiment encara és més alt pel que fa a la identificació dels pacients amb CCHNP associat a mutacions dels gens *MSH2/MLH1*. Malgrat tot, el relatiu baix nombre de mutacions identificades, així com el significat indeterminat de les 3 corresponents a canvis d'aminoàcid, poden constituir un punt dèbil de l'estudi i, consegüentment, haver influït en els resultats. Tanmateix, val a dir que quan es consideren únicament les mutacions inequívokes, no es modifiquen les conclusions de l'estudi tant pel que fa a l'eficàcia com a l'eficiència dels criteris revisats de Bethesda, bé sols o combinats amb l'estudi d'IMS o la IHQ.

Des que es va conèixer la base molecular del CCHNP^{60, 62, 102, 103}, s'han dedicat grans esforços a investigar l'estratègia més efectiva per a la identificació de portadors de mutacions en els gens *MSH2/MLH1*. Tot i així, no hi ha una única estratègia universalment acceptada, per la qual cosa s'utilitzen diverses aproximacions que inclouen tant diversos criteris clínics com mètodes diagnòstics¹⁰⁴. La variabilitat epidemiològica entre àrees geogràfiques i les diferents tecnologies emprades fa que les conclusions dels estudis siguin heterogènies¹⁰⁵, tot i que els nostres resultats suggereixen que els criteris revisats de Bethesda són els millors criteris clínics coneguts fins el moment actual per a identificar els pacients en risc de CCHNP⁶⁹. De fet, el seu funcionament, ja siguin sols o en combinació amb la IMS i/o IHQ, el seu alt valor predictiu en el model de regressió logística respecte altres grups de recomanacions, i la manca de benefici en termes d'efectivitat i eficiència a

l'incloure altres predictors independents recolzen l'ús d'aquests criteris en la pràctica clínica. Aquests resultats es veuen reforçats per les conclusions obtingudes en estudis paral·lels realitzats en el si del projecte Epicolon, en els que els criteris de Bethesda originals i revisats han estat comparats directament, observant-se que l'ús d'aquests darrers permeten una aproximació més acurada i cost-efectiva que quan s'utilitzen els criteris originals (Rodríguez-Moranta *et al.*, en premsa).

Malgrat que les recomanacions actuals per la identificació de CCHNP aconsellen l'estudi d'IMS com a tècnica de cribratge^{16, 70} la IHQ s'ha proposat com una aproximació alternativa^{90, 98, 106}. Degut a que la IHQ és senzilla de realitzar i més assequible que l'anàlisi d'ADN a la pràctica clínica diària, la utilització de la IHQ podria ser una tècnica més útil i ràpida com a mètode de precibratge de tumors amb defectes de reparació de l'ADN¹⁰⁶. En diferents poblacions d'alt risc de CCR s'ha demostrat que ambdues tècniques són equivalents, sent la IMS i l'estudi de pèrdua d'expressió de MSH2/MLH1 aproximacions adequades per a seleccionar els pacients tributaris d'estudi genètic⁹⁸. A més, la IHQ és la tècnica d'elecció per a dirigir l'estudi de mutacions germinals al poder determinar quina de les proteïnes és la que es troba alterada¹⁶ i, així mateix, pot ajudar a resoldre el problema de les variants germinals de MSH2 de significat incert ja que la inactivació somàtica de MSH2 és un fet poc freqüent en tumors esporàdics amb IMS^{98, 107}. Finalment, els resultats d'investigacions recents suggereixen que l'avaluació sistemàtica d'altres proteïnes reparadores, com ara MSH6 i PMS2, pot contribuir a inclús incrementar l'efectivitat de la IHQ^{90, 108}.

Malgrat l'alta correlació entre mutacions germinals en els gens *MSH2* o *MLH1* i la falta d'expressió de les corresponents proteïnes, en l'estudi es van trobar alguns resultats discordants. De fet, 2 pacients amb mutacions de canvi d'aminoàcid tant a *MSH2* com *MLH1* varen mostrar pèrdua d'expressió de la proteïna oposada. Aquests resultats varen encaminar-nos a determinar el significat patogènic d'aquestes mutacions. Així, respecte a la del gen *MLH1*, la mutació Lys618Ala, encara que s'ha demostrat que segrega amb el fenotip de CCHNP^{83, 109-111}, també s'ha observat en controls sans⁵¹. En quant a la de *MSH2*, la variant Ile145Met s'ha detectat en altres famílies amb CCHNP, però estudis funcionals han fet aparèixer alguns dubtes respecte a la seva patogenicitat¹¹². Per a minimitzar aquesta limitació, es varen repetir els càlculs considerant aquestes 3 mutacions potencialment no patogèniques i, tot i que les xifres varen variar discretament, els resultats no van canviar, reforçant les conclusions de l'estudi.

És important assenyalar que l'estudi d'IMS es va fer de manera sistemàtica analitzant únicament el marcador *BAT-26* enlloc d'utilitzar el panell complet de 5 marcadors proposat pel *National Cancer Institute*¹¹³. L'ús d'aquest únic marcador, una estratègia també emprada en estudis previs similars^{51, 52, 114}, es justifica per la seva elevada sensibilitat, que arriba al 93-97%^{115, 116}. De fet, en la gran majoria de tumors, l'anàlisi de *BAT-25* i *BAT-26* és suficient per a determinar l'estatus d'IMS sense necessitar la referència d'ADN germinal, ja que aquests marcadors són quasi-monomòrfics en població caucàsica^{103, 115}. Addicionalment s'ha demostrat en altres estudis que la utilització única de *BAT-26* era factible per al cribratge d'individus amb CCHNP ja que aquest marcador és capaç de detectar tots els portadors de mutacions¹¹⁷. De totes maneres

encara hi ha certa controvèrsia respecte aquest tema, ja que alguns estudis han suggerit que *BAT-26* pot no detectar alguns casos de defectes de reparació de l'ADN, especialment aquells associats a *MSH2*¹¹⁸. Coneixent aquesta limitació es va dissenyar el present estudi amb la hipòtesi de que la realització simultània de la IHQ contribuiria a identificar mutacions germinals en els pacients amb tumors *BAT-26* estables. Tanmateix, els resultats obtinguts demostren que la combinació d'IMS i IHQ no proporciona cap avantatge respecte a cadascuna de les tècniques realitzades individualment. Encara més important, la realització dels restants marcadors del panell de Bethesda no va contribuir a identificar cap portador de mutacions addicional, ja que tots els tumors estables pel marcador *BAT-26* i que mostraven pèrdua d'expressió protèica varen ser també estables per a la resta de marcadors del panell. Finalment, la freqüència de mutacions germinals a *MSH2/MLH1* observades en el present estudi (0,9%) és molt similar a l'observada en altres investigacions de base poblacional utilitzant altres estratègies diagnòstiques^{51, 89, 119}, el que va en contra de la possible infravaloració de la incidència de CCHNP com a conseqüència del mètode de cribratge emprat. Tenint en consideració aquestes circumstàncies, l'anàlisi del marcador *BAT-26* apunta a ser un mètode simple, ràpid i segur per a la identificació de la IMS quan l'objectiu final sigui únicament seleccionar pacients que han de ser sotmesos a estudi genètic dels gens *MSH2/MLH1*.

En els darrers anys, s'ha demostrat que la vigilància del CCR en portadors genètics de CCHNP és efectiva¹²⁰. A més, el cribratge en pacients amb CCR diagnosticat *de novo* utilitzant els criteris de Bethesda originals i l'estudi d'IMS per a indicar el subsegüent estudi genètic per CCHNP és cost-

efectiu, especialment si es consideren els beneficis sobre familiars propers del pacient⁷³. No obstant, hi ha molt poca informació respecta a altres estratègies de cribratge¹²¹. En aquest sentit, no hi ha cap estudi que hagi avaluat l'eficiència dels criteris revisats de Bethesda o que hagi comparat la IMS i la IHQ en quant a cost-efectivitat per a la identificació de mutacions germinals de *MSH2/MLH1*. Els resultats del present estudi suggereixen que la selecció clínica de pacients en base als criteris revisats de Bethesda en combinació amb la IMS o la IHQ és més eficient que qualsevol d'aquestes estratègies per separat. De totes maneres, degut a la no despreciable variabilitat de costos dels procediments mèdics en els diferents països i la mínima diferència observada entre ambdues tècniques, la superioritat de la IHQ sobre la IMS no es pot establir definitivament.

Com a conclusió d'aquest darrer estudi, es pot dir que els criteris revisats de Bethesda constitueixen una aproximació molt útil per a seleccionar pacients en risc de CCHNP. En pacients que aconsegueixen aquests criteris, tant la IMS com la IHQ són aproximacions equivalents i altament cost-efectives per a seleccionar aquells pacients que haurien de ser sotmesos a un estudi genètic per a l'eventual identificació de mutacions germinals en els gens *MSH2/MLH1*. Tenint en compte aquesta equivalència i que en la pràctica clínica la IHQ és més assequible que l'anàlisi d'ADN, la utilització de la IHQ pot ajudar a identificar una major proporció de pacients amb CCHNP.

CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts dels diferents estudis que componen aquesta Tesi Doctoral permeten extraure les següents conclusions:

- Un 2,5% dels casos de CCR diagnosticats *de novo* a Espanya compleixen els criteris clínics de CCHNP (criteris d' Amsterdam).
- La freqüència de CCR familiar en el nostre medi és del 27%, mentre que aproximadament un 20% del total de pacients amb CCR compleixen els criteris de Bethesda.
- L'edat de presentació del CCR és superior en els pacients amb CCR familiar així com posseeixen menys antecedents personals de càncer relacionat amb el CCHNP que els pacients pertanyents a famílies amb CCHNP. Per altra banda, els pacients amb CCR familiar presenten una major prevalença d'adenomes sincrònics que els pacients amb CCR esporàdic.
- L'antecedent personal d'adenoma colorectal i les característiques del tumor primari (localització proximal, estadi TNM II i presència de component mucós) es correlacionen amb la multicentricitat tumoral, en quant a l'existència d'adenomes o carcinomes colorectals sincrònics en els pacients amb CCR.

- La freqüència de mutacions germinals en els gens *MSH2/MLH1* en pacients amb CCR a Espanya és del 0,9%.
- La IMS i la IHQ de proteïnes reparadores són estratègies equivalents en termes d'eficàcia i cost-eficàcia per a identificar els pacients amb CCHNP associat a *MSH2/MLH1*.
- Fins a l'actualitat, els criteris revisats de Bethesda són els millors criteris clínics coneguts per a identificar els pacients en risc de CCHNP. El rendiment de la IMS i la IHQ per a la identificació dels pacients amb CCHNP associat a *MSH2/MLH1* augmenta quan els pacients són prèviament seleccionats d'acord als criteris revisats de Bethesda.
- La combinació de l'anàlisi d'IMS i la IHQ no proporciona cap avantatge addicional per a la selecció dels pacients amb sospita de CCHNP respecte a cadascuna d'aquestes tècniques realitzades individualment.
- La selecció clínica de pacients en base als criteris revisats de Bethesda en combinació amb la detecció d'IMS o la IHQ de les proteïnes reparadores de l'ADN és més eficient que qualsevol d'aquestes estratègies per separat.

BIBLIOGRAFIA

1. GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Lyon, IARCPress, 2001, 2001. (Accessed at <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.htm>.)
2. Gatta G, Capocaccia R, Coleman MP, et al. Toward a comparison of survival in American and European cancer patients. *Cancer* 2000;89:893-900.
3. Mortalidad por cáncer y otras causas en España, año 2000. Centro Nacional de Epidemiología, 2000. (Accessed at <http://193.146.50.130/cancer/cancer1.htm>.)
4. Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:650-61.
5. Howe GR, Benito E, Castelleto R, et al. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1887-96.
6. Friedenreich CM, Brant RF, Riboli E. Influence of methodologic factors in a pooled analysis of 13 case-control studies of colorectal cancer and dietary fiber. *Epidemiology* 1994;5:66-79.
7. Kim YI. AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* 2000;118:1235-57.
8. Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* 2002;98:241-56.

9. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer* 2001;85:1700-5.
10. Agents IWGotEoC-P. Weight control and physical activity. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2002.
11. Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:725-31.
12. Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med* 1994;331:1694-702.
13. Burt RW. Colon cancer screening. *Gastroenterology* 2000;119:837-53.
14. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997;112:594-642.
15. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
16. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 2001;121:198-213.
17. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993;329:1977-81.
18. Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000;119:854-65.
19. Winawer S, Fletcher R, Rex D, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;124:544-60.

20. Ahlquist DA, Pasha TM. Clinical aspects of sporadic colorectal cancer. In: Rustgi AK, ed. *Gastrointestinal cancers*. Philadelphia: Saunders; 2003:379-405.
21. Walsh JM, Terdiman JP. Colorectal cancer screening: clinical applications. *JAMA* 2003;289:1297-302.
22. Rex DK, Johnson DA, Lieberman DA, Burt RW, Sonnenberg A. Colorectal cancer prevention 2000: screening recommendations of the American College of Gastroenterology. *American College of Gastroenterology. Am J Gastroenterol* 2000;95:868-77.
23. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003;53:27-43.
24. Castells A, Bessa X. Pólipos y poliposis intestinal. In: Ponce J, ed. *Tratamiento de las enfermedades gastroenterológicas*. Barcelona: Doyma, S.L.; 2000:247-56.
25. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359:235-7.
26. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990;247:49-56.
27. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both *Dpc4* (*Smad4*) and *Apc* genes. *Cell* 1998;92:645-56.
28. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
29. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:207-11.

30. Castells A, Ino Y, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Rustgi AK. Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 1999;117:831-7.
31. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;331:1669-74.
32. Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, et al. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1996;334:82-7.
33. Ahsan H, Neugut AI, Garbowski GC, et al. Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1998;128:900-5.
34. St John DJ, McDermott FT, Hopper JL, Debney EA, Johnson WR, Hughes ES. Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1993;118:785-90.
35. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2992-3003.
36. Slattery ML, Kerber RA. Family history of cancer and colon cancer risk: the Utah Population Database. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1618-26.
37. Byers T, Levin B, Rothenberger D, Dodd GD, Smith RA. American Cancer Society guidelines for screening and surveillance for early detection of colorectal polyps and cancer: update 1997. American Cancer Society Detection and Treatment Advisory Group on Colorectal Cancer. *CA Cancer J Clin* 1997;47:154-60.

38. Burt RW. Familial risk and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:793-803.
39. Bulow C, Vasen H, Jarvinen H, Bjork J, Bisgaard ML, Bulow S. Ileorectal anastomosis is appropriate for a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2000;119:1454-60.
40. Vasen HF, van der Luijt RB, Slors JF, et al. Molecular genetic tests as a guide to surgical management of familial adenomatous polyposis. *Lancet* 1996;348:433-5.
41. Friedl W, Caspari R, Sengteller M, et al. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 2001;48:515-21.
42. Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001;1:11-21.
43. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342:1946-52.
44. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589-600.
45. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, et al. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;329:1982-7.
46. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:55-67.

47. Soravia C, Berk T, Madlensky L, et al. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet* 1998;62:1290-301.
48. Heinimann K, Mullhaupt B, Weber W, et al. Phenotypic differences in familial adenomatous polyposis based on APC gene mutation status. *Gut* 1998;43:675-9.
49. Houlston R, Crabtree M, Phillips R, Tomlinson I. Explaining differences in the severity of familial adenomatous polyposis and the search for modifier genes. *Gut* 2001;48:1-5.
50. Den Dunnen JT, Van Ommen GJ. The protein truncation test: A review. *Hum Mutat* 1999;14:95-102.
51. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, et al. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 2001;121:830-8.
52. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-7.
53. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-32.
54. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* 2003;138:560-70.
55. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:839-47.

56. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, Lane MR, Lanspa SJ, Lynch HT. Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 1994;14:1631-4.
57. Castells A, Pique JM. Tumores intestinales. In: Farreras V, Rozman C, eds. *Medicina ínterna*. 14^a ed. Madrid: Harcourt; 2000:261-72.
58. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-5.
59. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.
60. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
61. Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 1995;109:1685-99.
62. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996;2:169-74.
63. Jass JR, Pokos V, Arnold JL, et al. Colorectal neoplasms detected colonoscopically in at-risk members of colorectal cancer families stratified by the demonstration of DNA microsatellite instability. *J Mol Med* 1996;74:547-51.

64. Jass JR, Cottier DS, Jeevaratnam P, et al. Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet* 1995;346:1200-1.
65. Lewis CM, Neuhausen SL, Daley D, et al. Genetic heterogeneity and unmapped genes for colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:1382-8.
66. Liu B, Farrington SM, Petersen GM, et al. Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med* 1995;1:348-52.
67. Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T, Hodgson SV, Harocopos CJ, Bodmer WF. Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary non-polyposis colorectal cancer even if the Amsterdam criteria are not fulfilled. *Br J Surg* 1997;84:233-7.
68. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758-62.
69. Syngal S, Fox EA, Eng C, Kolodner RD, Garber JE. Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in MSH2 and MLH1. *J Med Genet* 2000;37:641-5.
70. American Gastroenterological Association medical position statement: hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 2001;121:195-7.
71. Dunlop MG. Guidance on gastrointestinal surveillance for hereditary non-polyposis colorectal cancer, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis, and Peutz-Jeghers syndrome. *Gut* 2002;51:V21-7.

72. Jarvinen HJ. Genetic testing for polyposis: practical and ethical aspects. *Gut* 2003;52:19ii-22.
73. Ramsey SD, Clarke L, Etzioni R, Higashi M, Berry K, Urban N. Cost-effectiveness of microsatellite instability screening as a method for detecting hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2001;135:577-88.
74. Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000;118:829-34.
75. Vasen HF, Nagengast FM, Khan PM. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* 1995;345:1183-4.
76. Lynch P. If aggressive surveillance in hereditary nonpolyposis colorectal cancer is now state of the art, are there any challenges left? *Gastroenterology* 2000;118:969-71.
77. Grady WM. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology* 2003;124:1574-94.
78. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81:214-8.
79. Burke W, Petersen G, Lynch P, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. I. Hereditary nonpolyposis colon cancer. Cancer Genetics Studies Consortium. *JAMA* 1997;277:915-9.
80. Dove-Edwin I, Boks D, Goff S, et al. The outcome of endometrial carcinoma surveillance by ultrasound scan in women at risk of hereditary

- nonpolyposis colorectal carcinoma and familial colorectal carcinoma. *Cancer* 2002;94:1708-12.
81. Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome). *Int J Cancer* 1996;69:38-43.
 82. Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996;110:1020-7.
 83. Peltomaki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997;113:1146-58.
 84. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-49.
 85. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:677-85.
 86. Aaltonen LA, Sankila R, Mecklin JP, et al. A novel approach to estimate the proportion of hereditary nonpolyposis colorectal cancer of total colorectal cancer burden. *Cancer Detect Prev* 1994;18:57-63.
 87. Cannon-Albright LA, Skolnick MH, Bishop DT, Lee RG, Burt RW. Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers. *N Engl J Med* 1988;319:533-7.
 88. Ponz de Leon M, Sassatelli R, Benatti P, Roncucci L. Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. *The*

- 6-year experience of a population-based registry. *Cancer* 1993;71:3493-501.
89. Percesepe A, Borghi F, Menigatti M, et al. Molecular screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a prospective, population-based study. *J Clin Oncol* 2001;19:3944-50.
90. Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, et al. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet* 2001;69:780-90.
91. Peel DJ, Ziogas A, Fox EA, et al. Characterization of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from a population-based series of cases. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1517-22.
92. de Leon MP, Pedroni M, Benatti P, et al. Hereditary colorectal cancer in the general population: from cancer registration to molecular diagnosis. *Gut* 1999;45:32-8.
93. Syngal S. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a call for attention. *J Clin Oncol* 2000;18:2189-92.
94. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1114-25.
95. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2002;137:603-12.
96. Martinez ME, Sampliner R, Marshall JR, Bhattacharyya AK, Reid ME, Alberts DS. Adenoma characteristics as risk factors for recurrence of advanced adenomas. *Gastroenterology* 2001;120:1077-83.

97. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992;326:658-62.
98. Terdiman JP, Gum JR, Jr., Conrad PG, et al. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology* 2001;120:21-30.
99. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261-8.
100. Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:1960-8.
101. van Stolk RU, Beck GJ, Baron JA, Haile R, Summers R. Adenoma characteristics at first colonoscopy as predictors of adenoma recurrence and characteristics at follow-up. The Polyp Prevention Study Group. *Gastroenterology* 1998;115:13-8.
102. Hemminki A, Peltomaki P, Mecklin JP, et al. Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1994;8:405-10.
103. Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-9.
104. Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:153-8.
105. Muller W, Burgart LJ, Krause-Paulus R, et al. 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* 2001;1:87-92.
106. de La Chapelle A. Microsatellite instability phenotype of tumors: genotyping or immunohistochemistry? The jury is still out. *J Clin Oncol* 2002;20:897-9.
 107. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998;58:1713-8.
 108. De Jong AE, Van Puijenbroek M, Hendriks Y, et al. Microsatellite Instability, Immunohistochemistry, and Additional PMS2 Staining in Suspected Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:972-80.
 109. Scartozzi M, Bianchi F, Rosati S, et al. 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* 2002;20:1203-8.
 110. Liu T, Tannergard P, Hackman P, et al. Missense mutations in hMLH1 associated with colorectal cancer. *Hum Genet* 1999;105:437-41.
 111. Wijnen J, Khan PM, Vasen H, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. *Am J Hum Genet* 1997;61:329-35.
 112. Kariola R, Otway R, Lonnqvist KE, et al. Two mismatch repair gene mutations found in a colon cancer patient--which one is pathogenic? *Hum Genet* 2003;112:105-9.

113. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-57.
114. Salovaara R, Loukola A, Kristo P, et al. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:2193-200.
115. Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997;57:300-3.
116. Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, et al. 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* 1998;21:101-7.
117. Loukola A, Eklin K, Laiho P, et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001;61:4545-9.
118. Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G, et al. Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* 2002;62:3485-92.
119. Ravnik-Glavac M, Potocnik U, Glavac D. Incidence of germline hMLH1 and hMSH2 mutations (HNPCC patients) among newly diagnosed

colorectal cancers in a Slovenian population. *J Med Genet* 2000;37:533-6.

120. Vasen HF, van Ballegoijen M, Buskens E, et al. A cost-effectiveness analysis of colorectal screening of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma gene carriers. *Cancer* 1998;82:1632-7.
121. Reyes CM, Allen BA, Terdiman JP, Wilson LS. Comparison of selection strategies for genetic testing of patients with hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma: effectiveness and cost-effectiveness. *Cancer* 2002;95:1848-56.