

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Características diferenciales de las principales vías de
carcinogénesis en el cáncer colorrectal de aparición precoz
según su localización**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Tamara Fernández de Miguel

DIRECTORES

José Perea García
Eduardo Ferrero Herrero

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



**CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS PRINCIPALES VÍAS
DE CARCINOGENESIS EN EL CÁNCER COLORRECTAL DE
APARICIÓN PRECOZ SEGÚN SU LOCALIZACIÓN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Tamara Fernández Miguel

Bajo la dirección de los doctores

José Perea García

Eduardo Ferrero Herrero

Madrid, 2020



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía

**CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS PRINCIPALES VÍAS
DE CARCINOGENESIS EN EL CÁNCER COLORRECTAL DE
APARICIÓN PRECOZ SEGÚN SU LOCALIZACIÓN**

TESIS DOCTORAL

TAMARA FERNÁNDEZ MIGUEL

MADRID, 2020

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

- A los directores de esta memoria:

Al Dr. José Perea García, por su apoyo constante durante mi corta vida profesional, por despertar en mí el interés por la cirugía colorrectal y la investigación y por su infinita paciencia durante los años que ha durado este proceso.

Al Dr. Eduardo Ferrero Herrero, por llevarme siempre de la mano en el tiempo que duró mi formación en el Hospital 12 de Octubre, por sus buenos consejos y su preocupación durante la elaboración de este trabajo.

- Al Dr. Felipe de la Cruz Vigo, por estar siempre pendiente de mi carrera profesional y por tenderme siempre una mano en los momentos más difíciles.
- Al Dr. Miguel Urioste, por su orientación y colaboración durante el desarrollo de este trabajo.
- Al servicio de Anatomía Patológica y a la Comisión de Tumores del Hospital 12 de Octubre, en especial a la Dra. Yolanda Rodríguez por su colaboración en el estudio histológico de las muestras.
- A los servicios de Biología molecular del Hospital 12 de Octubre (Dr. Daniel Rueda), al servicio de Biología Molecular del Hospital Universitario de Salamanca (Dr. Rogelio González) y al Departamento de Genética Molecular en Oncohematología del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (Dr. Juan Luis García), por llevar a cabo el estudio genético realizado en este trabajo.
- A mis compañeros del Hospital 12 de Octubre y del Hospital Galdakao Usánsolo, por su cariño y colaboración para que pudiera culminar este trabajo.
- A Unai, por ser el pilar fundamental de mi vida, por su gran comprensión, por apoyarme y cuidarme de la mejor manera posible siempre que lo necesito.
- A mi hermano y a mis padres, por darme la oportunidad de ser quien soy, por su apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado en mi vida y por estar siempre a mi lado, aunque nos separen muchos kilómetros.

- Por último, agradecer a todos los pacientes que dieron su consentimiento para entrar en el estudio, así como a sus familiares. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	vii
RELACIÓN DE TABLAS	xiii
RELACIÓN DE FIGURAS.....	xviii
RESUMEN.....	xxi
SUMMARY.....	xxvi
I. INTRODUCCIÓN	3
1. EL CÁNCER	3
2. EL CÁNCER COLORRECTAL. GENERALIDADES.....	4
2.1. Epidemiología	4
2.2. Etiología. Factores de riesgo	8
2.3. Fisiopatología.	10
2.4. Diagnóstico y Screening poblacional.	16
2.5. Clasificación TNM	21
2.6. Manejo clínico y tratamiento.	23
2.7. Seguimiento.....	32
3. EL CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO	33
3.1. Síndrome de Lynch	33
3.2. Poliposis colorrectales	41
4. EL CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO.....	48
4.1. Vías moleculares de carcinogénesis.	49
Vía supresora INC.....	49
Vía mutadora IMC	50
Vía serrada o fenotipo metilador de Isla CpG.....	50
4.2. Clasificación molecular del CCR	51
5. CCR Y LOCALIZACIÓN	53
6. CCR EN EL ADULTO JOVEN.....	55

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	60
III. MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	65
1.1. Procedencia y criterios de inclusión	65
1.2. Información y variables recogidas.....	65
Información clínica relacionada con el tumor y el individuo.....	65
Información familiar.....	66
2. MUESTRAS.....	67
2.1. Obtención de la muestra	67
2.2. Muestra tumoral	68
Tinción Hematoxilina-Eosina.....	68
Extracción de ADN a partir de muestra parafinada.....	69
2.3. Sangre periférica.....	70
Extracción manual	70
Extracción automática	71
2.4. Valoración de la cantidad y calidad del ADN extraído	72
Preparación del gel de agarosa	72
Migración electroforética	72
Cuantificación del ADN y valoración de su pureza	73
3. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TEJIDO TUMORAL	74
3.1. Panel Bethesda	74
3.2. Análisis inmunohistoquímico de proteínas MMR.....	76
3.3. Estudio molecular de los genes MMR (<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i>)	78
Genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	78
Análisis de mutaciones	78
Análisis de grandes deleciones genómicas	79
a Desnaturalización del ADN e hibridación de sondas.....	80
b Reacción de ligación	80
c Reacción de PCR.....	81
d Visualización.....	81
Estudio de hipermetilación de promotor del gen <i>MLH1</i>	82

a	Modificación con bisulfito	82
b	PCR específicas de presencia / ausencia de hipermetilación	84
c	PCR independiente del estado de hipermetilación	85
d	Digestión con el enzima de restricción BstUI.....	85
e	Secuenciación.....	86
Gen <i>MSH6</i>		87
Amplificación de exones y regiones intrónicas adyacente		87
4.	ESTUDIO MOLECULAR DE <i>BRAF</i>	90
5.	ANÁLISIS DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA MEDIANTE ARRAYS DE CGH (Comparative genomic Hybridisation).....	91
3.4.	Marcaje fluorescente	91
3.5.	Hibridación sobre microarrays	92
3.6.	Escaneado y procesamiento de los datos.....	93
3.7.	Cálculo del índice de inestabilidad genómica	94
3.8.	Calculo del número y frecuencia de las CNV	96
6.	ANÁLISIS DEL FENOTIPO METILADOR DE ISLOTES DE CPG.....	97
7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	97
IV.	RESULTADOS	101
1.	CARACTERÍSTICAS ANATOMO-CLÍNICAS Y FAMILIARES.....	101
1.1.	MUESTRA TOTAL.....	101
A	Edad al diagnóstico y sexo	101
B	Localización tumoral	102
C	Características histológicas.....	102
D	Estadio tumoral.....	103
E	Pólipos asociados y otras neoplasias	103
F	Historia familiar de cáncer de colon	104
G	Supervivencia	104
1.2.	MUESTRAS POR LOCALIZACIÓN TUMORAL	106
A	Tumores de colon derecho.....	106
B	Tumores de colon izquierdo	108

C Tumores de recto	110
1.3. ANÁLISIS COMPARATIVO POR LOCALIZACIONES	111
2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	114
2.1. MUESTRA TOTAL.....	114
A INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES	114
B FENOTIPO METILADOR	119
C CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CCR	123
D VÍA SUPRESORA A INESTABILIDAD CROMOSÓMICA	126
3. ANÁLISIS COMPARATIVO VÍAS DE CARCINOGENESIS Y LOCALIZACIÓN TUMORAL.	128
V. DISCUSION.....	134
1. EL CCR EN EL ADULTO JOVEN	134
2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y FAMILIARES.....	136
2.1. MUESTRA TOTAL.....	136
2.2. ANÁLISIS COMPARATIVO TENIENDO EN CUENTA LA LOCALIZACIÓN TUMORAL	143
3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	149
3.1. MUESTRA TOTAL.....	149
3.1.1.VIA MUTADORA O INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES	149
A. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES E INMUNOHISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DEL SISTEMA DE REPARACIÓN MMR	150
B. ANALISIS GENÉTICO	152
D. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y FAMILIARES DE LA VÍA MUTADORA.....	152
3.1.2. VÍA SERRADA O FENOTIPO METILADOR DE ISLAS CPG.....	155
3.1.3. VÍA SUPRESORA O INESTABILIDAD CROMOSÓMICA	158
3.1.5. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CCR	160
3.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS DIFERENTES VÍAS DE CARCINOGENESIS Y LOCALIZACIÓN TUMORAL.	162

ÍNDICE DE CONTENIDOS

VI. CONCLUSIONES.....	168
VII. BIBLIOGRAFÍA	173
VIII. ANEXOS	207
ANEXO 1	207
ANEXO 2	215
ANEXO 3	220

ABREVIATURAS

- **A:** Adenina.
- **AAS:** Ácido acetilsalicílico.
- **Abs:** Absorbancia.
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AINES:** Antiinflamatorios no esteroideos.
- **AJCC:** American Joint Committee on Cancer. Comisión conjunta estadounidense para el cáncer.
- **ANOVA:** Analysis of variance. Análisis de varianza.
- **APC:** Adenomatous Polyposis Coli. Gen causal de la poliposis adenomatosa familiar.
- **Arg:** Arginina.
- **Asp:** Ácido aspártico.
- **BAC:** Bacterial artificial chromosome. Cromosoma artificial bacteriano.
- **BAT:** Big adenina tracto. Secuencia mononucleotídica del panel Bethesda.
- **Bp:** Base pairs. Pares de bases.
- **°C:** Grados centígrados o Celsius.
- **c:** Codón.
- **C:** Citosina.
- **CBS:** Circular binary segmentation. Algoritmo matemático que permite ubicar alteraciones en la dosis génica.
- **CCHNP:** Cáncer colorrectal hereditario no Polipósico.
- **CCR:** Cáncer colorrectal.
- **CEA:** Carcinoembryonic antigen. Antígeno carcinoembrionario.
- **CGH:** Comparative Genomic Hybridization. Hibridación genómica comparada.
- **CpG:** Fenotipo metilador de islas CpG.
- **CIMP:** CpG island methylator phenotype
- **CIN:** Chromosomal instability. Inestabilidad cromosómica.
- **Cm:** Centímetros.
- **CNA:** Copy number abnormality. Alteración en el número de copias.

- **CNV:** Copy number variation. Variación en el número de copias.
- **COBRA:** Combined bisulfite restriction analysis. Análisis de restricción combinado con bisulfito.
- **CRC:** Colorectal cancer. Cáncer colorrectal.
- **DCC:** Deleted in colorectal cancer. Gen delecionado en el cancer colorrectal.
- **DCNA:** DNA copy number aberration. Aberración en el número de copias de DNA.
- **Del:** Delección.
- **dHPLC:** Denaturing high-performance liquid chromatography. Cromatografía líquida de alto rendimiento con gradiente desnaturalizante.
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- **dNTP:** Deoxynucleotide triphosphate. Desoxinucleótido trifosfato.
- **Dup:** Duplicación.
- **E:** Ácido glutámico. □ **EDTA:** Ethylenedinitrilotetraacetic acid. Ácido etilendiaminotetraacético.
- **EE. UU.:** Estados Unidos.
- **EMS:** Estabilidad de microsatélites.
- **eQTL:** Expression quantitative trait loci. Loci genómico que contribuye a la variación de los niveles de expresión.
- **FDR:** False Discovery Rate. Tasa de falso descubrimiento.
- **FISH:** Fluorescent in situ hybridization. Hibridación fluorescente in situ.
- **FM:** Fenotipo metilador.
- **fs:** Frameshift. Mutación con desplazamiento del marco de lectura.
- **G:** Guanina.
- **GII:** Genomic instability index. Índice de inestabilidad genómica.
- **Gln:** Glutamina.
- **Glu:** Ácido glutámico.
- **GNL:** Gain, normal, loss. Ganancia, normal, pérdida.
- **GWAS:** Genome-wide association study. Estudio de asociación del genoma completo.
- **H:** Histidina.
- **HGVS:** Human genome variation society. Sociedad de Variaciones del Genoma Humano.

- **His:** Histidina.
- **HRM:** High resolution melting. Análisis de alta resolución de fusión.
- **I:** Isoleucina.
- **IARC:** International agency for research on cancer. Agencia internacional para la investigación del cáncer.
- **IHQ:** Inmunohistoquímica.
- **Ile:** Isoleucina.
- **IMS:** Inestabilidad de microsatélites.
- **INC:** Inestabilidad cromosómica.
- **L:** Leucina.
- **Leu:** Leucina.
- **LOH:** Loss of heterocigosity. Pérdida de heterocigosidad.
- **LS:** Lynch syndrome. Síndrome de Lynch.
- **M:** Molar.
- **MACS:** Microsatellite and Chromosomal Stable. Tumor con estabilidad microsatelital y cromosómica.
- **Mb:** Megabase.
- **MCR:** Minimal Common Regions. Regiones mínimas comunes.
- **MeV:** MultiExperiment Viewer. Herramienta para el análisis de datos procedentes de microarrays.
- **mg:** Miligramo.
- **ml:** Mililitros.
- **MLPA:** Multiplex ligation-dependent probe amplification. Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples.
- μm : Micrómetro.
- μM : Micromolar.
- **mM:** Milimolar.
- **MMR:** Mismatch repair. Reparación de errores de emparejamiento.
- **MSI:** Microsatellite instability. Inestabilidad de microsatélites.
- **MSS:** Microsatellite stability. Estabilidad de microsatélites.
- **N°:** Número.
- **NCI:** National cancer institute. Instituto nacional del cáncer.

- **NPCR:** National program of cancer registries. Programa nacional de registros del cáncer.
- **NS:** No significativo.
- **p:** Proteína.
- **P:** Prolina.
- **PAC:** P1-derived artificial chromosome. Cromosoma artificial derivado de P1.
- **PAF:** Poliposis adenomatosa familiar.
- **PAFA:** Poliposis adenomatosa familiar atenuada.
- **Pb:** Pares de bases.
- **PCR:** Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.
- **PharmGKB:** Pharmacogenomics Knowledgebase. Base de conocimientos farmacogenómicos.
- **Pro:** Prolina.
- **Q:** Glutamina.
- **R:** Arginina.
- **RAR:** Recurrently Altered Regions. Regiones recurrentemente alteradas.
- **rpm:** Revoluciones por minuto.
- **RS:** Unión rectosigmoidea.
- **S:** Serina.
- **SD:** Standard Deviation. Desviación estándar.
- **SEER:** Surveillance, Epidemiology and End Results. Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales.
- **SEOM:** Sociedad española de oncología médica.
- **Ser:** Serina.
- **SL:** Síndrome de Lynch.
- **SLE:** Supervivencia libre de enfermedad.
- **SOH:** Sangre oculta en heces.
- **SOTA:** Self Organizing Tree Algorithm. Algoritmo autoorganizativo de árbol.
- **ST:** Supervivencia total.
- **T:** Timina.
- **TBE:** Tris, ácido bórico y EDTA.
- **TCGA:** The Cancer Genome Atlas. Atlas genómico del cancer.

- **TEAA:** Acetato de trietilamonio.
- **TEF:** Test exacto de Fisher.
- **Ter:** Terminación.
- **TIGR:** The Institute for Genomic Research. Instituto para la investigación genómica.
- **YAC:** Yeast artificial chromosomes. Cromosoma artificial de levadura.
- **5-FU:** 5-Fluorouracilo

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla I.1. Diferencias de la secuencia convencional adenoma-carcinoma y la teoría adenoma serrado-carcinoma	12
Tabla I.2. Clasificación lesiones colorrectales en avanzadas y no avanzadas.	14
Tabla I.3. Clasificación anatomopatológica y características clínicas de las lesiones serradas en el colon. Modificado de Rex et al. 2012.	15
Tabla I.4. Historia clínica y examen físico dirigidos a estratificar el riesgo de ccr en pacientes sintomáticos.	18
Tabla I.5. Clasificación TNM para el CCR. AJCC Cancer staging manual. 8th edition	22
Tabla I.6. Estadificación CCR. AJCC Cancer Staging manual. 8th edition.	23
Tabla I.7 Criterios para el diagnóstico del síndrome de Lynch.....	37
Tabla I.8 Características de las diferentes vías de carcinogénesis	51
Tabla III.1 Características de los marcadores microsatélites y los fluorocromos empleados para el análisis de IMS (HNPPC Microsatellite instability test; Roche Molecular Biochemicals) Bp: pares de bases	74
Tabla III.2 Mezcla de PCR utilizada par el estudio de IMS.	75
Tabla III.3 Anticuerpos, clones, proveedores y diluciones utilizadas en el estudio IHQ de las muestras.	77
Tabla III.4 Mezcla de PCR utilizada para la amplificación de MLH1 y MSH2.	78
Tabla III.5 Mezcla de ligación utilizada en la PCR multiplex para el análisis de grandes deleciones genómicas de los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	80
Tabla III.6 Mezcla de PCR utilizada para el análisis de grandes deleciones en los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> mediante MLPA.	81

Tabla III.7 Mezcla de PCR utilizada en el estudio de hipermetilación del promotor del gen <i>MLH1</i>	84
Tabla III.8 Mezcla para la PCR independiente del estado de hipermetilación del promotor del gen <i>MLH1</i>	85
Tabla III.9 Mezcla para la digestión con la enzima <i>BstUI</i>	85
Tabla III.10 Mezcla de PCR utilizada para la amplificación de exones y regiones intrónicas adyacentes al gen <i>MSH6</i>	88
Tabla IV.1 CCR < 45a según edad y sexo.....	101
Tabla IV.2 CCR < 45 a y localización	102
Tabla IV.3 CCR < 45 a y características histológicas.	102
Tabla IV.4 CCR < 45 a y estadio tumoral.	103
Tabla IV.5 CCR < 45 a y pólipos asociados	104
Tabla IV.6 CCR < 45 a e historia familiar	104
Tabla IV.7 CCR < 45 a y pronóstico.....	105
Tabla IV.8 Características clínico-patológicas del ccr en colon derecho en <45 a.	107
Tabla IV.9 Características clínico-patológicas del ccr en colon izquierdo en <45a	109
Tabla IV.10 Características clínico-patológicas del ccr en recto en <45 a	111
Tabla IV.11 Comparativa en las características clínico-patológicas del ccr teniendo en cuenta su localización en <45 a.	113
Tabla IV.12 Características moleculares de la vía mutadora en ccr <45 a.....	114
Tabla IV.13 Estudio IHQ de la vía mutadora en ccr <45 a.....	115
Tabla IV.14 Estudio genético de la vía mutadora en ccr <45a.....	116
Tabla IV.15 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Distribución según edad y sexo.	116

Tabla IV.16 CCR<45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Distribución según localización en el colon.	117
Tabla IV.17 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Características histológicas y pólipos asociados	117
Tabla IV.18 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Distribución según estadio tumoral.	118
Tabla IV.19 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Distribución según el pronóstico.	118
Tabla IV.20 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Distribución según la historia familiar.	119
Tabla IV.21 CCR <45 a. Características de la vía serrada. Clasificación molecular del ccr y en función del grado de metilación.	120
Tabla IV.22 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía serrada. Distribución según edad y sexo.	120
Tabla IV.23 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía serrada. Distribución según la localización en el colon.	121
Tabla IV.24 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía serrada. Distribución según el estadio tumoral.	121
Tabla IV.25 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía serrada. Características histológicas y pólipos asociados.	122
Tabla IV.26 CCR <45 a. Características moleculares de la vía serrada en función del grado de metilación.	122
Tabla IV.27 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía serrada. Distribución según historia familiar.	123
Tabla IV.28 Clasificación molecular del CCR < 45 a.....	123
Tabla IV.29 Clasificación molecular del CCR < 45 a. Distribución por edad y sexo.....	124

Tabla IV.30 Clasificación molecular del CCR <45 a. Distribución según localización y estadio tumoral 124

Tabla IV.31 Clasificación molecular del CCR < 45 a. Características histológicas 125

Tabla IV.32 Clasificación molecular del CCR < 45 a. Mutaciones en los genes MMR y pérdida de expresión de MLH1 126

Tabla IV.33 Clasificación molecular del CCR < 45 a. Historia familiar 126

Tabla IV.34 CCR< 45 a. Características moleculares de la vía supresora. 127

Tabla IV. 4 Características moleculares de las diferentes vías de carcinogénesis en el CCR <45 a según su localización en el colon. 130

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura. I.1 Número de casos nuevos a nivel mundial 2018. GLOBOCAN	5
Figura. I.2 Distribución incidencia mundial, sexo masculino 2018. GLOBOCAN....	5
Figura. I.3 Número de casos nuevos en España 2018. GLOBOCAN.....	7
Figura. I.4 Tasas de incidencia por sexo en España 2018. GLOBOCAN.....	7
Figura. I.5. Alteraciones genéticas en la secuencia adenoma-carcinoma (Daves et al. 2005).....	11
Figura. I.6. Clasificación morfológica de los pólipos adenomatosos: A) Pediculados, B) Sésiles, C) Planos, D) Planos elevados, E) Planos deprimidos. Mayo foundation for medical education research.	13
Figura. I.7 Clasificación para pólipos propuesta por Haggitt.	16
Figura. I.8. Hemicolectomía derecha.	24
Figura I.9 Hemicolectomía derecha ampliada.....	24
Figura I.10 Hemicolectomía izquierda.....	24
Figura I.11 Sigmoidectomía.....	24
Figura I.12 Escisión total del mesorrecto	27
Figura I.13 Estrategia diagnóstica síndrome de Lynch	36
Figura I.14 Representación de los diferentes grupos de CCR, según las diferentes vías de carcinogénesis y sus solapamientos.	53
Figura III.1 Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la PCR multiplex para el estudio de la inestabilidad en las secuencias microsátélites.	75
Figura III.2 Resultado de la amplificación de un ADN normal (A) y de una muestra tumoral clasificada como inestable para todos los marcadores microsátélites analizados (B).	76

- Figura III.3** Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas para la PCR del estudio molecular de los genes *MLH1* y *MSH2*. 78
- Figura III.4** Esquema de las condiciones de tiempo y t^a empleadas en la reacción de PCR multiplex para el estudio molecular de los genes *MLH1* y *MSH2*. 81
- Figura III.5** Esquema de las condiciones de tiempo y t^a empleadas en la reacción de PCR utilizada para el estudio de hipermetilación del promotor del gen *MLH1*. ... 84
- Figura III.6** Secuencia de pasos que conforman el método COBRA. Cuando las islas CpG se encuentran no metiladas, la modificación con bisulfito transforma las citosinas en uracilos y el producto de PCR no es reconocido por la enzima BstUI. ... 86
- Figura III.7** Ejemplo de la secuencia obtenida en un paciente con hipermetilación del promotor del *MLHA* en uno de sus alelos, cuando solo uno de los alelos está metilado (heterocigosis), se observan dos picos superpuestos (C y T). 87
- Figura III.8** Esquema de los tres programas de temperatura diseñados para la amplificación de los distintos fragmentos de *MSH6*. 88
- Figura III. 9** Ejemplo de la visualización del estado mutacional del gen *MSH6* mediante dHPLC. Los tiempos de retención varían en función de la naturaleza de heterodúplex u homodúplex de los fragmentos de PCR que pasan por el detector de PCR que pasan por el detector de UV. Imagen modificada de www.transgenomics.com..... 89
- Figura III.10** Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en el análisis HRM para el estudio molecular del gen *BRAF*. 91
- Figura III.11** Esquema del marcado fluorescente para la hibridación de muestras en microarray. Imagen tomada del manual NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kits 48 and 192 Reactions” (Roche Diagnostics) 92
- Figura III.12** Esquema placa de microarray CGH empleado para el análisis de las muestras (formato 12x135, Roche NimbleGen Inc., Reykjavik, Islandia) Imagen tomada del manual NimbleGen Arrays User’s Guide (Roche Diagnostics) 93
- Figura IV. 1** Gráfico de frecuencias de los perfiles de inestabilidad y bandas cromosómicas de dichas alteraciones. Verde = Ganancia / Rojo = Pérdida..... 127

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cáncer colorrectal (CCR) constituye la tercera neoplasia más frecuente y la segunda causa de muerte después del cáncer de pulmón. En 2018 se registraron 1,9 millones de casos nuevos de CCR y fallecieron alrededor de 900 mil personas. El riesgo de padecer CCR es mayor en países desarrollados, mientras las tasas más bajas se sitúan en países en vías de desarrollo.

El CCR en el adulto joven, representa el 11% del total global del cáncer de colon y el 18% del cáncer de recto. La incidencia en este grupo de edad ha aumentado en las últimas décadas, comparada con la descrita para pacientes mayores de 49 años, en los que ha disminuido, junto con la mortalidad asociada. En Europa, aunque en la mayoría de los países la incidencia ha aumentado, existe una gran heterogeneidad.

El modelo clásico adenoma- carcinoma ha ido evolucionando en los últimos años y cada vez se describe con más frecuencia el CCR según su fenotipo molecular. Hasta el momento se han descrito tres vías principales de carcinogénesis: la inestabilidad de microsatélites (IMS) o vía mutadora; la inestabilidad cromosómica (INC) o vía supresora, y la vía serrada o Fenotipo Metilador de islas (FM).

Los tumores con IMS (10-15%), se pueden originar de dos formas diferentes: en las formas hereditarias como el Síndrome de Lynch (SL), cuya base molecular son mutaciones a nivel germinal; y en casos esporádicos, secundarios a la hipermetilación de MLH1. Estos se localizan preferentemente en el colon derecho, son indiferenciados, producen mucina y poseen un alto contenido de células en anillo de sello

La mayor parte de los tumores esporádicos (80%) se generan a través de la vía supresora, caracterizada por aneuploidía y alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad (LOH). Estos tumores suelen localizarse en el colon izquierdo, son indiferenciados y se asocian a mutaciones germinales.

La vía serrada ocurre hasta en el 35% de los CCR, son tumores característicos de mujeres, con alto grado de hipermetilación, indiferenciados y localizados en colon derecho.

Las vías de carcinogénesis no son mutuamente excluyentes, existen solapamientos entre ellas, pero siempre habrá una vía dominante. Teniendo en cuenta esta premisa y las alteraciones genéticas y/o moleculares de CCR, se ha realizado una clasificación molecular con el objetivo de individualizar el tratamiento. Esta clasificación establece cuatro grupos diferenciados en función del estado de IMS y del FM.

El CCR en el adulto joven suele asociarse a un peor pronóstico y posee unas características determinadas; fenotipo invasor, bajo grado de diferenciación, alto componente mucinoso, elevada frecuencia de tumores sincrónicos y/o metacrónicos y una mayor tendencia a la agregación familiar. En cuanto a su localización, no existe una opinión uniforme; unas series apuntan predilección por el lado izquierdo y otras por el derecho.

OBJETIVOS

El objetivo principal de nuestro estudio es describir las características clínico-patológicas, familiares y moleculares del CCR en el adulto joven en función de las diferentes vías de carcinogénesis e identificar las características diferenciales teniendo en cuenta la localización tumoral. De esta forma estableceremos un mapa colónico que se resuman las características del CCR en el adulto joven en función de su localización.

MATERIAL Y MÉTODOS

Nuestro trabajo es un estudio retrospectivo descriptivo de 88 pacientes consecutivos diagnosticados de CCR a una edad igual e inferior a 45 años entre 2002 y 2008; en los que se estudiaron las características clínico-patológicas, familiares y moleculares y se compararon entre las distintas localizaciones colónicas.

Inicialmente se realizó el análisis inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras de ADN y la inestabilidad de microsatélites, clasificando los casos como IMS o EMS. En los casos EMS se completó el estudio de los genes reparadores de errores de emparejamiento del ADN. Posteriormente se realizó el estudio de patrones de metilación y se clasificaron los tumores según la clasificación molecular del CCR. Finalmente, se llevo a cabo el estudio de inestabilidad cromosómica mediante la técnica de CGH (Comparative Genomic Hybridization) array.

RESULTADOS

La edad media de diagnóstico fue de 39.56 años; se observó predominio del sexo masculino y la distribución tumoral a lo largo del colon fue uniforme. El 13.3% eran tumores pobremente diferenciados, un 32% producían mucina y el 15% tenían células en anillo de sello. En cuanto a la estadificación se observó un ligero predominio de estadios precoces y un alto porcentaje de tumores esporádicos (38%).

A continuación, se analizaron las características tumorales teniendo en cuenta la localización. La edad media de diagnóstico entre grupos fue similar y se observó un predominio en varones para tumores localizados en colon izquierdo y recto. Los tumores de colon derecho fueron los más indiferenciados y presentaron mayor componente mucinoso y estadios más precoces; en cambio los rectales presentaron menor componente mucinoso y estadios más avanzados. El 40% de los pacientes con tumores en colon derecho cumplían criterios Ámsterdam II y los casos esporádicos predominaron en el colon izquierdo. El pronóstico tumoral empeoraba progresivamente desde el colon derecho al recto.

En el estudio molecular un total de 12 casos fueron IMS, de los cuales solo 10 presentaron mutación en los genes reparadores. El 72.1% de los tumores eran EMS-FM Bajo0 y un 5.9% combinaron IMS-FM Alto. El grado de inestabilidad genómica (GII) fue similar para las pérdidas y las ganancias y la media de copias alteradas fue de 95.8. Se observaron como regiones recurrentemente alteradas, pérdida en 1p36 y 14q11 (61%) y ganancias en 19q13-p12 (57%).

El mayor porcentaje de tumores inestables se localizó en el colon derecho (70%) y ninguno en el izquierdo. Los tumores con mayor fenotipo metilador se localizaban en

el colon derecho y los tumores de colon izquierdo y recto fueron mayoritariamente MSS-CIMP Low. El GII más elevado y el mayor número de copias alteradas fue para los tumores localizados en el colon izquierdo.

CONCLUSIONES

Los hallazgos de nuestro estudio sugieren que el CCR en el adulto joven es un grupo heterogéneo, con características diferenciales con respecto a las series publicadas en la población general y además las bases moleculares del mismo varían en función de la localización tumoral; lo que podría tener implicaciones importantes en el manejo terapéutico de esta patología.

SUMMARY

INTRODUCTION

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third most common neoplasm and the second cause of death after lung cancer. In 2018, 1.9 million new cases of CRC were registered and around 900 thousand people died from it. The risk of suffering from CRC is higher in developed countries, while the lowest rates have been observed in developing countries.

CRC in young adults represents approximately the 11% of the global colon cancer and 18% of rectal cancer. The incidence at this age group has increased in recent decades, compared to that described for patients over 49 years, in whom it has decreased. In Europe, although the incidence has increased in most countries, there is great heterogeneity between them.

The classical model of the adenoma-carcinoma sequence has evolved in recent years and CRC is more frequently described according to molecular features. To date, three main pathways of carcinogenesis have been described: microsatellite instability (MSI) or suppressor pathway; the chromosomal instability (INC), or mutator pathway and the serrated pathway or the CPG Island Methylator Phenotype.

Tumors with MSI (10-15%) could arise through two different pathways: hereditary forms such as Lynch Syndrome (SL), whose molecular basis are mutations at the germinal level; and sporadic cases, secondary to MLH1 hypermethylation. IMS tumors are preferentially located at the right side, and histologically they are undifferentiated, mucinous and they have a high percentage of signet cells.

Most sporadic tumors (80%) are made through the suppressor pathway, characterized by aneuploidy and high frequency of loss of heterozygosity (LOH). These tumors are usually located in the left colon, they are undifferentiated, and they are associated with germline mutations.

The serrated pathway occurs in up to 35% of CRC. This type of tumors, which are more frequent in women, are generally undifferentiated, located in the right colon and with a high degree of hypermethylation.

Carcinogenesis pathways are not mutually exclusive, there are overlaps between them, but there will be a dominant one. Taking into account this assumption and the genetic and molecular alterations of CRC, a molecular classification has been made in order to individualize the treatment. This classification establishes four differentiated groups according to MSI and CIMP status.

Early onset colorectal cancer (EOCRC) is usually associated with worse prognosis and has specific characteristics: invasive phenotype, low degree of differentiation, high mucinous component, high frequency of synchronous and/or metachronous tumors and greater familial aggregation. As for their location, there is no consensus; some studies point to a preference for the left side and others for the right.

OBJECTIVES

The aim of our study is to describe the clinical-pathological, familiar and molecular characteristics of CRC in young adults according to the different carcinogenesis pathways and to find out the distinct characteristics taking into account the tumour location. In this way we will establish a colonic map in which the characteristics of EOCRC are summarized according to their location.

PATIENTS AND METHOS

Our work is a retrospective descriptive study of 88 consecutive patients diagnosed with CRC at an age equal or less than 45 years between 2002 and 2008; in which the clinical-pathological, familiar and molecular features were studied and compared between the different colonic locations.

For this purpose, the immunohistochemical analysis of the DNA repair system and the instability of microsatellites was initially performed, classifying the cases as MSI or MSS, in MSS cases the study of DNA mismatch repair genes was completed.

Subsequently, the study of methylation patterns was carried out and the tumors were classified taking into account the molecular classification of CRC. Finally, the study of chromosomal instability was carried out thanks to CGH array technique.

RESULTS

The average age of diagnosis was 39.56 years; male predominance was observed and the tumor distribution along the colon was quite similar. The 13.3% of the cases were poorly differentiated tumors, 32% produced mucin and 15% had “signet ring” cells. Considering the staging, a slight predominance of early stages and a high percentage of sporadic tumors (38%) were observed.

Afterwards, the tumor characteristics were analyzed taking into account the location. The mean age of diagnosis between groups was similar and a predominance of males was observed for tumors located in the left colon and rectum. Tumors located in the right colon were the most undifferentiated and those with a greater mucinous component and an earlier stage; on the other hand, rectal tumors presented a greater mucinous component and more advanced stages. Forty percent of patients with tumors in the right colon had Amsterdam II criteria and sporadic cases predominated in the left colon. The tumor prognosis progressively worsened from the right colon to the rectum.

In the molecular study, a total of 12 cases were MSI, from which only 10 presented mutation in the repairing genes. The 72.1% of the tumors were MSS-CIMP Low0 and 5.9% combined MSI-CIMP High. The GII was similar for the losses and gains and the average number of altered copies was 95.8. Recurrent altered regions were observed as losses in 1p36 and 14q11 (61%) and gains in 19q13-p12 (57%).

The highest percentage of MSI tumors was located in the right colon (70%) and none in the left colon. The tumors with the highest CIMP were located in the right colon and the tumors of the left colon and rectum were mostly EMS-CIMP Low. The highest GII and the largest number of altered copies was for tumors located in the left colon.

CONCLUSIONS

The research findings suggest that the CRC in young adults is a heterogeneous group, with different characteristics from those published in the general population and also the molecular basis of it varies depending on the location of the tumor, which could have important implications in the therapeutic management of this disease.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER

La palabra “Cáncer” es un término genérico que engloba un conjunto de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, caracterizadas por la proliferación excesiva y descontrolada de células con capacidad invasiva, que constituyen “tumores malignos” o “neoplasias malignas”. Estas células tienen capacidad para emigrar desde su lugar de origen a otras regiones del organismo, bien a través de la sangre la linfa o el tejido linfático y e invadir otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer.

Constituye una de las causas más frecuentes de mortalidad, en 2018 se produjeron 9.6 millones de defunciones relacionadas con esta enfermedad (GLOBOCAN 2018), ocupando el segundo lugar en los países desarrollados detrás de las enfermedades cardiovasculares.

Genéticamente, el cáncer constituye una entidad compleja cuyo origen se vincula a la acumulación de múltiples alteraciones en el genoma de las células que lo componen (Al-Sohaily *et al.* 2012). La transformación de una célula normal en una tumoral también conocida como carcinogénesis; es un proceso en el que intervienen alteraciones moleculares genéticas y epigenéticas, dando lugar a la gran heterogeneidad y variabilidad morfológica y pronóstica de los tumores (Blanco-Calvo *et al.* 2015). Las alteraciones genéticas afectan a la secuencia de ADN, abarcando deleciones, amplificaciones, mutaciones e incluso pérdidas o ganancias de cromosomas enteros. En cambio, las alteraciones epigenéticas afectan a la expresión de los genes, englobando entre otros, el silenciamiento por hipermetilación de las islas CpG de los promotores génicos (Snover, 2011).

La mayor parte de los cánceres aparece de forma esporádica como resultado de la acumulación de mutaciones somáticas en el tejido que da lugar a la neoplasia. Sin embargo, entre un 5% - 10% de los casos presenta un componente hereditario relacionado

con mutaciones germinales (Binefa *et al.* 2014). El cáncer hereditario tiene una serie de características que lo diferencian del esporádico: edades de aparición más temprana, tumores multifocales o bilaterales, antecedentes familiares de la misma neoplasia y elevada incidencia de cáncer dentro de la misma familia.

2. EL CÁNCER COLORRECTAL. GENERALIDADES

2.1 Epidemiología

La importancia del cáncer colorrectal (CCR) radica en la gran incidencia del este en países desarrollados y su elevada mortalidad. Los datos disponibles más recientes sobre estadísticas del CCR son los elaborados por la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), la International Agency for Research on Cancer (IARC), la Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) y los resultados de supervivencia del proyecto European Cancer Registry (EUROCARE-5).

A nivel mundial el CCR constituye la tercera neoplasia más frecuente tras el cáncer de pulmón y mama y la segunda causa de muerte después del cáncer de pulmón; en 2018 se registraron 1,9 millones de casos nuevos de CCR y fallecieron por el mismo alrededor de 900 mil personas (Fig. I.1). El riesgo de padecer CCR es mayor en países desarrollados, las mayores tasas de incidencia se sitúan en Australia, Nueva Zelanda, Europa y América del Norte, mientras que las tasas más bajas se sitúan en África (excepto Sudáfrica) y Asia Sur-Central (Fig.I.2). Estos últimos datos hacen pensar en una importante repercusión del estilo de vida occidental en el desarrollo del CCR. (Ferlay *et al.* 2018; Freddie B *et al.* 2018)

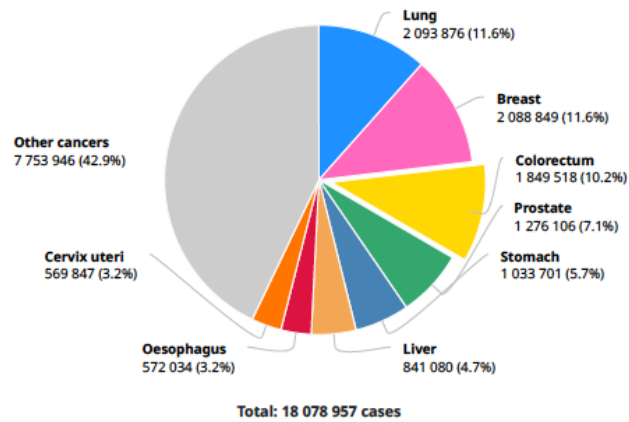


Fig. I.1 Número de casos a nivel mundial 2018. GLOBOCAN

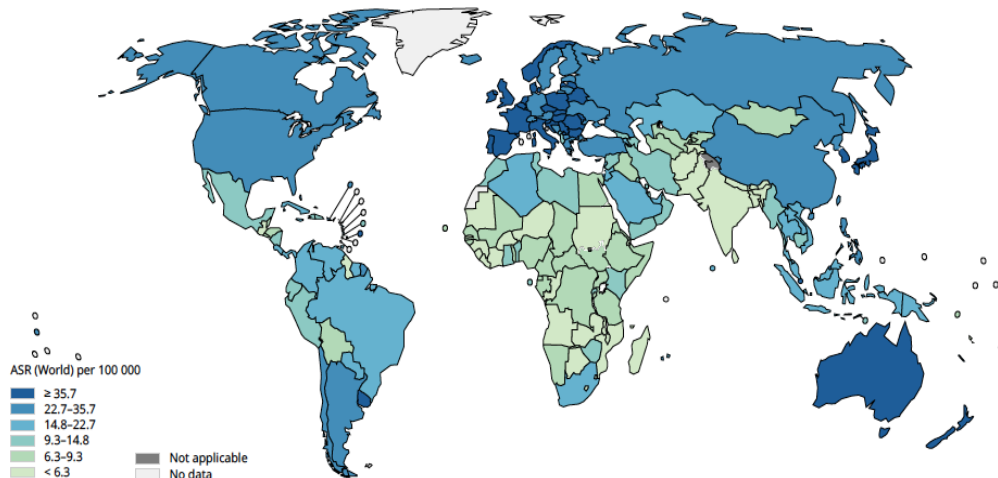


Fig. I.2 Distribución incidencia mundial, sexo masculino 2018. GLOBOCAN

El CCR afecta prácticamente igual a hombres y a mujeres. El riesgo de CCR aumenta con la edad. Es poco frecuente antes de los 40 años, mientras que su incidencia comienza a aumentar de manera significativa a partir de entonces. Datos más recientes de la base de datos de Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) de los Estados Unidos y otros registros de cáncer occidentales sugieren que las tasas de incidencia están aumentando en el grupo de edad de 40-44, mientras que están disminuyendo en los grupos de mayor edad (Davis DM *et al.* 2011; Lumsdaine CT *et al.* 2020).

I. INTRODUCCIÓN

El riesgo acumulado de desarrollar CCR es de un 2-6% en la población general; este riesgo es mayor en personas con historia familiar de CCR, en especial en aquellas con síndromes hereditarios (Pinol V *et al.* 2004).

Históricamente la incidencia del CCR izquierdo (descendente, sigma y recto) ha sido más elevada que la del CCR derecho (ascendente y transversal) (Siegel R *et al.* 2014). Cifras recientes de la American Cancer Society confirman esta mayor proporción de CCR izquierdo (51% vs 42%) (Lumsdaine CT. *et al.* 2020) Sin embargo, la incidencia del CCR derecho ha aumentado en los últimos años, pudiendo atribuirse esta tendencia a diferencias en los factores anatómicos, la exposición a factores ambientales y hereditarios, así como diferentes mecanismos genéticos y epigenéticos, que conducirían a diferentes vías moleculares en la carcinogénesis del CCR (Lee GH *et al.* 2015).

En Europa el CCR es actualmente la segunda neoplasia más común tras el cáncer de mama de forma global, siendo igual para el sexo femenino y la tercera en orden tras el cáncer de próstata y pulmón en el hombre. En el año 2018 en Europa se registraron alrededor de 500 mil casos nuevos de CCR y la mortalidad secundaria al mismo fue de unas 240 mil personas, siendo la segunda causa más frecuente de muerte secundaria a cáncer por detrás del cáncer de pulmón y por delante del cáncer de mama. (Ferlay *et al.* 2018; Freddie B *et al.* 2018 - GLOBOCAN).

En nuestro país, el CCR es la primera neoplasia más común de forma global, siendo la segunda más común en la mujer tras el cáncer de mama y la segunda también en el hombre tras el cáncer de próstata. Alrededor de 12500 personas fueron diagnosticadas en 2018 de CCR y ese mismo año se produjeron 4145 muertes por este tipo de neoplasia (Ferlay *et al.* 2018; Freddie B *et al.* 2018 - GLOBOCAN). (Fig. I.3 y I.4)

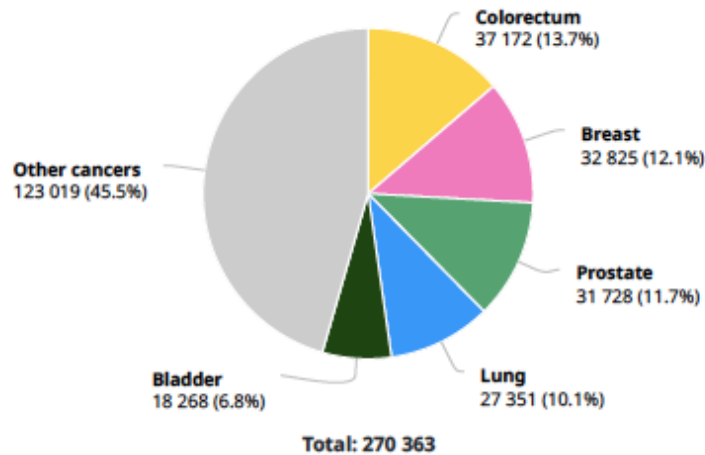


Fig. I.3 Número de casos en España 2018. GLOBOCAN

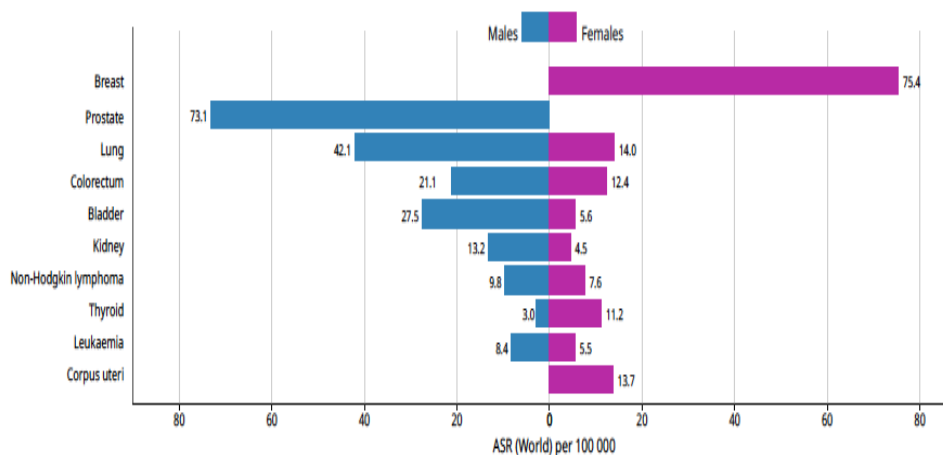


Fig. I.4 Tasas de incidencia por sexo en España 2018. GLOBOCAN

Se estima que los diagnósticos de CCR aumentaron un 13,2% en hombres y un 6,6% en mujeres entre los años 2006 y 2012, convirtiéndose en uno de los tumores con mayor tasa de crecimiento dentro de los más prevalentes (Center MM *et al.* 2009).

El estudio EUROCORE-5 (*European Cancer Registry of Survival of Cancer Patients*), muestra una supervivencia media a los 5 años ajustada por edad para pacientes mayores de 15 años diagnosticados de cáncer entre 2000 y 2007 variable entre los distintos países europeos. Para el cáncer de colon estas tasas oscilan entre el 42.9 y el 62.2% (Europa 57%), siendo similares por sexos y para el cáncer de recto entre 36.1 y 73.2% (Europa 55.8%), siendo discretamente mayor en el sexo femenino. El país con mayor supervivencia media a los 5 años para el cáncer de colon es Alemania (60.2%),

siendo Letonia el país con la peor supervivencia a los 5 años. En cuanto al cáncer de recto, Bélgica encabezaría la lista con una supervivencia a los 5 años ajustada por edad del 62.9% y Bulgaria estaría a la cola con una supervivencia del 38.4%. España se ajusta a la supervivencia europea, con una supervivencia media a los 5 años del 57.1% para el cáncer de colon y del 56.4% para el cáncer de recto. Por último, cabe añadir como hallazgo en este estudio que la supervivencia a los 5 años entre el año 1999 y 2007 ha aumentado tanto para el cáncer de colon (54.2 vs 58.1%) como para el cáncer de recto (52.1 vs 57.6%). (De Angelis R *et al.* 2014; Holleczeck B *et al.* 2015 - EUROCORE5).

2.2 Etiología. Factores de riesgo

EL CCR es resultado de la combinación de factores ambientales y genéticos. Diversos factores de riesgo pueden aumentar las probabilidades de que una persona presente pólipos y/o CCR. Algunos factores, como la edad (la mayoría de los casos se presentan en personas mayores de 50 años) o el sexo (son más frecuentes en hombres que en mujeres), no son modificables.

La diferencia en cuanto a la incidencia de esta enfermedad entre países, así como el aumento del número de casos en la población inmigrante a zonas con alta incidencia hace pensar en la influencia de factores ambientales en el desarrollo de esta enfermedad. La predisposición familiar también juega un papel importante en este tipo de neoplasia; personas con historia familiar de CCR tienen mayor riesgo de desarrollarlo, en estos casos la asociación de este tumor con síndromes neoplásicos (Poliposis Adenomatosa Familiar, Síndrome de Lynch, Peutz Jeghers y Poliposis juvenil) es más marcada.

La etiología del CCR es multifactorial se ha demostrado que los factores del estilo de vida, incluida la dieta, están asociados con el riesgo de CCR.

Un metaanálisis de 13 estudios prospectivos de cohortes con 3.635 casos con 459.910 sujetos incluidos mostró que la dieta rica en grasa no producía un incremento en el riesgo de CCR ni de forma global ni cuando se analizaba por grupo étnico, sexo, edad,

tipo de grasa (animal o vegetal) o ubicación del cáncer (colon o recto) (Fedirko *et al.* 2011).

En el año 2015 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) revisó la evidencia que asocia el consumo de carne roja y procesada con el CCR, el grupo de trabajo concluyó que existía suficiente evidencia para clasificar el consumo de carne procesada como “cancerígeno para los seres humanos” (Grupo 1) y el consumo de carne roja como “probablemente carcinogénico para los seres humanos” (Grupo 2A). La revisión más reciente del World Cancer Research Foundation - Continuous Update Project (WCRF-CUP) concluye que la asociación entre carne roja y riesgo de CCR es marginalmente significativa, concluye además que el consumo de 100 g/día de verduras se asocia con una disminución del riesgo de CCR (Vieira AR *et al.* 2017). Esta publicación además muestra que la fibra se asocia con una disminución del riesgo de CCR e indica que una ingesta de folato, vitamina B, calcio y vitamina D en la dieta de una forma adecuada podrían contribuir a disminuir el riesgo de CCR.

En cuanto a los factores ambientales y estilos de vida asociados con el CCR la mayoría son consistentes en estudios observacionales, aunque algunas de estas asociaciones están aún sin demostrar.

La obesidad es un factor de riesgo para el CCR. Un reciente metaanálisis mostró que el aumento de peso se asoció con un riesgo moderadamente aumentado de CCR. Hubo un incremento de riesgo de CCR del 16 % con la categoría más alta de aumento de peso en comparación con la categoría de referencia, además demostró que el aumento de peso desde la juventud hasta la edad adulta se asoció con un mayor riesgo de CCR que el aumento del peso desde la edad adulta hasta la vejez; asociación que es ligeramente más marcada en el hombre que en la mujer (Baena R *et al.* 2015, Karahalios *et al.* 2015). La relación entre obesidad abdominal y CCR aparece reflejada en un metaanálisis reciente, en este se demuestra que un mayor índice cintura-cadera, así como una mayor circunferencia abdominal se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia (Dong Y *et al.* 2017).

Entre otros factores de riesgo de padecer CCR, se encuentra la Diabetes; ya que en personas diabéticas es un 37% más elevado que en los no diabéticos (Luo S *et al.* 2016). El consumo moderado (≤ 50 g/día) y elevado de alcohol (> 50 g/día) suponen un incremento en el riesgo de desarrollar CCR, no encontrándose resultados significativos para el bajo consumo (Bagnardi V *et al.* 2015). La actividad física se asocia con un riesgo reducido de CCR proximal y distal (Boyle T *et al.* 2012).

2.3 Fisiopatología.

- Anatomía e Histología

Se entiende por cáncer colorrectal (CCR) aquella formación maligna iniciada en la mucosa del colon o del recto cuya histología típica corresponde a un adenocarcinoma (Schneider *et al.* 2014). Está considerada una enfermedad multifactorial en la que intervienen tanto factores genéticos como ambientales (Arvelo *et al.* 2015).

El intestino grueso o colon es el órgano comprendido entre la válvula ileocecal y el ano, con una longitud aproximada de 150 cm. Se divide en 6 partes bien diferenciadas: ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, sigma y recto. Su pared está dispuesta en cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa. En todo su recorrido a excepción de la parte distal del recto es intraperitoneal.

La mucosa es lisa y revestida de células mucosecretoras y cilíndricas, que poseen microvellosidades que le confieren sus propiedades absorptivas. Las glándulas de Lieberkühn son más profundas y en su parte inferior poseen criptas con células caliciformes argentafines e indiferenciadas o células madre. La lámina propia presenta linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas, y de forma dispersa aparecen folículos linfoides. En la submucosa se encuentra el plexo de Meissner, constituido por un grupo de neuronas y haces nerviosos. La capa muscular posee fibras de músculo liso cuya disposición difiere entre el colon (tenias) y el recto (disposición continua), en esta capa existe otro plexo conocido como plexo mioentérico de Auerbach.

- Mecanismos de generación del CCR

El desarrollo del CCR es consecuencia de un proceso secuencial de mutaciones genéticas que se acumulan a lo largo del tiempo, produciendo activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores. Estos procesos son responsables de una inestabilidad genética en la mucosa colorrectal que se traduce en el desarrollo de un tumor (Fearon y Vogelstein 1990). Los modelos matemáticos han estimado que el número de alteraciones requeridas para el desarrollo de esta enfermedad debe ser superior o igual a siete, siendo la suma de éstas, y no su orden cronológico, lo que determinará las propiedades biológicas del tumor.

La acumulación de alteraciones genéticas tiene lugar mediante un esquema conocido como “secuencia adenoma-carcinoma” (Fig. I.5), este proceso de transformación durará unos años. Inicialmente la mucosa se hará hiperplásica o adenomatosa, para pasar a formarse un adenoma y por último un carcinoma insitu que podrá crecer y hacerse carcinoma invasor.

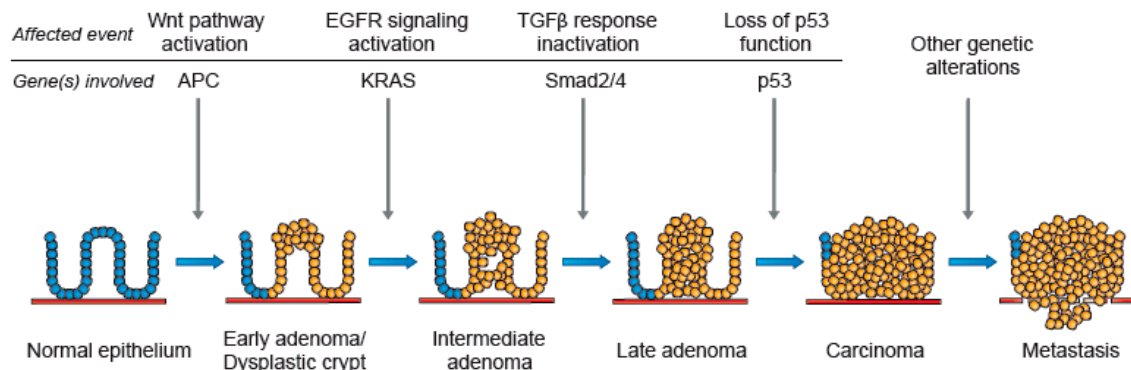


Fig. I.5. Alteraciones genéticas en la secuencia adenoma-carcinoma (Daves *et al.* 2005)

Los adenomas serrados, previamente clasificados dentro de los adenomas hiperplásicos se transforman en tumores siguiendo una vía distinta a la “secuencia adenoma-carcinoma”, esto les confiere características diferentes (Al-Sohaily *et al.* 2012). En la tabla se muestran las diferencias entre las dos secuencias de carcinogénesis mencionadas (Cappell. 2008, Al-Sohaily S *et al.* 2012). (Tabla I.1)

Tabla I.1. Diferencias de la secuencia convencional adenoma-carcinoma y la teoría adenoma serrado-carcinoma (Cappell 2008)

Características	Secuencia adenoma-carcinoma	Teoría adenoma serrado-carcinoma
Lesión precursora	Adenoma convencional	Adenoma serrado
Localización	Todo el colon	Sobretudo colon derecho
Morfología	Pedicularado (adenoma tubular) Sésil (adenoma vellosa)	Sésil o plano
Displasia	Menos frecuente	Más frecuente
Alteración genética	Mutación gen <i>APC</i> , <i>P53</i>	Mutación gen <i>BRAF</i>
Hipermetilación ADN	Infrecuente	Frecuente
IMS	Raro	Típico (inactivación <i>hMLH1</i>)
Síndromes genéticos	PAF	Poliposis hiperplásica
% CCR esporádico	85%	15%

PAF: poliposis adenomatosa familiar

Las alteraciones genéticas más conocidas en el CCR pueden ser de tres tipos; las producidas por la activación de oncogenes, como *K-RAS* y *c-MYC*; las secundarias a la inactivación de genes supresores del crecimiento tumoral, que se expresan mediante deleciones de los cromosomas 5q (donde está situado el gen *APC*), 18q gen *DCC* o “delecionada en cáncer de colon”) y 17q (donde se localiza el gen *p53*) y por último las que se generan por fallos en el sistema de reparación del ADN [genes- MMR (Mismatch Repair)], éstas inducen errores de replicación de ADN originando la inestabilidad de microsatélites.

El modelo de Fearon y Vogelstein ha evolucionado de forma compleja, de tal manera que hoy en día se conocen tres vías principales de carcinogénesis del CCR: la vía mutadora (IMS), la vía supresora o de inestabilidad cromosómica (INC) y la vía serrada o del fenotipo metilador de islas de CpG (FM o CIMP) (Arvelo F. 2015).

- Lesiones precancerosas

Los pólipos colónicos son crecimientos exofíticos de la mucosa colorrectal con tamaño, morfología y características variables, son lesiones fácilmente detectables y extirpables endoscópicamente.

El *National Polyp Study Workgroup* estableció que más del 95% de los CCR son precedidos por lesiones premalignas que progresan durante varios años hasta desarrollar la enfermedad (Winawer *et al.* 1993).

Morfológicamente los pólipos pueden ser planos, sésiles y pediculados; desde el punto de vista histológico se les clasifica en: adenomatosos, serrados y otro tipo de pólipos entre los que se incluyen los inflamatorios, hamartomatosos y otras lesiones mucosas. (Fig. I.6)

Los pólipos adenomatosos, son los más frecuentes (60-70%) y los que poseen mayor potencialidad de malignización. Morfológicamente se clasifican en sésiles, pediculados, planos o deprimidos, e histológicamente en alto o bajo grado de displasia, así como en tubulares, vellosos o tubulovellosos.



Fig. I.6. Clasificación morfológica de los pólipos adenomatosos: A) Pediculados, B) Sésiles, C) Planos, D) Planos elevados, E) Planos deprimidos. *Mayo foundation for medical education research.*

Los pólipos adenomatosos más frecuentes son los adenomas tubulares (65-80%), siguiendo a estos los adenomas tubulovellosos (10-15%) y por último los adenomas vellosos (5-10%).

La incidencia del cáncer invasor está directamente relacionada con el número y tamaño de los pólipos, el grado de displasia y la proporción del componente velloso. (Bas *et al.* 2015, Silva *et al.* 2014).

Se considera lesión adenomatosa avanzada, el adenoma con componente vellosos (>20%), de 10mm o más de diámetro con displasia de alto grado (DAG), y lesión no avanzada el adenoma tubular (> 80%) con displasia de bajo grado (DBG) menor de 10mm. (Tabla I.2)

Tabla I.2. Clasificación lesiones colorrectales en avanzadas y no avanzadas.

LESIÓN ADENOMATOSA	
No avanzada	Adenoma tubular < 10mm
Avanzada	Adenoma con componente vellosos o > 10mm o con displasia alto grado
LESIÓN SERRADA	
No avanzada	Pólipo serrado < 10mm sin displasia
Avanzada	Pólipo serrado > 10mm o con displasia

Las lesiones serradas; son el segundo tipo de pólipos más frecuentes (30-10%). Hasta hace unos años se incluían dentro de los pólipos hiperplásicos y se pensaba que no tenían potencial de malignización, pero recientemente se han establecido como lesiones precursoras de un tipo característico de CCR (vía serrada). Son más frecuentes en el colon proximal y desde el punto de vista histológico se caracterizan por presentar un aspecto dentado del epitelio de las criptas glandulares. El origen de estas lesiones se atribuye a alteraciones epigenéticas en los genes responsables de la proliferación y diferenciación celular, y por otro, parecen estar relacionados con mutaciones en el gen *BRAF*.

Dentro de las lesiones serradas existen diferentes subtipos; hiperplásicos, sésiles y adenomas serrados tradicionales, cada uno de los cuales presenta un potencial de malignización y unas características histológicas y genéticas propias (Minoo P *et al.* 2006, Cappell 2008, Rex DK *et al.* 2012).

Tabla I.3. Clasificación anatomopatológica y características clínicas de las lesiones serradas en el colon. Modificado de Rex et al. 2012.

	ASPECTO	TAMAÑO	PREVALENCIA	LOCALIZACIÓN	PRECANCEROSO
Pólipo hiperplásico (PH)	Plano, sésil	Pequeño < 5mm	Muy frecuente	Colon izquierdo	No
Adenoma / Pólipo Serrado / Sésil	Plano, sésil	Mayor que PH	Frecuentes (<2%)	Colon derecho	Si
Adenoma serrado tradicional	Sésil, pediculado	Mayor que PH	Poco frecuentes	Colon izquierdo	Si

El riesgo de lesiones sincrónicas o metacrónicas tras extirpación de un pólipo serrado es mayor si estas lesiones son displásicas o mayores de 10mm (lesiones avanzadas, por el contrario, serían lesiones no avanzadas los pólipos serrados sin displasia o menores de 10mm. (Lu F-I et al. 2010, Anderson JC et al. 2018)

La colonoscopia es una prueba diagnóstica y terapéutica, que permite de manera simultánea la exploración de la mucosa colónica, la toma de biopsias o la realización de polipeptomías; pero no nos permite diferenciar el tipo histológico de los pólipos resecaados. Por este motivo todos aquellos pólipos identificados deben ser candidatos a la extirpación, a excepción de aquellos en los que nos encontremos con una dificultad técnica que no los impida.

Un problema común en la práctica clínica habitual, derivado de la gran cantidad de exploraciones endoscópicas que se llevan a cabo día a día debido al screening del CCR, es el hallazgo de focos de carcinoma in situ en pólipos resecaados. Estas lesiones están confinadas a la mucosa y no tienen riesgo metastásico ya que la mucosa no tiene vasos linfáticos. Los niveles de Haggitt, propuestos por el autor del mismo nombre, clasifican estas lesiones en función de la profundidad de afectación de la pared del colon. (Haggitt RC *et al.* 1985). El riesgo de tumor residual o invasión linfática en un paciente con un pólipo con focos de carcinoma resecaado endoscópicamente dependerá del nivel de invasión Haggitt del mismo; lesiones con niveles 1,2 y 3 tienen un riesgo de malignización

del 1%; lesiones nivel 4 poseen un riesgo más elevado, entre un 12-25% (Rex DK *et al.* 2012).

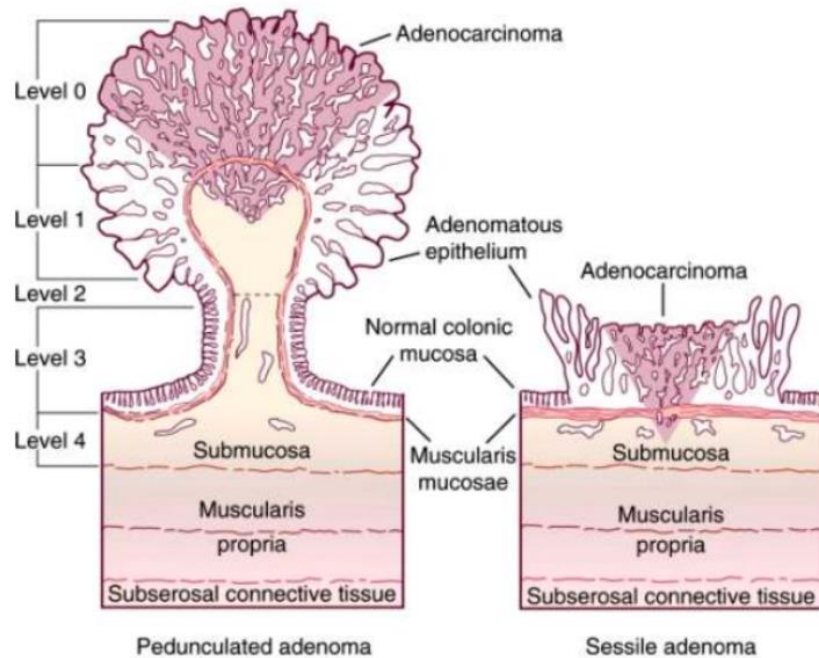


Fig. I.7. Clasificación para pólipos propuesta por Haggitt.

Nivel 0: confinado a la mucosa del pólipo.

Nivel 1: invade la submucosa de la cabeza del pólipo.

Nivel 2: invade la submucosa del cuello del pólipo.

Nivel 3: invade la submucosa del tallo del pólipo.

Nivel 4: invade la submucosa de la pared del colon.

El seguimiento endoscópico de estos pacientes a los que se les ha realizado una polipectomía permitirá la detección de lesiones de forma precoz, el intervalo de éstas se establece teniendo en cuenta el número de lesiones, el tamaño y las características histológicas de las mismas (Castells y Marzo 2009).

2.4 Diagnóstico y screening poblacional.

El CCR es una enfermedad prácticamente silente en su fase temprana, la sintomatología asociada a ésta ocurre generalmente en estadios avanzados y está asociada al crecimiento intraluminal del tumor, a la infiltración de estructuras cercanas o a la extensión a distancia.

I. INTRODUCCIÓN

Los síntomas más frecuentes asociados al CCR son la hematoquecia, el dolor abdominal, la anemia ferropénica, la debilidad general y el cambio en el hábito intestinal. Síntomas menos frecuentes y que generalmente se asocian a obstrucción intestinal son la distensión abdominal y la presencia de náuseas o vómitos. La aparición de síntomas relacionados con invasión locorregional o perforación hacia órganos de la vecindad como vejiga, vagina o intestino delgado; son raros y suelen indicar irresecabilidad.

La diseminación del CCR puede producirse por vía hematológica, por vía linfática, por vía peritoneal o por contigüidad. Al diagnóstico el 20% de los pacientes poseerán enfermedad metastásica linfática, hepática, pulmonar y/o peritoneal. (Smith RA *et al.* 2001)

- Diagnóstico del cáncer colorrectal.

El diagnóstico del CCR estará encaminado a localizar la lesión tumoral, así como determinar si existe enfermedad a distancia, afectación de órganos vecinos y si además hay otras lesiones sincrónicas. La valoración preoperatoria del paciente debe incluir una historia clínica detallada, una exploración física, un estudio radiológico y una valoración anatomopatológica de la lesión biopsiada para tener la máxima información de cara a determinar el estadio de la enfermedad, planificar el tratamiento e indicar el pronóstico.

Tabla I.4. HISTORIA CLÍNICA Y EXAMEN FÍSICO DIRIGIDOS A ESTRATIFICAR EL RIESGO DE CCR EN PACIENTES SINTOMÁTICOS.

PRESENCIA DE UNO O MÁS DE LOS SIGUIENTES SÍNTOMAS
<ul style="list-style-type: none"> • Masa abdominal o rectal palpable • Anemia por déficit de hierro • Rectorragia <ul style="list-style-type: none"> - Color (rojo oscuro frente a brillante) - Localización de la sangre en relación con las heces • Cambio en el hábito intestinal <ul style="list-style-type: none"> - Diarrea - Estreñimiento - Tenesmo - Urgencia o incontinencia • Pérdida de peso • Malestar abdominal • Síntomas perianales
CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS
<ul style="list-style-type: none"> • Edad • Sexo
FACTORES DE RIESGO
<ul style="list-style-type: none"> • Estilos de vida • Antecedentes personales de pólipos colorrectales • Antecedentes personales de EII (CU o EC) • Antecedentes familiares de CCR o pólipos • Predisposición genética
EXAMEN FÍSICO
<ul style="list-style-type: none"> • Peso y comparación con medidas previas • Exploración anal y rectal • Exploración abdominal (masas palpables) • Evaluación de la anemia (recuento celular, ferritina, volumen corpuscular) • Valorar test de SOHi

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal (CU: Colitis Ulcerosa; EC: Enfermedad de Crohn)

La técnica de elección para el diagnóstico del CCR es la colonoscopia completa, que posee una sensibilidad en la detección de tumores es del 90-95% y un índice de complicaciones del 0.1%, siendo las más importantes la perforación y la hemorragia. La exploración debe ser completa para identificar posibles lesiones sincrónicas (3-5%) o pólipos asociados al tumor (28%) y deben biopsiarse o researse todas aquellas lesiones que técnicamente sean posibles (Cunningham D *et al.* 2010, Codina A *et al.* 2003). En caso de que no se pueda completar la exploración, en el caso de neoplasias obstructivas o estenosantes, será necesario realizar un enema opaco con doble contraste, una colonografía o colonoscopia virtual, o una colonorresonancia y en casos en los que esto no sea posible una colonoscopia intraoperatoria (Pickhardt PJ *et al.* 2011).

El estudio de extensión se completará con un TC toraco-abdominal, pudiendo realizarse una RM hepática en el caso de sospecha de metástasis hepáticas en el TC y un PET-TC en caso de enfermedad metastásica resecable, para valorar posible afectación a distancia que haya pasado desapercibida en el resto de las pruebas de imagen. Los marcadores tumorales no son útiles para el diagnóstico, pero si lo serán para el seguimiento, ayudándonos a detectar recidivas tumorales de forma precoz.

En cuanto a las pruebas de imagen en el cáncer de recto, aparte de las realizadas para el cáncer de colon es importante la resonancia magnética (RM) pélvica y la Ecografía endorrectal que nos dará información complementaria y más precisa acerca de la afectación transmural y los ganglios afectados. Es muy importante el examen digital y la rectoscopia rígida, ya que nos darán información complementaria sobre la localización y extensión tumoral, relevante a la hora de valorar la respuesta a la neoadyuvancia y a la hora de planificar el tipo de intervención.

- Screening poblacional

El hecho de que el CCR sea prácticamente asintomático en sus fases tempranas, plantea la necesidad de un screening poblacional para realizar un diagnóstico precoz y aportar un beneficio en la población. Actualmente, las recomendaciones de la Sociedad Española de Gastroenterología para el cribado del CCR en nuestro medio, contemplan la realización de exploraciones en la población general adulta partir de los 50 años (población de riesgo medio), y antes de esa edad en personas con mayor riesgo de desarrollar CCR (Cubiella J et al. 2018)

Las recomendaciones establecidas con las siguientes:

- En población de riesgo medio se recomienda el cribado con una sola determinación de sangre oculta en heces inmunológica (SOHi) cada dos años entre los 50 y los 75 años. Se aconseja utilizar estrategias para minimizar los falsos negativos asociados a temperaturas superiores a 30 °C de la prueba.

I. INTRODUCCIÓN

- En población de riesgo medio no se recomienda el cribado mediante la detección de ADN en heces.
- En la población de riesgo medio no se recomienda el cribado poblacional con colonoscopia. La colonoscopia de cribado (directa o para evaluación de una prueba positiva) se debe realizar bajo sedación, en condiciones de limpieza adecuada, con intubación cecal y con un tiempo de retirada no inferior a los 6-8 min.
- Ante una colonoscopia previa completa y de buena calidad sin hallazgos significativos, se sugiere la vuelta al programa de cribado a los 10 años.
- En la población de riesgo medio se recomienda la sigmoidoscopia flexible como prueba de cribado de CCR, si está disponible. Se aconseja un intervalo entre sigmoidoscopia de cribado de 10 años.
- Tras la detección por sigmoidoscopia de un pólipo adenomatoso o de un pólipo serrado distal de tamaño superior a 10 mm o con displasia de alto grado se requiere la realización de una colonoscopia completa. No se recomienda la realización de una colonoscopia completa tras la detección por sigmoidoscopia de pólipos hiperplásicos distales.
- En la población de riesgo medio no se recomienda ofrecer la colonografía TC como estrategia de cribado del CCR. Se aconseja para la evaluación de una prueba de SOH positiva en individuos en los que está contraindicada la colonoscopia o con una colonoscopia incompleta por causa diferente a una mala limpieza colónica.
- En población de riesgo medio no se recomienda ofrecer la cápsula de colon como estrategia de cribado del CCR. Se sugiere ofrecer la cápsula endoscópica para la evaluación de una prueba de SOHi positiva en individuos en los que está contraindicada la colonoscopia o con colonoscopia incompleta por causa diferente a una mala limpieza colónica.
- No se recomienda el uso de biomarcadores en sangre periférica como prueba de cribado de CCR.

El cribado del CCR es coste-efectivo, con independencia de la estrategia empleada. La elección del método depende, entre otros factores, de la aceptación por el paciente y la disponibilidad de los recursos.

2.5. Clasificación TNM

Conocemos como estadificación a la clasificación por estadios del cualquier tipo de tumor; ésta se lleva a cabo en función de la extensión de la enfermedad, determinada por el grado de diseminación locorregional (pared del colon y ganglios linfáticos regionales) y el grado de diseminación a distancia (vía hematológica o vía linfática). Esta clasificación es fundamental a la hora de planificar el tratamiento adecuado a cada tipo de tumor, así como para establecer el pronóstico de dicha enfermedad.

Los sistemas de clasificación más frecuentes en el CCR son los de Dukes, Astler-Coller y el de el *American Joint Committee on Cancer* (clasificación. TNM)

En 1932 Dukes estableció un sistema de clasificación muy sencillo, en el se definían tres estadios, A, B y C; según el tumor invadiera la pared sin alcanzar la subserosa, sobrepasándola o afectara a los ganglios locorregionales respectivamente. Posteriormente este sistema de clasificación sufrió una serie de modificaciones, la más importante en 1954 llevada a cabo por Astler-Coller añadiendo a la clasificación los estadios B1 y B2, así como C1 y C2, según la afectación del espesor de la pared del colon. Más tarde en 1967, Turnbull añadió la “D” a la clasificación de Dukes para determinar aquellos tumores con metástasis a distancia.

El *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) establece en 1954 la primera clasificación TNM para el cáncer de colon y es en la actualidad la más utilizada. (<http://www.cancerstaging.org>). El sistema AJCC/TNM describe la extensión del tumor primario (T), la ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales (N), y la ausencia o presencia de metástasis a distancia (M). (Tabla I.5)

La etapa o estadio en el que se encuentra el tumor se designa en números romanos desde el “0” hasta el “4” y vendrá determinado por la combinación de las categorías T, N y M. (Tabla I.6)

I. INTRODUCCIÓN

Varios estudios evalúan la importancia pronóstica de diferentes características histológicas, moleculares y clínicas; sin embargo, el estadio del tumor sigue siendo el mejor indicador de pronóstico a largo plazo en el CCR. La tasa de supervivencia global a los 5 años es del 93% para el estadio I; 85% estadio IIA, 72% estadio IIB, 83% estadio IIIA, 64% estadio IIIB, 44% estadio IIIC y 8.1% estadio IIIC (O'Connell JB *et al.* 2004).

Tabla I.5. Clasificación TNM para el CCR. AJCC Cancer staging manual. 8th edition

T	TUMOR PRIMARIO
Tx	No se puede evaluar tumor primario.
T0	No hay evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ o intramucoso (afecta lámina propia, sin rebasar la muscularis propia.
T1	Invasión de la submucosa.
T2	Invasión de la muscularis propia sin sobrepasarla.
T3	Invasión de la serosa o grasa pericólica.
T4	Invasión de órganos adyacentes y/o perfora el peritoneo visceral.
T4a	El tumor afecta a la superficie serosa por extensión directa del tumor.
T4b	El tumor invade directamente órganos o estructuras adyacentes.
N	GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES
Nx	No se pueden evaluar ganglios linfáticos regionales.
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales. Células tumorales aisladas subcapsulares o marginales <0.2mm.
N1	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales. Micrometástasis 0.2-2mm.
N1a	Metástasis en 1 ganglio linfático regional
N1b	Metástasis en 1-2 ganglios linfáticos regionales
N1c	Depósitos tumorales satélites en la subserosa, mesenterio o tejidos no peritonizados pericólicos o perirrectales sin metástasis regionales.
N2	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.
N2a	Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales.
N2b	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales.
M	METÁSTASIS A DISTANCIA
M0	No hay metástasis a distancia.
M1	Hay metástasis a distancia.
M1a	Metástasis confinadas a un órgano (hígado, pulmón, ovario, ganglios linfáticos no regionales)
M1b	Metástasis en más de un órgano o peritoneo.
M1c	Metástasis en la superficie peritoneal aislada o con metástasis en otros órganos

Tabla I.6. Estadificación CCR. AJCC Cancer Staging manual. 8th edition.

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1,T2	N0	M0
Estadio II IIa IIb IIc	T2,T3 T3 T4a T4b	N0	M0
Estadio IIIA	T1, T2 T1	N1 N2a	M0
Estadio IIIB	T3, T4a T2, T3 T1,T2	N1 N2a N2b	M0
Estadio IIIC	T4a T3, T4a T4b	N2a N2b N1, N2	M0
Estadio IVa	Cualquier T	Cualquier N	M1a
Estadio IVb	Cualquier T	Cualquier N	M1b
Estadio IVc	Cualquier T	Cualquier N	M1c

2.6 Manejo clínico y tratamiento

Tratamiento quirúrgico del cáncer de colon

El tratamiento del cáncer de colon consiste en la resección quirúrgica del tumor primario asociado a la exéresis del tejido linfático circundante, el objetivo de la cirugía será llevar a cabo una resección curativa.

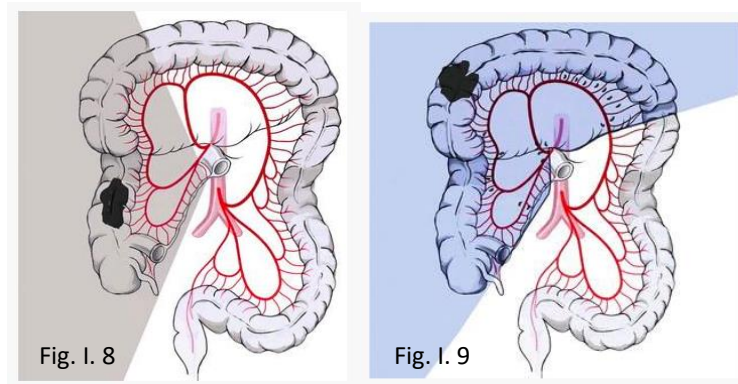
Toda intervención quirúrgica debe iniciarse con la estadificación intraoperatoria, inspeccionando y/o palpando el hígado y el peritoneo para descartar que existe enfermedad a distancia.

A la hora de definir la extensión de la resección cólica hay que tener en cuenta tanto los márgenes proximales y distales, que deben ser de al menos 5 cm, como la realización de una linfadenectomía adecuada; debemos de tener en cuenta también el soporte vascular, si el tumor se localiza entre dos vasos principales, ambos deben ligarse en origen. Las recomendaciones actuales son la exéresis de al menos 12 ganglios para

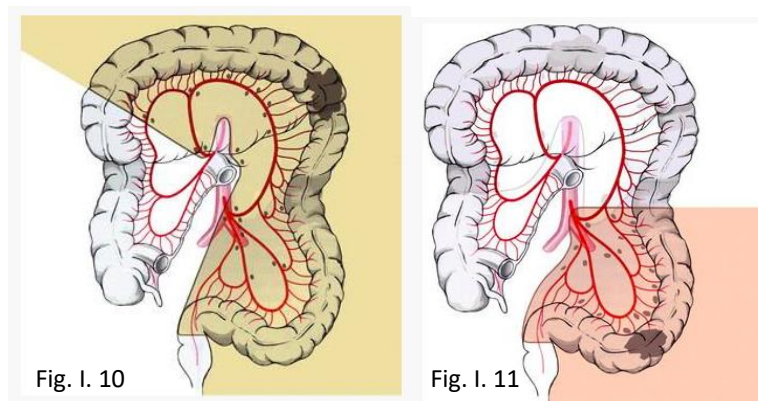
una correcta estadificación tumoral; que nos va a proporcionar información pronóstica y nos va a guiar en la indicación del tratamiento adyuvante. La resección en bloque de los órganos adheridos podría ser necesaria en tumores avanzados para realizar una resección R0 (Cunningham D *et al.* 2010).

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

- Hemicolecotomía derecha, se realiza generalmente para tumores que asientan desde el ciego hasta la parte proximal del colon transverso (Fig. I.8), en el caso de tumores del colon transverso o tumores en ángulo esplénico se realizará una hemicolecotomía derecha ampliada (Fig. I.9)



- Hemicolecotomia izquierda, en tumores localizados en la parte distal del colon transverso o colon descendente. (Fig. I.10)
- Sigmoidectomía, en el caso de cáncer de colon sigmoide. (Fig. I.11)



I. INTRODUCCIÓN

En pacientes con tumores múltiples, la colectomía total en principio no es mandatoria, la extensión de la resección debe seguir los principios de radicalidad descritos previamente; sin embargo, muchos pacientes esta avocados a una colectomía subtotal con anastomosis ileorrectal.

En los síndromes hereditarios, como es el caso de la PAF, debe realizarse una colectomía profiláctica para evitar el desarrollo de CCR. En el caso del SL, dado que presentan un riesgo incrementado de desarrollar tumores metacrónicos y una progresión más rápida desde adenoma a carcinoma, se recomienda la realización de resecciones extensas (colectomía o proctocolectomía total) en pacientes jóvenes para el tratamiento de las neoplasias colorrectales (de Jong AE *et al.* 2004, Castell y Marzo 2009, Jaspersen KW *et al.* 2010).

En el caso de enfermedad metastásica, la resección de estas metástasis puede realizarse de manera simultánea o en otro tiempo quirúrgico, en el caso de afectación hepática la resección simultánea se relaciona con una elevación en la morbi-mortalidad postoperatoria en pacientes mayores de 70 años, por lo que este tipo de abordaje debe llevarse a cabo en dos tiempos, si fuera posible.

En casos urgentes debe realizarse un procedimiento radical si fuera posible, la obstrucción intestinal puede manejarse colocando un stent intraluminal y realizando cirugía electiva posterior.

Los procedimientos locales en el cáncer de colon se consideran oncológicamente adecuados, sólo si la resección es de espesor completo (R0), el tumor está confinado a la mucosa (pT1), su grado de diferenciación es bueno o moderado (G1-G2), no existe invasión linfática (L0) ni vascular (V0) y el diámetro tumoral es menor de 3cm.

Tratamiento quirúrgico del cáncer de recto

El tratamiento quirúrgico del cáncer de recto presenta consideraciones especiales. Con intención curativa, actualmente se contemplan cuatro opciones: resección local, resección anterior con anastomosis, intervención de Hartmann y la amputación abdominoperineal.

1. Tratamiento local:

El tratamiento local en el cáncer de recto consiste en la exéresis del espesor completo de la pared rectal para obtener un espécimen que permita la diferenciación entre un tumor T1-T2. El TAMIS (transanal minimally invasive surgery) y el TEM (transanal endoscopic microsurgery), son técnicas preferibles a la escisión transanal convencional debido a la disminución del riesgo de resección incompleta (Christoforidis D *et al.* 2009, Qi Y *et al.* 2011).

La escisión local en el cáncer de recto es aplicable en estadios precoces, limitados a la mucosa y con diámetros menores de 3 cm, sin evidencia de afectación linfática ni venosa extramural valoradas por RM. La presencia de factores anatomopatológicos de mal pronóstico: margen afecto, invasión submucosa nivel 3, invasión linfovascular o perineural, tumores con componente mucinoso o anillo de sello, sería indicación de llevar a cabo una cirugía más radical (Chang AJ *et al.* 2008).

El riesgo de afectación ganglionar es del 0-12% y la recurrencia local a los 5 años es del 0-24% para tumores T1 tratados con escisión local.

En determinados casos, como pacientes de edad avanzada o con enfermedades asociadas y alto riesgo quirúrgico para procedimientos radicales, se puede plantear la resección local fuera de protocolo.

2. Resección anterior

La cirugía radical en el cáncer de recto implica la resección del recto y del mesorrecto, para conseguir el control local de la enfermedad. La resección anterior es una técnica que se puede emplear en tumores avanzados localizados en el tercio superior o medio del recto. Actualmente, se considera que el margen distal es suficiente con 2 cm, adquiriendo una mayor importancia el margen de resección circunferencial y el concepto de escisión total del mesorrecto. Existe margen circunferencial afecto cuando existen células tumorales a menos de 1 mm del margen radial de la muestra, este hecho ha demostrado ser un importante predictor en la recurrencia local y la supervivencia.

La escisión total del mesorrecto, o técnica de disección aguda del mesorrecto respetando planos embriológicos, fue descrita por *Heald* y popularizada en los años 80. Esta técnica asegura una exéresis tumoral adecuada, asegurando el menor daño nervioso posible (Fig. I.12). La publicación original describe una recurrencia local del 3.7% sin quimiorradioterapia, siendo esta del 20-30% en el caso de realizarse una disección menos precisa. Se ha comprobado que es una técnica factible, segura y su abordaje laparoscópico no parece implicar ninguna desventaja oncológica (Leroy J *et al.* 2004, Leroy J *et al.* 2004a, Piso P *et al.* 2004).

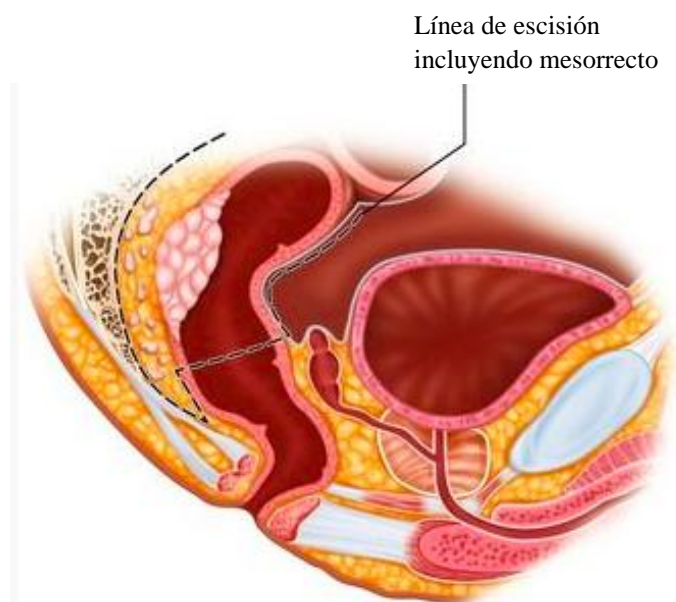


Fig. I.12

En ocasiones es conveniente realizar una ileostomía de protección en casos de anastomosis muy bajas o en pacientes con importante comorbilidad asociada, evitando la temida fuga anastomótica y sus consecuencias. Una alternativa novedosa para proteger anastomosis de alto riesgo es la ileostomía virtual descrita por Sacchi et al (Sacchi M et al. 2011)

El estudio *COLOR II* concluyó que la escisión total de mesorrecto realizada con abordaje laparoscópico o abierto, tenía resultados oncológicos comparables, pero los datos en cuanto a la estancia hospitalaria, la infección de herida y el sangrado eran favorables para el abordaje laparoscópico (Jaap Bonjer *et al.* 2015) Estos hallazgos han sido cuestionados por dos ensayos clínicos (*ALaCaRT* y *ACOSOG Z6051*), que no han demostrado la superioridad de la laparoscopia frente a la cirugía abierta en cuanto a la resección quirúrgica adecuada y concluyeron que los hallazgos no aportaban la suficiente evidencia para establecer de rutina el abordaje laparoscópico (Stevenson A *et al.* 2015; Fleshman J. *et al.* 2015). La cirugía robótica podría ser un instrumento valioso para la disección pélvica, mientras que la ETM por vía transanal podría disminuir las dificultades técnicas para la disección que encontramos en pacientes con pelvis estrechas y mesorrectos prominentes.

3. Amputación abdominoperineal.

La Amputación abdominoperineal (AAP) fue desarrollada por Miles en los países anglosajones a comienzos del siglo XX (Galler AS *et al.* 2011). Está indicada en tumores de recto en los que una exéresis curativa no permite conservar el aparato esfinteriano, así como para tumores del canal anal. Se considera una técnica en regresión, puesto que un porcentaje elevado de pacientes con cáncer de recto pueden someterse a una cirugía preservadora de esfínteres, además muchos cirujanos colorrectales y pacientes consideran la preservación esfinteriana y de la continuidad intestinal como un marcador de calidad en la cirugía del cáncer de recto.

La intervención consiste en la resección del sigma, recto y ano y la confección de una colostomía permanente.

I. INTRODUCCIÓN

La decisión de hacer una AAP o una intervención con preservación de esfínteres debe de tomarse antes de iniciar el tratamiento neoadyuvante; es decir que el posible efecto de reducción tumoral inducido por la radioterapia preoperatoria no debe de modificar la indicación de amputación si en el estudio preoperatorio existe evidencia de afectación esfinteriana (NIH consensus conference 1990).

El concepto de amputación extraelevadora se introdujo con el objetivo de mejorar los resultados en cáncer de recto bajo localmente avanzado. La parte abdominal de la intervención se realiza por el mismo plano de la ETM, pero el mesorrecto no se libera de los músculos elevadores. El paciente se cambia a posición de prono para completar el tiempo perineal, resecaando el ano y el recto bajo hasta llegar al plano de los elevadores. El resultado de esta intervención es una pieza con forma de cilindro, que evita la característica muesca de la unión anorrectal en la amputación convencional.

Si la función esfinteriana está intacta:

- En tumores entre 11 - 15 cm de distancia del margen anal estaría indicado realizar una resección anterior baja con ETM o resección anterior alta con EPM (en el caso de tumores en unión RS).
- Tumores entre 6-10 cm de margen anal la cirugía ideal sería una RAB + ETM.
- En tumores entre 5 y 0 cm del margen anal estaría indicada la amputación abdomino-perineal, pudiendo realizarse una resección anterior ultra baja con ETM (siempre y cuando se pueda asegurar un margen de seguridad distal de 2cm).

Si la función esfinteriana está alterada; lo ideal en todos los casos sería realizar una amputación abdomino-perineal.

Tratamiento adyuvante

El requisito fundamental para indicar tratamiento adyuvante es que se haya llevado a cabo una exéresis completa del tumor (R0). La indicación se basará en si existen

o no metástasis linfáticas (pN), determinadas por el estudio histopatológico de al menos 12 ganglios linfáticos.

Está contraindicado el tratamiento adyuvante en aquellos casos en los que no se haya podido llevar a cabo una exéresis tumoral completa (R0), pacientes cirróticos (Child B o C), pacientes con insuficiencia cardíaca (NYHA III o IV), insuficiencia renal preterminal o terminal, aplasia medular o incapacidad para llevar a cabo el seguimiento requerido.

En el caso del cáncer de colon, la neoadyuvancia, radioterapia o quimiorradioterapia generalmente no están indicadas. En tumores no obstructivos con metástasis a distancia, el tratamiento neoadyuvante puede ser una opción para controlar de la enfermedad antes de la intervención. En cuanto al cáncer de recto, el estudio alemán CAO/ARO/AIO 94, demostró una incidencia significativamente menor de recurrencia local y toxicidad, y una mayor incidencia de preservación de esfínteres con tratamiento neoadyuvante en comparación con quimiorradioterapia postoperatoria. Desde entonces, el tratamiento neoadyuvante se considera el tratamiento de elección en el cáncer de recto estadio II y III (Cunningham D et al. 2010).

La quimioterapia adyuvante está indicada en pacientes con cáncer de colon estadio III. Numerosos ensayos clínicos randomizados, han demostrado una reducción significativa en la recurrencia y una mejoría en la supervivencia global tras tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU) / Acido folínico, mientras otros estudios han demostrado que el 5-FU/Acido folínico, asociado a Oxaliplatino mejoran significativamente la supervivencia libre de enfermedad. En pacientes en los que exista contraindicación para utilizar Oxaliplatino, podría utilizarse una fluoropirimidina en monoterapia. Lo recomendable es el tratamiento por vía oral y dada la elevada toxicidad, la administración en bolos intravenosos debe evitarse. (Van Cutsem *et al.* 2014)

La terapia adyuvante esta contraindicada en cáncer de colon estadio II, pero como anteriormente se ha comentado en determinados escenarios en los que exista un riesgo

elevado de recurrencia puede considerarse, pero siempre dentro de ensayos clínicos controlados. (Argilés G. *et al.* 2020)

La quimioterapia (QT) en el cáncer de recto, se basa en regímenes de 5-FU o su profármaco oral, la capecitabina. Otros fármacos como el oxaliplatino, el irinotecan o los nuevos agentes biológicos, han demostrado mejorar la supervivencia en pacientes con enfermedad sistémica. El valor de la QT adyuvante para tumores de recto estadio III o estadio II de alto riesgo, aconsejada por muchos oncólogos en analogía al tratamiento adyuvante para el cáncer de colon, es controvertida, ya que el 20-25% de los pacientes desarrolla enfermedad sistémica a pesar de control local en la pelvis. La QT postoperatoria en pacientes tratados con quimio-radioterapia preoperatoria no está basada en una evidencia científica sólida. Los ensayos clínicos actuales están investigando el efecto preoperatorio de la radioterapia (RT) y la QT preoperatoria a dosis plenas.

La supervivencia específica a los 3 años tras cáncer de recto es del 84.8% en pacientes con enfermedad locorregional, alrededor de un 20% de estos pacientes desarrollarán enfermedad sistémica en los 5 años siguientes tras tratamiento con intención curativa, siendo la mediana de supervivencia para estos pacientes es de 13.4 meses. La tasa de recurrencia a los 5 años para tumores de recto T1-T3 es del 4.2% en pacientes tratados con RT preoperatoria y del 4.9 en pacientes tratados solo con cirugía. En tumores T4 la recurrencia local a los 5 años es del 9.3%.

Tratamiento paliativo

Existen diferentes tipos de tratamiento paliativo que se instaurarán teniendo en cuenta la situación del paciente (cirugía, tratamiento endoscópico, radioterapia, quimioterapia, radiología intervencionista, etc.). La cirugía debe realizarse con intención exclusivamente paliativa, con el objetivo claro de intentar minimizar las complicaciones que pueden surgir con la evolución del tumor primario; estenosis, sangrado e infiltración tumoral de órganos vecinos. Si no pudiera llevarse a cabo la resección del tumor primario, podría indicarse una derivación digestiva o un estoma. Si el tumor no fuera resecable las

opciones terapéuticas dependerán del estado general del paciente y de la comorbilidad de este.

Las diferentes estrategias pueden ir desde:

- Convertir un tumor irresecable en resecable (especialmente en el caso de metástasis pulmonares o hepáticas)
- Prolongar la progresión libre de enfermedad
- Aportar a los enfermeros las mejores medidas de confort durante su enfermedad

2.7 Seguimiento

A pesar del esfuerzo puesto en la cirugía y tratamiento sistémico, entre un 25-50% de los pacientes intervenidos con estadio II o III, tendrán una recurrencia después del tratamiento inicial. El seguimiento estrecho de estos pacientes en los 5 años siguientes a la intervención ha demostrado que el diagnóstico de la recidiva y el posible tratamiento de esta, pueden mejorar la supervivencia de la población (Baca B *et al.* 2011)

Existen diferentes guías de seguimiento recomendadas por distintas sociedades científicas nacionales e internacionales, que publican periódicamente sus guías para el seguimiento del paciente intervenido de CCR.

El régimen de seguimiento deberá adaptarse al estadio tumoral. En pacientes con E I, el riesgo de recurrencia tras una resección R0 es bajo; en estos pacientes la realización de una colonoscopia a las 2-3 años de la intervención sería suficiente para identificar de forma precoz tumores secundarios. Este régimen de seguimiento sería diferente para tumores con mayor riesgo de recurrencia (G3/G4, afectación linfovascular, tumores perforados) en estos casos debería incluirse en el seguimiento una detección de niveles de CEA cada 6 meses hasta los 5 años de la intervención, así como un TC de tórax abdomen y pelvis cada 6 meses durante los dos primeros años y posteriormente cada año hasta el quinto año de la intervención.

3. CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO.

El CCR representa una de las patologías tumorales con mayor número de casos familiares, con un porcentaje aproximado del 30% de tumores atribuibles a causas heredadas (Binefa *et al.* 2014). Dentro de este 30% debemos distinguir entre CCR hereditario y el CCR familiar: El CCR hereditario es aquel en el que se identifica un claro modelo de transmisión, generalmente una alteración genética en una línea germinal (1-5%), dentro de este tipo de CCR se incluye el SL (2-5%) y la PAF entre otros. El CCR familiar constituye el 20-30% restante, en él que se observa una agregación de casos familiares, pero no se asocia a un claro patrón hereditario, dentro de este grupo se encontraría, por ejemplo, el síndrome familiar tipo X (Shiovitz *et al.* 2014).

3.1 SÍNDROME DE LYNCH

Concepto y variantes

El síndrome de Lynch es la forma más frecuente de CCR hereditario, representando entre un 1-3% de todos los CCR diagnosticados; es un síndrome con un patrón hereditario autosómico dominante que se asocia al desarrollo de tumores de varias estirpes celulares (Lynch HT *et al.* 2009).

Los pacientes con este síndrome tienen un riesgo del 60-80% de desarrollar CCR a lo largo de su vida. Este tipo de tumores tienen una serie de características especiales; se desarrollan a una edad más precoz que en la población general, habitualmente antes de los 50, poseen una carcinogénesis acelerada, suelen localizarse en colon proximal y están asociados a tumores sincrónicos (18%) o metacrónicos (24%) (Lynch HT. *et al.* 2009). Desde el punto de vista anatomopatológico poseen una histología mucinosa con células en anillo de sello, de crecimiento medular, bajo grado de diferenciación celular, infiltración linfocitaria y reacción Crohn-like (Jetkins MA *et al.* 2007).

Además de CCR, estos pacientes poseen un riesgo aumentado de desarrollar principalmente cáncer de endometrio, que en las mujeres es el segundo tumor más frecuente; 40-60% a lo largo de la vida; también presentan mayor riesgo de cáncer de estómago, páncreas, sistema urinario, ovario, vías biliares e intestino delgado. (Watson P *et al.* 2008; Kastrinos F *et al.* 2014). Con menor frecuencia pueden presentar tumores cerebrales (glioblastoma) o cutáneos (queratoacantomas, adenomas o adenocarcinomas sebáceos), combinaciones que reciben el nombre de Síndrome de Turcot y Síndrome de Muir-Torre respectivamente (Hamilton SR *et al.* 1995)

Los individuos afectados por el SL pueden desarrollar pólipos colónicos con más frecuencia que la población general, sin embargo, la poliposis es infrecuente. Estos pólipos poseen unas características determinadas: aparecen a edades más temprana, tienen un tamaño mayor e histológicamente tienen mayor capacidad de degeneración. (Jasperson KW *et al.* 2010, Cappell. 2008, Kastrinos F *et al.* 2014, Vasen *et al.* 2007).

El SL está causado por una mutación germinal en alguno de los genes reparadores de ácido desoxirribonucleico (ADN) (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* Y *PMS2*), un sistema clave para mantener la integridad de ADN durante su replicación celular. Recientemente se ha identificado un nuevo silenciamiento epigenético del promotor del gen *MSH2*, secundario a la delección en el extremo 3' del gen *EPCAM* (Ligtenberg MJL *et al.* 2009). Estas alteraciones dan lugar a la acumulación de secuencias genéticas llamadas microsatélites y mutaciones en genes supresores (*TGF*, *BRII* y *BAX*).

Existe una correlación genotipo-fenotipo de las mutaciones en los genes reparadores. *MLH1* se asocia con mayor riesgo de desarrollar CCR a una edad más precoz, *MSH2* se asocia con mayor riesgo de tumores extracolónicos, y *MSH6* con mayor riesgo de cáncer de endometrio; mientras que mutaciones en *PMS2* se relacionan con menor riesgo de desarrollar tanto CCR como endometrial (15- 20%) en comparación con portadores de otras mutaciones (Balmaña J. *et al.* 2010).

Diagnóstico

El diagnóstico del SL supone un reto en la práctica clínica habitual, ya que los pacientes con este síndrome no poseen unas características fenotípicas específicas. La sospecha clínica se establece en la historia personal y familiar del paciente, pero el diagnóstico de certeza requiere la identificación de la mutación germinal en alguno de los genes reparadores del ADN (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM). Sin embargo, hoy en día no se realiza examen genético a todos los pacientes que han presentado CCR.

La identificación de la mutación requiere un análisis molecular a nivel tumoral y una confirmación posterior con un análisis genético de la línea germinal (Palomaki GE et al. 2009).

Como se ha indicado previamente, la alteración del sistema reparador de ADN produce acumulación de mutaciones somáticas que afectan a fragmentos repetitivos de ADN (microsatélites), distribuidos a lo largo del genoma, fenómeno denominado Inestabilidad de microsatélites (IMS), la pérdida de expresión de la proteína correspondiente al gen mutado es detectable en la biopsia tumoral por inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica nos ofrece la ventaja de dirigir el análisis genético del gen que codifica la proteína no expresada.

En el caso de pérdida de expresión para *MLH1* y *PMS2* hay que tener en cuenta que entre el 75-80% de los pacientes con ésta pérdida de expresión es secundaria a una hipermetilación de promotor de *MLH1*, sin que exista mutación germinal, y por tanto no se tratará de un SL, para el diagnóstico diferencial, podemos determinar la mutación somática del gen *BRAF* (*V600E*), ya que ésta se asocia a tumores con hipermetilación de *MLH1* (Bessa X et al. 2008). Por tanto, en pacientes con IMS para alguna de las proteínas reparadoras del ADN (habiendo descartado hipermetilación de *MLH1*), debe investigarse la presencia de mutaciones germinales en los genes reparadores de ADN (Rodríguez-Bigas MA et al. 1997). En la Fig I.13, se describe este algoritmo diagnóstico.

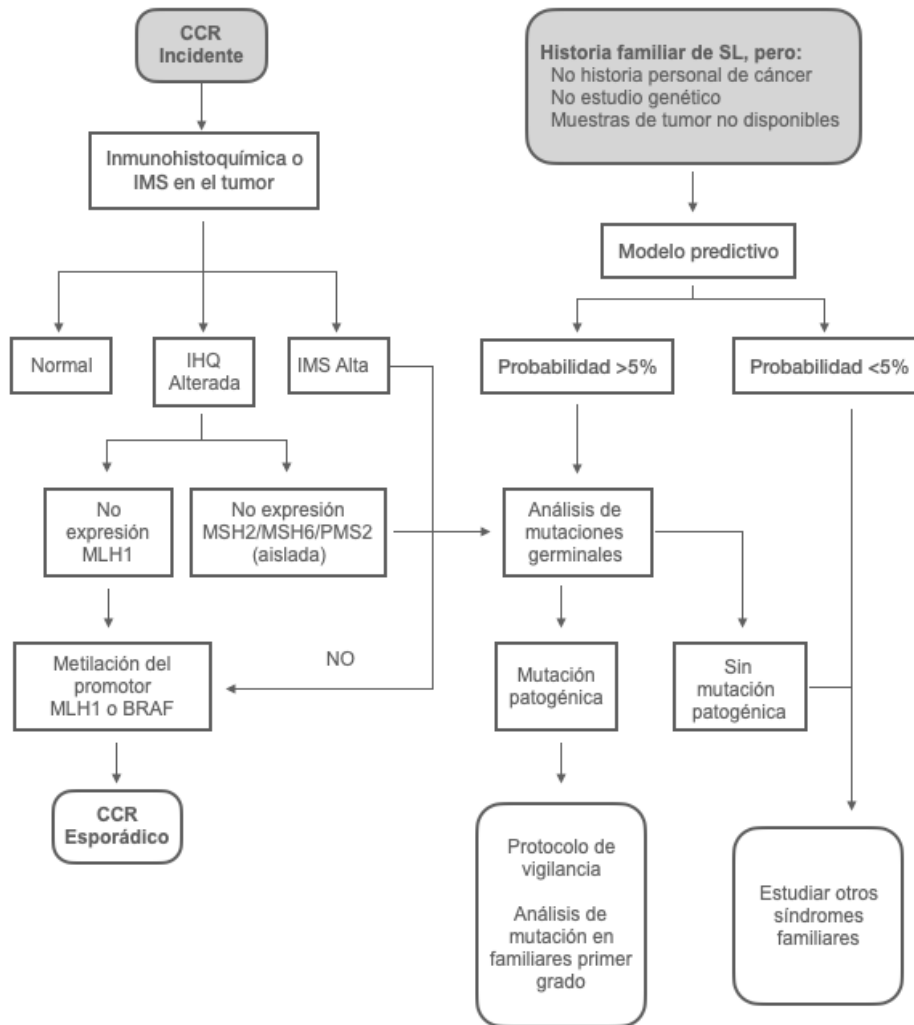


Fig I.13 Estrategia diagnóstica síndrome de Lynch

La mayoría de los casos de SL en la práctica clínica habitual pasan desapercibidos, lo que conlleva a la ausencia de aplicación de medidas preventivas y a una mayor mortalidad asociada al CCR. A lo largo de los años se han sugerido varios criterios clínicos para la identificación de pacientes con CCR que deberían someterse a un estudio genético. Hoy en día existen dos enfoques; o bien realizar un estudio molecular universal, mediante la identificación de IMS en todo paciente con CCR o una estrategia más selectiva en la que sólo se aplicará este estudio a aquellos pacientes que cumplan una serie de criterios diagnósticos. (Balmaña J *et al.* 2010, Rodríguez-Moranta F *et al.* 2006)

I. INTRODUCCIÓN

Desde la descripción de este síndrome, los criterios de Bethesda (Boland CR. *et al.* 1998) han sido los más utilizados para realizar el cribado de la población a la que se debería de realizar el cribado molecular, pero su complejidad era un obstáculo en la práctica clínica habitual. Posteriormente se propusieron los criterios de Jerusalén, que abogaban por realizar un examen molecular tumoral de todo paciente con CCR <70a.

La rentabilidad diagnóstica de estrategia universal ha sido valorada y comparada, observándose que es superior a los criterios de Bethesda (12-28% más casos identificados) y a los criterios de Jerusalén (15% más de casos identificados) (Canard G *et al.* 2002; Moreira L *et al.* 2012). La NICE (National Institute for health and care excellence), publica en 2015 una comparativa de costefectividad entre las diferentes estrategias diagnósticas de SL (Ladabaum U *et al.* 2015), concluyendo que en las estrategias dirigidas no hay una clara diferencia entre ellas siendo la estrategia universal de mayor costefectividad.

Tabla I.7 Criterios para el diagnóstico del síndrome de Lynch.

CRITERIOS AMSTERDAM I
Mínimo tres individuos con CCR: <ol style="list-style-type: none">1. Uno de los afectados, familiar de primer grado de los otros 2.2. Mínimo dos generaciones consecutivas afectadas.3. Mínimo 1 caso diagnosticado antes de los 50 años.4. Exclusión del diagnóstico de PAF.5. Confirmación histológica tumoral.
CRITERIOS AMSTERDAM II
Mínimo tres individuos con CCR o tumor asociado a Lynch (endometrio, estómago, ovario, páncreas, uréter y pelvis renal, tracto biliar, glioblastoma, adenomas sebáceos, queratoacantomas e intestino delgado). <ol style="list-style-type: none">1. Uno de los afectados es familiar de primer grado de los otros 2.2. Mínimo dos generaciones consecutivas afectadas.3. Mínimo 1 caso diagnosticado antes de los 50 años.4. Exclusión del diagnóstico de PAF.5. Confirmación histológica tumoral.
CRITERIOS REVISADOS DE BETHESDA
<ol style="list-style-type: none">1. Un paciente con CCR diagnosticado con < de 50 años.2. CCR sincrónico o metacrónico u otro tumor asociado a Lynch, independientemente de la edad del diagnóstico.3. Paciente con CCR con histología de tumor con IMS diagnosticado antes de los 60 años.4. Paciente con CCR con 1 o más familiares de primer grado con un tumor asociado a Lynch, diagnosticado < 50 años.5. Paciente con CCR con 2 o más familiares de primer grado o segundo grado, con un tumor asociado a Lynch, independientemente de la edad. Tumores asociados a SL: endometrio, estómago, ovario, páncreas, uréter, pelvis renal, tracto biliar, cerebral (glioblastoma), adenomas sebáceos, queratoacantomas e intestino delgado.
RECOMENDACIONES DE JERUSALÉN
Análisis molecular tumoral (IMS y/o inmunohistoquímica) en todo CCR diagnosticado < 70 años.
ESTRATEGIA UNIVERSAL
Análisis molecular tumoral (IMS y/o inmunohistoquímica) en todo CCR diagnosticado independientemente de la edad.

Hasta día de hoy se conocen más de 300 mutaciones germinales diferentes asociadas al SL, la mayor parte de ellas localizadas en los genes *MSH2* y *MLH1* (Lynch HT *et al.* 2003).

Cribado del CCR en el Síndrome de Lynch

El cribado en el SL va dirigido a la identificación y resección de pólipos, así como a la detección precoz de carcinomas. Varios estudios han demostrado que el cribado del CCR en el SL se asocia a una disminución del 60% en la incidencia de CCR y un descenso en la mortalidad global con respecto a la no realización del cribado. (Vasen HF *et al.* 2007, 2010).

Un ensayo clínico no aleatorizado publicado en el año 2000, realizado con individuos perteneciente a familias con SL, con un seguimiento a 15 años muestra que el cribado endoscópico (colonoscopia cada 3 años) se asocia a una disminución en la incidencia de CCR del 62% ($p=0.02$) y del 66% en la mortalidad global ($p=0.003$) en relación con la no realización de cribado (Järvinen HJ *et al.* 2000) El registro nacional danés de CCHNP, con un seguimiento poblacional de 24 años y realización de controles endoscópico cada 2 años en pacientes con SL, demostró una incidencia de CCR del 2% durante el seguimiento (Lindberg LJ *et al.* 2016).

Se recomienda la colonoscopia completa anual a partir de los 20-25 años, o 10 años antes de la edad de diagnóstico del CCR en el familiar afecto más joven, escogiendo la opción que primero ocurra. El límite superior no queda establecido, continuando el seguimiento según el estado de salud del individuo. El hecho de que los pólipos en el SL, tienen capacidad de progresión a carcinoma de forma más rápida que en la población general, 2 o 3 años, plantea la necesidad de una periodicidad corta, 1 o 2 años, en la realización de los controles endoscópicos (Lynch P *et al.* 2000, Vasen HF *et al.* 1995).

La mayoría de las lesiones (62%) que se detectan durante el seguimiento se localizan en el colon derecho; y aproximadamente el 30% son relativamente pequeñas (<

3 cm). Por ello, algunos estudios sugieren que la realización de la colonoscopia con técnicas de imagen avanzadas, como la cromoendoscopia y las imágenes de banda estrecha, podrían incrementar la tasa de detección de adenomas (Vasen *et al.* 2010).

Tratamiento del CCR en el Síndrome de Lynch

Teniendo en cuenta el riesgo asociado que presentan los pacientes jóvenes con SL de desarrollar tumores sincrónicos y metacrónicos a lo largo de su vida; así como la progresión rápida de la secuencia adenoma carcinoma, la posibilidad de lesiones planas precursoras difíciles de tratar endoscópicamente y la calidad de vida similar entre colectomía extensa y colectomía segmentaria, cada vez se recomienda más en estos pacientes la realización de una colectomía total o proctocolectomía (Vasen *et al.* 2007; Balmaña J *et al.* 2010; Herzig Do *et al.* 2017). Por tanto, cada vez se indica más la realización de colectomía total en pacientes con SL, aunque debemos de tener en cuenta la edad, la presencia de comorbilidades, la opinión del paciente y la localización del tumor; a la hora de tomar esta decisión. La colectomía profiláctica hoy en día no está indicada, salvo en aquellos pacientes que intuyamos que por sus características no podrán llevar a cabo un screening adecuado.

Debemos de tener en cuenta que estos pacientes poseen un riesgo elevado de desarrollar una segunda neoplasia colorrectal a los 10 años, del 16% en el caso de colectomía segmentaria y del 3% en caso de colectomía total. El riesgo de desarrollar un cáncer de recto en el segmento rectal preservado tras la cirugía es del 12% a los 12 años. Este elevado riesgo de lesiones metacrónicas justificaría una vigilancia endoscópica estrecha cada 1 a 3 años, según las características del paciente (Balmaña J *et al.* 2010; Jaspersen KW *et al.* 2010).

Síndrome de Lynch Like

Los pacientes englobados dentro de este síndrome son aquellos que presentan tumores con IMS y/o pérdida de expresión proteica sin metilación de *MLH1* y con *BRAF* no mutado, en los que no se ha encontrado una mutación germinal en los genes

reparadores del ADN. Secundariamente al cribado universal del SL, el número de pacientes con SL-Like es cada vez más numeroso. (Carethers JM *et al.* 2014)

La etiología de esta entidad hoy en día no está clara y se han propuesto varias explicaciones. Podría deberse a mutaciones desconocidas en el sistema de reparación del ADN (*EPCAM*), mutaciones germinales en otros genes no relacionados con SL hasta el momento, solapamientos con otros síndromes hereditarios o mutaciones somáticas esporádicas (hasta un 50% de los casos) (Carethers JM *et al.* 2014)

El riesgo de CCR en estas familias es menor que en el SL, pero mayor que en la población general. El estudio EPICOLON, reporta una tasa de incidencia del 6.04% para el SL y del 2.12% para el SL-Like ($p < 0.05$), siendo el riesgo de neoplasias extracolónicas más bajo (Rodríguez-Soler M *et al.* 2013).

El diagnóstico de este síndrome no está bien establecido hoy en día, pero basándose en la evidencia actual, irá encaminado a excluir mutaciones germinales en otros genes (por medio del uso de paneles “multigen”), así como al estudio somático de los genes reparadores y otros genes.

Cáncer colorrectal familiar tipo X

Se engloban dentro de este tipo de síndrome familiar, aquellos pacientes que cumplen criterios de Ámsterdam, pero cuyos tumores no poseen alteraciones en el sistema de reparación del ADN (Lindor LM *et al.* 2005). El riesgo de desarrollar CCR en estos pacientes es menor al observado en el SL y no existe un incremento del riesgo de desarrollar otras neoplasias asociadas.

Estudios recientes sugieren una etiología heterogénea, y se han relacionado con mutaciones germinales como *BMPRIA* (asociado a la poliposis juvenil), *RPS20*, *SEMA4A*, *WIFI* y *HNRNPAO* (Wei C *et al.* 2015, Schultz E *et al.* 2014, Nieminen TT *et al.* 2011 y 2014)

En el estudio del grupo danés, se reporta una incidencia de CCR en el seguimiento endoscópica bianual de estas familias de un 0.4%. Por este motivo se sugiere que el control endoscópico de estos individuos puede alargarse y realizarse cada 5 años (Lindberg LJ *et al.* 2016)

3.2 POLIPOSIS COLORRECTALES

Las poliposis colorrectales constituyen un grupo de síndromes caracterizados por la aparición de múltiples pólipos en el intestino grueso. Se clasifican en tres grupos, en función de la histología del pólipo que las constituye:

1. Pólipos adenomatosos o adenomas (poliposis adenomatosa)
2. Pólipos serrados (poliposis serrada)
3. Hamartomas o pólipos juveniles (síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Coeden)

Existen pólipos colorrectales debidos a la presencia de mutaciones germinales en genes supresores de tumores, como *APC* o *MUTYH* (poliposis adenomatosa familiar), *SKT11* (Síndrome de Peutz Jeghers) o *PTEN* en el síndrome de Cowden.

A menudo estos síndromes se relacionan con la aparición de pólipos en otras localizaciones del tracto digestivo y en ocasiones se asocian a manifestaciones extradigestivas.

El objetivo de la vigilancia y el tratamiento de los individuos que poseen estos síndromes es disminuir la incidencia y la mortalidad secundaria a neoplasias CCR y de otras localizaciones.

POLIPOSIS ADENOMATOSAS

Se define poliposis adenomatosa como aquella condición en la que el individuo presenta múltiples pólipos adenomatosos en una o varias colonoscopias.

Debe hacernos pensar en un síndrome polipósico familiar, la presencia de múltiples lesiones polipósicas, la edad de aparición precoz y la asociación con otros casos familiares. Los criterios que nos llevarán a realizar un estudio genético en estos pacientes son los siguientes (Giardiello FM *et al.* 2001):

- Hallazgo de ≥ 20 adenomas colorrectales en un individuo, independientemente de la edad.
- Hallazgo de ≥ 10 adenomas colorrectales antes de los 40 años.
- Hallazgo de ≥ 10 adenomas cuando existe un antecedente personal o familiar de CCR antes de los 60 años y/o.
- Hallazgo de ≥ 10 adenomas cuando existe un antecedente familiar de poliposis adenomatosa atenuada.

El estudio genético debe iniciarse por el individuo afectado y una vez detectada la mutación genética debe ampliarse al resto de miembros de la familia.

Poliposis adenomatosa familiar

Concepto

Enfermedad hereditaria con patrón autosómico dominante que se caracteriza por la aparición de múltiples adenomas en colon y recto (Lynch HT *et al.* 2003). Constituye la poliposis genética más importante con una incidencia de 1 caso por cada 10000-20000 habitantes y es responsable del 1% de los CCR diagnosticados (Galiatsatos P *et al.* 2006)

Se divide en dos tipos, en función del número de pólipos encontrados en la colonoscopia:

- a. Poliposis adenomatosa clásica: cuando el número de lesiones identificadas en el colon supera las 99, suele aparecer a edades más tempranas (adolescencia) y se asocia a un riesgo de CCR de casi el 100% a los 40 años. Durante los primeros años la predilección de los pólipos es el colon distal y el recto, pero a lo largo de la vida adulta se distribuirán de forma uniforme por todo el colon. (Rustgi AK *et al.* 1994)
- b. Poliposis adenomatosa atenuada (PAFa): caracterizada por un número menor de pólipos, generalmente entre 20 y 99, aparece a edades más tardías (edad media 52 años) y el riesgo de CCR es menor que para la forma clásica (70%). En este caso los pólipos son predominantemente proximales, en colon derecho. (Winawer S. *et al.* 2003)

Desde el punto de vista genético la mayoría de los casos se caracterizan por una mutación germinal en el gen supresor tumoral *APC*, localizado en el cromosoma 5q22.2. La inactivación del gen *APC* es precursor de la secuencia adenoma-carcinoma, vía tradicional de la carcinogénesis en el CCR esporádico (Winawer S *et al.* 2003).

Después del colon, el duodeno es la segunda localización más frecuente de asentamiento de pólipos en la PAF, con una afectación casi universal a los 70 años.

En más del 50% de los pacientes con PAF existen además pólipos gástricos, sin embargo, el carcinoma gástrico es raro (<1%) con una prevalencia similar a la población general. (Sawada T *et al.* 1997; Büllow S *et al.* 2004).

En cuanto a las manifestaciones extraintestinales asociadas a este síndrome destacan, la hipertrofia congénita del epitelio de la retina (50%), los osteomas (50-90%), y los tumores desmoides (50-70%). Dentro de las neoplasias extracolónicas se engloban: el adenocarcinoma mucinoso de páncreas (1.7%), el hepatoblastoma (1%), el cáncer papilar de tiroides (2-3%) y los tumores cerebrales (<1%). (Groen EJ. *et al.* 2008)

Es importante conocer que en estos pacientes el riesgo de desarrollo de tumores desmoides (fibromatosis agresiva) es 800 veces mayor que en la población general, estos aparecen sobretodo en cavidad abdominal y se caracterizan por crecimiento infiltrativo con tendencia a la recidiva local, pero sin capacidad metastásica. (Gurbud AK *et al.* 1994)

La asociación de poliposis y tumores de partes blandas se conoce como Síndrome de Gardner y la asociación con tumores en el sistema nervioso central (gliomas malignos o meduloblastomas) como Síndrome de Turcot.

Diagnóstico y cribado

La detección de mutaciones germinales en el gen *APC* permite el diagnóstico molecular de la enfermedad y la aplicación del cribado de esta, con el objetivo de disminuir la incidencia de CCR y del resto de neoplasias extradigestivas.

En la PAF asociada a mutaciones en el *APC* (tanto forma clásica como atenuada), el cribado debe realizarse en todos los individuos con diagnóstico clínico o genético de PAF y en los familiares de primer grado de familias en las que el estudio genético no sea concluyente o no se haya podido realizar.

En familias con PAF clásica, las colonoscopias deben iniciarse durante la pubertad con una periodicidad bienal desde los 10-12 años hasta los 40 años y posteriormente cada 5 años hasta los 50-60 años, siempre y cuando no se detecten pólipos. En el caso de detectar adenomas, debe realizarse una colonoscopia anual hasta que se lleve a cabo el tratamiento definitivo (Vasen HF *et al* 2008).

En el caso de PAFa asociada a *APC*, las exploraciones suelen iniciarse más tarde, alrededor de los 18-20 años con una periodicidad de 1-2 años (Syngal S *et al.* 2015)

Tratamiento

En los pacientes afectados por la variante clásica, el elevado número de pólipos impide la realización adecuada de una vigilancia endoscópica, por lo que se recomienda realiza una cirugía profiláctica antes de los 25 años (Syngal S *et al.* 2015).

Las dos técnicas quirúrgicas empleadas, son la proctocolectomía total con reservorio ileoanal y la colectomía total con anastomosis ileorrectal. Cada técnica tiene sus ventajas e inconvenientes, la proctocolectomía se asocia a una mayor morbilidad operatoria y peores resultados funcionales, mientras que la colectomía total no anula el riesgo de CCR en el remanente rectal (Rhodes M *et al.* 1992).

En general la proctocolectomía total es el procedimiento de elección en las formas graves de PAF o cuando el número de pólipos es muy elevado; en el caso de la PAFa se puede optar por una vigilancia endoscópica adecuada y en el caso de diagnóstico durante el screening se podría optar por la resección endoscópica.

Los pacientes con PAF a los que se realiza tratamiento quirúrgico, pueden desarrollar nuevos adenomas (50-74%) tanto en el remanente rectal como en el reservorio ileal. En aquellos tratados con colectomía total el riesgo acumulado de cáncer rectal es de 4, 12 y 32% a los 10, 20 y 40 años respectivamente (Büllo C *et al.* 2000). Por estos motivos se aconseja realizar control endoscópico anual o bianual.

Poliposis asociada al gen *MUTYH*

La poliposis asociada al gen *MUTYH* se caracteriza por mutaciones bialélicas en este gen, posee un patrón autosómico recesivo y fue descrita por primera vez en 2020.

El desarrollo de pólipos se produce a partir de la segunda o tercera década de la vida y el riesgo de CCR asociado a la misma es del 19% a los 50 años y del 43% a los 60 años, con una edad de presentación de 48 años (Nielsen M *et al.* 2011)

En los individuos portadores de esta mutación se recomienda iniciar la vigilancia endoscópica a los 18- 20 años con una periodicidad anual o bianual, sugiriéndose la resección endoscópica de los pólipos observados con el fin de reducir el riesgo de CCR.

El hallazgo o sospecha de CCR en estos pacientes debe ser indicación de cirugía, la opción recomendada es la colectomía total con anastomosis ileorrectal teniendo en cuenta que si la afectación rectal es elevada debe realizarse proctocolectomía total (Vansen HF et al. 2008).

Otras poliposis adenomatosas

La poliposis asociada al gen *NTHL-1* posee un patrón de transmisión autosómico recesivo, en la que se han detectado una mutación homocigótica del gen *NHTL-1*. Se asocia a un riesgo aumentado de CCR y cáncer de endometrio.

La poliposis adenomatosa atenuada sin causa genética posee un fenotipo de poliposis atenuada en los que no existe mutación germinal detectable. Este grupo de poliposis es el más frecuente y supone un reto para el manejo clínico ya que los pacientes con este tipo de poliposis presentan un amplio abanico de situaciones clínicas que pueden explicarse desde el punto de vista genético como esporádico. No existe evidencia sobre el manejo clínico de esta.

POLIPOSIS HAMARTOMATOSAS

Las poliposis hamartomatosas son un grupo poco frecuente de síndromes hereditarios con predisposición a CCR y otros tumores. Entre ellas encontramos el síndrome de Peutz Jeghers, la poliposis juvenil y el síndrome de Cowden.

El síndrome de Peutz Jeghers es una enfermedad con un patrón hereditario AD, ocasionada por mutaciones en el gen *STK11* que afecta a 1 de cada 200.000 habitantes.

Se caracteriza por la aparición de pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal, hiperpigmentación cutáneo-mucosa en labios, mucosa oral y dedos, además de riesgo elevado de neoplasias en colon, páncreas, estómago mama, ovario y testículos. El riesgo global de cáncer de colon es del 39% a los 65 años. (Giardello A et al. 1998, Hemmiki A et al. 1998). El cribado debe comenzar en la infancia, recomendándose examen genético a los 8 años y gastroscopia, colonoscopia o cápsula endoscópica desde los 8 años cada tres años si existen pólipos y a los 18 si no existen (Brown G. *et al.* 2006).

La poliposis juvenil, es otra poliposis hamartomatosa con un patrón de herencia AD de penetrancia variable, que se produce como resultado de mutaciones en los genes SMAD4 o BMPR1A. Afecta a 1 de cada 100.000-160.000 habitantes y caracteriza por la presencia de múltiples pólipos juveniles a lo largo de todo el tracto gastrointestinal: colon y recto (98%), estómago (14%), e intestino delgado (7%). Estos pacientes tienen un riesgo incrementado de CCR (68% a los 60 años) de cáncer gástrico y de cáncer duodenal (Brown G *et al.* 2006).

El síndrome de Cowden se produce como consecuencia de una mutación en la línea germinal del gen *h*; está relacionado con el desarrollo de múltiples pólipos de tipo hamartoma y lesiones cutáneas; los pacientes que lo poseen tienen un riesgo incrementado de desarrollar tumores en distintas localizaciones, siendo de un 13% para el CCR (Pilarski R. *et al.* 2013)

POLIPOSIS SERRADA

Los pólipos serrados son lesiones con un alto potencial de malignización a CCR a través de la vía serrada de la carcinogénesis. Se trata del síndrome polipósico más frecuente en la actualidad.

En este grupo se engloban 3 subtipos: los pólipos hiperplásicos, los adenomas o pólipos sésiles y los adenomas o pólipos tradicionales.

Actualmente se desconoce la etiología del síndrome de poliposis serrada y se han descrito tanto características que sugieren una predisposición genética como factores ambientales (tabaco) (Ijspeert JEG *et al.* 2016).

Los criterios vigentes según la OMS (2010) para el diagnóstico de SPS son (Snover DC *et al.* 2010):

1. Presencia de 5 o más pólipos serrados proximales al sigma, al menos 2 de ellos mayor de 1cm
2. Cualquier número de pólipos serrados en un familiar de primer grado de un paciente diagnosticado de síndrome de poliposis serrada.
3. Presencia de más de 20 pólipos serrados distribuidos a lo largo de todo el colon (Snover DC *et al.* 2010).

La literatura nos dice que el riesgo de desarrollar CCR oscila desde una incidencia acumulada en 5 años del 70%, hasta menos de un 2% publicado en los trabajos más actuales (Chow E *et al.* 2006; Couch FJ *et al.* 2013).

Estos pacientes deben ser sometidos a vigilancia endoscópica, realizándose una colonoscopia anual que incluya la polipectomía de todas las lesiones > de 3 mm, precisando cirugía en determinados casos. La colectomía total con anastomosis ileorrectal es la técnica de elección en el tratamiento de los pacientes con poliposis floridas, mientras que la colectomía segmentaria podría estar indicada en pacientes con poliposis menos llamativas.

4. CANCER COLORRECTAL ESPORÁDICO.

El CCR esporádico representa el 70-85% de los casos de CCR en la población general; es característico de personas sin antecedentes familiares ni alteración genética o constitucional.

Durante décadas se ha considerado el modelo propuesto en 1990 por Fearon y Vogelstein como la vía principal de carcinogénesis, pero en la actualidad se conocen tres vías principales implicadas en el desarrollo del CCR.: la vía supresora o de inestabilidad cromosómica (INC), la vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites (IMS) y la vía serrada o del fenotipo metilador de islas de CpG (FM o CIMP, “*CpG island methylator phenotype*”) (Arvelo *et al.* 2015).

Estas vías presentan importantes diferencias desde el punto de vista molecular, histopatológico y pronóstico, pero pueden existir solapamientos entre ellas; en estos casos predominaría el fenotipo de la vía mayoritaria.

4.1 VIAS MOLECULARES DE CARCINOGENESIS

VIA SUPRESORA

La vía supresora o de inestabilidad cromosómica (INC) constituye el 85% de los CCR esporádicos y se caracteriza por el desarrollo de tumores a través de ganancias y pérdidas de cromosomas enteros (aneuploidía), pérdidas de fragmentos en los cromosomas 5q y 7p y a una alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad (LOH, *Loss of Heterozygosity*). Este hecho genera una progresión de cambios genéticos que se traducen en activación de pro-oncogenes (*KRAS*, *c-myc*), inactivación de genes supresores de tumores (*APC*, *p53*, *SMAD2* y *SMAD4*) y pérdida de heterocigosidad del brazo largo del cromosoma 18 (DCC). Las últimas mutaciones descritas implicadas en la secuencia adenoma-carcinoma han sido en los genes *TGFBR* y *PIK3CA* (Armaghany T *et al.* 2012, Pino MS *et al.* 2010, Osorio I *et al.* 2014).

Los tumores desarrollados a través de esta vía presentan estabilidad de microsatélites (EMS), suelen localizarse en el lado izquierdo del colon y se asocian con características pronósticas más desfavorables.

VIA MUTADORA

De forma paralela al desarrollo del modelo propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990, se desarrolló la vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites (IMS). Esta vía es la responsable de aproximadamente el 10-15% de los tumores esporádicos y del 95% de los casos hereditarios (Aaltonen *et al.* 1993, Thibodeau *et al.* 1993). Se ha identificado que el mecanismo que origina dicha inestabilidad varía en función de la naturaleza hereditaria o esporádica de los tumores. Así, en los casos hereditarios su origen se debe a mutaciones germinales, mientras que en los casos esporádicos es consecuencia del silenciamiento epigenético (Osorio *et al.* 2014).

Esta vía se produce por una alteración en sistema de reparación de los errores producidos durante la replicación del ADN controlada por varios genes (MLH1, MSH2, PMS2, MSH6, etc). La acumulación de errores puede afectar a genes encargados de codificar la progresión tumoral (*TGF β -R-II*, *IGF2-R*), la apoptosis celular (*BAX*, *Caspasa-5*) y la señalización de la vía WNT (*Axina*, *β -catenina*, *Tcf4*) (Pinheiro *et al.* 2015), o a las secuencias microsatélites (sucesiones de nucleótidos cortas y altamente repetitivas) (Stigliano *et al.* 2014). En este último caso se produce una alteración que inactiva el sistema MMR, los errores acumulados no pueden ser corregidos y el ADN poseen un número de repeticiones diferente al ADN normal, lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites.

En general, los carcinomas con IMS suelen mostrar dotaciones cromosómicas intactas y ausencia de mutaciones en los genes alterados en la vía supresora (*APC*, *KRAS* y *p53*). Estos tumores, se localizan en la parte proximal del colon y están asociados a mejor pronóstico (Hveem *et al.* 2014, Mouradov *et al.* 2013).

VIA SERRADA

La vía serrada, la última en descubrirse, es responsable del 35% de los CCR y se caracteriza por la metilación de islas CpG promotoras de genes supresores de tumores.

Los tumores originados por esta vía surgen a partir de pólipos serrados y parecen no seguir los mecanismos habituales de la secuencia clásica adenoma-carcinoma (Anderson 2014, Yamane *et al.* 2014). La vía parece iniciarse mediante una mutación que activa el gen *BRAF*, ocasionando la inhibición de la apoptosis y la metilación aleatoria de los islotes *CpG* localizados en las regiones promotoras de múltiples genes (Arvelo *et al.* 2015). Esta vía se desarrolla de forma más rápida que las previas, de aquí que se trate de tumores más agresivos (Kocarnik *et al.* 2015). Estos tumores pueden presentar también IMS (Schneider *et al.* 2014, Snover 2011), son de predominio proximal, de estirpe mucinosa, pobremente diferenciados y poseen una alta tasa de mutaciones en *BRAF* (o *KRAS*) y baja tasa de mutaciones en *p53* (Nazemalhosseini *et al.* 2013), presentando un peor pronóstico cuando no tienen IMS asociada.

Tabla I.8 Características de las diferentes vías de carcinogénesis

Inestabilidad cromosómica	Inestabilidad microsátélites	Fenotipo metilador
Pérdida de heterocigosidad de genes	Inestabilidad de microsátélites generalizada	Metilación de islas CpG promotoras de genes
Aneuploidia / Poliploidía	Diploidia	Alteraciones epigenéticas
Localización izquierda	Localización derecha	Localización derecha
Tumores bien diferenciados	Tumores pobremente diferenciados	Tumores pobremente diferenciados
No infiltración linfocitaria	Infiltración linfocitaria	
Raramente mucinosos	Frecuentemente mucinosos	
Peor pronóstico	Mejor pronóstico	

4.2 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CCR.

En un principio se pensó que la vía supresora y mutadora eran mutuamente excluyentes, planteándose la existencia de únicamente dos tipos de tumores: tumores con inestabilidad cromosómica y estabilidad de microsátélites (INC+IMS-) y aquellos con estabilidad cromosómica e inestabilidad de microsátélites (INC-IMS+). Más tarde se demostró que hasta un 50% de los tumores IMS-, también eran INC- y que una pequeña porción de los IMS+ eran INC+ (Georgiades *et al.* 1999, Tang *et al.* 2004), surgiendo una nueva estratificación del CCR en cuatro genotipos bien diferenciados:

1. IMS+INC+ (3%)
2. IMS+INC- (11%)

3. IMS-INC- (48%)

4. IMS-INC+ (38%)

Más tarde se demostró una conexión entre estas dos vías (IMS y INC) y la otra vía de carcinogénesis conocida, la vía serrada o de fenotipo metilador (FM), por ello en los últimos años se propone una nueva clasificación basada en la superposición de las tres vías. Por tanto, los CCR se podrían clasificar en cuatro grupos principales: dos referidos al estado de IMS (Alto vs EMS) y dos referidos al estado del FM (Alto vs Bajo/0) todos ellos con diferentes características clínicas y moleculares. Generalmente los tumores IMS-Alto se asocian mayoritariamente con tumores FM-Alto y tumores IMS-Bajo se asocian con FM-Bajo/0 (Ogino S y Goel A, 2008).

Grupo 1: IMS-Alto, CIMP-Alto—> incluye hipermetilación MLH1

Grupo 2: IMS-Alto, CIMP-Bajo/0 —> Tumores asociados a SL

Grupo 3: IMS-Bajo/EMS, FM-Alto

Grupo 4: IMS-Bajo/EMS, CIMP-Bajo/0 —> Incluye los pacientes con PAF

En los últimos años se ha incorporado el termino MACS (*Microsatellite and Chromosomal Stable*) para definir un conjunto de tumores con estabilidad de microsatélites y estabilidad cromosómica y que tampoco pertenecen a la vía serrada o FM; representan casi al 40% de los CCR esporádicos y sus características no se asemejan a las de ninguna vía de carcinogénesis, son tumores de predominio en personas jóvenes, en colon izquierdo y recto y con mal pronóstico por este motivo podríamos estar ante una nueva vía de carcinogénesis (Osorio *et al.* 2014 ; Fadhil *et al* 2014).

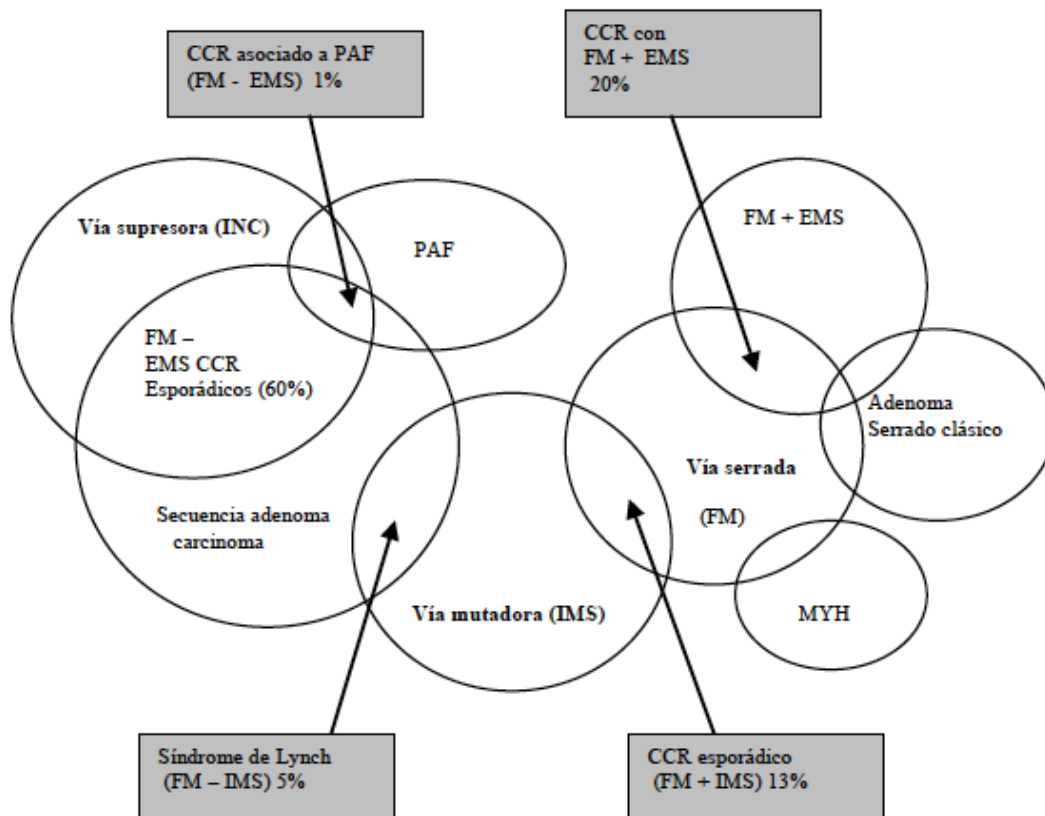


Fig I.14 Representación de los diferentes grupos de CCR, según las diferentes vías de carcinogénesis y sus solapamientos. Modificado de Snover DC, 2011.

5. CCR Y LOCALIZACIÓN

En 1990 Bufill *et al.* comienzan a describir el CCR en función de su localización anatómica, este fue un intento de subclasificar el CCR, ya que los datos clínicos mostraban diferencias epidemiológicas, patológicas, genéticas, epidemiológicas y moleculares en función de la localización anatómica.

Las diferencias entre el cáncer de colon derecho, izquierdo y de recto, son consecuencia de diferencias entre el colon derecho, izquierdo y recto; relacionadas con el distinto origen embriológico, las distintas propiedades fisiológicas, biológicas y genéticas (Iacopetta B. 2002; Li FY *et al.* 2009; Shen Rl *et al.* 2017). Estas diferencias podrían contribuir a que las vías de carcinogénesis que dan lugar a los tumores colorrectales sean diferentes en función de la localización anatómica en el colon.

En la literatura existen varias publicaciones que comparan las características clínico-patológicas, familiares y moleculares del CCR en función de la edad de diagnóstico y en función de la localización en el colon; pero existe poca bibliografía en la que se estudien las características diferenciales del CCR en el adulto joven teniendo en cuenta su localización.

Si tenemos en cuenta la literatura, encontramos trabajos como la revisión sistemática de Iacopetta B. (2002), en la que describe un predominio del CCR derecho en mujeres e izquierdo en varones; así como un mayor porcentaje de CCR izquierdo en jóvenes y derecho en pacientes más mayores. Nawa *et al.* (2006), observa también, un porcentaje mayor de CCR derecho en pacientes añosos y al realizar una estratificación por edad describe que la proporción de CCR derecho es mayor en menores de 40 años (33%) y en mayores de 80 años (43%). Snaebjornsson *et al.* (2010), coincide también con lo anterior, describiendo que a medida que aumenta la edad en las mujeres, aumentan los casos de CCR derecho, en cambio en los hombres la mayor parte de los CCR derechos se producen a edades tempranas.

Desde el punto de vista histopatológico los tumores de colon derecho y los que se desarrollan en adultos jóvenes presentan características semejantes; presentan bajo grado de diferenciación, alto porcentaje de células en anillo de sello, y elevado componente mucinoso. (Nawa T *et al.* 2008; Snaebjornsson P *et al.* 2010).

En cuanto al pronóstico, observamos que existe bastante controversia en la literatura. Benedix F. *et al.* (2010) observa que las metástasis a distancia son más comunes en los tumores localizados en el colon izquierdo y que la supervivencia es significativamente peor en el colon derecho ajustada por estadio tumoral. Weiss JM *et al.* (2011), observa que en su serie al realizar una estratificación por edad no existían diferencias en la supervivencia global entre el colon derecho e izquierdo.

Las características moleculares de los tumores también difieren en función de la localización tumoral; Perea *et al.* (2010) y Losi *et al.* (2005); describen predominio de tumores IMS en colon derecho. En cuanto a la vía serrada se ha observado relación entre el fenotipo metilador y los tumores localizados en colon derecho (Van Rijnsoever *et al.* 2002; Iacopetta 2002).

6. CCR Y ADULTO JOVEN

La definición de adulto joven varía según estudios, generalmente se entiende adulto joven aquel que está por debajo de los 50 años; representando entre un 2-8% de todos los casos de CCR. El número de casos de CCR diagnosticados hoy en día por debajo de esta edad ha aumentado, en parte de forma secundaria al screening poblacional implementado en los últimos años.

En el estudio publicado por Loomans-Kropp HA. (2019), se observa que el CCR en jóvenes ha aumentado entre un 2.8% y un 3.5 % de forma global en las últimas décadas; además describen que las cifras se han incrementado anualmente en individuos con edades entre 20-39 años desde la mitad de los años 80 y entre 40-54 años desde mitad de los 90.

Generalmente este tipo de tumores desarrollados a edades tempranas poseen un componente hereditario asociado, pero se ha demostrado que entre un 19.7% y un 41% de los pacientes jóvenes poseen estabilidad de microsatélites (Perea et al. 2014) y que solamente un 25% de los pacientes con CCR en edad joven poseen SL asociado (Kirzin et al. 2014).

El CCR en el adulto joven suele asociarse a un peor pronóstico, un fenotipo invasor (pudiendo debutar como enfermedad metastásica), bajo grado de diferenciación tumoral, elevado componente mucinoso y células en “anillo de sello”, alta frecuencia de tumores sincrónicos y/o metacrónicos, elevado número de pólipos desarrollados durante el seguimiento y una mayor tendencia a la agregación familiar (Osorio et al. 2014; Wang et al. 2015). En cuanto a la localización de estos tumores, no existe una opinión uniforme en la literatura; unas series apuntan a una mayor predilección por el colon izquierdo, mientras que otras señalan el colon derecho como localización más frecuente; probablemente por su posible vinculación con el SL (Osorio *et al.* 2014).

Algunos autores han sugerido diferencias en los mecanismos moleculares que subyacen tras la edad de inicio de la enfermedad, pues se ha visto que los factores desencadenantes de la inestabilidad genómica son diferentes en función de esta. Así, pese a que la IMS en población joven suele deberse a mutaciones en alguno de los genes que componen el sistema MMR, en población anciana suele estar relacionada con fenómenos epigenéticos (Perea *et al.* 2011).

I. INTRODUCCIÓN

En el otro extremo se encuentran los tumores de inicio temprano con INC y EMS, un grupo heterogéneo caracterizado por edades de diagnóstico ligeramente superiores, un menor predominio de la localización derecha, un menor porcentaje de tumores sincrónicos y/o metacrónicos y un mayor porcentaje de diagnósticos en fases avanzadas.

En comparación con los tumores EMS de los ancianos, los adultos jóvenes muestran predominio de la localización izquierda y el recto, mayor presencia de mucina o células en “anillo de sello”, menores tasas de mutación en *BRAF* y frecuencias de alteraciones epigenéticas mucho más bajas (Kirzin *et al.* 2014). Además, se han observado diferencias respecto a los genotipos tumorales predominantes en cada población, y mientras los tumores IMS-INC- (MACS) prevalecen entre las personas jóvenes, los tumores IMS-INC+ lo hacen entre las ancianas (Boardman *et al.* 2007).

Tomando como premisa estas diferencias, parece razonable pensar que los tumores de inicio temprano y tardío puedan tener diferentes bases moleculares; por tanto, una aproximación posible para continuar con esta definición podría ser realizar una clasificación tumoral teniendo en cuenta la localización, lo que podría derivar en una simplificación en el manejo terapéutico y en la investigación clínica.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El cáncer colorrectal (CCR) en el adulto joven posee una incidencia anual del 2-8% y representan alrededor del 10% de todos los casos de CCR. El número de casos de CCR diagnosticados hoy en día por debajo de los 50 años ha aumentado, en parte de forma secundaria al screening poblacional implementado.

En un principio, se consideraba que los tumores desarrollados a edades tempranas tenían un importante componente hereditario y todos los estudios se encaminaron a demostrarlo. Con el tiempo, se ha llegado a confirmar que las formas hereditarias constituyen un pequeño porcentaje del CCR en el adulto joven y que la inestabilidad de microsátélites no explicaría la mayor parte de los casos. Este tipo de tumores debería considerarse un subgrupo dentro del CCR, pero a su vez podríamos subclasificarlos, ya que son una entidad muy heterogénea.

Algunos estudios han demostrado que existen diferencias genéticas, biológicas y demográficas entre los tumores localizados en el colon izquierdo, derecho y recto, sugiriendo que los mecanismos de carcinogénesis y progresión tumoral serían diferentes para los tumores del lado derecho, izquierdo y los rectales. Por tanto, la localización anatómica del CCR en adultos jóvenes puede ayudarnos a realizar una subclasificación de este.

Teniendo en cuenta lo anterior, planteamos como hipótesis de nuestro trabajo que los tumores de inicio precoz podrían tener diferentes bases moleculares, pudiendo realizarse una clasificación tumoral prestando atención a la localización tumoral, lo que podría derivar en una simplificación en el manejo terapéutico y en la investigación clínica.

En este trabajo se han analizado los datos clínicos, anatomopatológicos, familiares, inmunohistoquímicos y moleculares de una muestra de pacientes del Hospital 12 de Octubre, con diagnóstico de CCR, intervenidos con una edad menor o igual de 45 años y se ha realizado un estudio comparativo según la localización tumoral.

Los objetivos que nos proponemos para llegar a aclarar nuestra hipótesis son:

1. Identificar las características clínicas, anatomopatológicas, y familiares del

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

CCR en el adulto joven.

2. Describir las características moleculares del CCR del adulto joven.
3. Llevar a cabo un mapa colónico comparando las características clínicas, anatomopatológicas, familiares y moleculares del CCR del adulto joven teniendo
4. Llevar a cabo un mapa del colon según las características clínicas y moleculares del CCR de aparición precoz según su localización endoscópica y/o quirúrgica.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

1.1 Procedencia y criterios de inclusión

Los sujetos del estudio fueron identificados a partir del Registro de Tumores del Hospital Universitario 12 de Octubre, de Madrid, con el siguiente criterio de inclusión:

Pacientes intervenidos con el diagnóstico de CCR (adenocarcinoma) a una edad igual o inferior a 45 años entre Enero de 2002 y Diciembre de 2009.

Fueron excluidos del estudio los CCR asociados a pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, así como otras neoplasias colónicas de diferente estirpe anatomopatológica y los tumores apendiculares.

1.2 Información y variables recogidas

Por cada uno de los sujetos incluidos en el estudio se recogió información referente tanto a aspectos clínicos como familiares.

- Información clínica relacionada con el tumor y el individuo.
 - Datos clínicos:
 - Sexo
 - Edad al diagnóstico
 - Datos anatomo-patológicos:
 - Localización del tumor:
 - Derecha o proximal (ciego, colon ascendente, ángulo hepático y primera mitad de colon transversal)

Izquierda o distal (segunda mitad del colon trasverso, colon descendente y sigma)

Recto o unión rectosigmoidea

- Grado histológico de diferenciación (bajo, moderado o alto)
- Producción de moco (tumor mucinoso o células en anillo de sello)
- Estadío tumoral.

▪ Datos evolutivos:

- Supervivencia global
- Supervivencia libre de enfermedad (SLE)
- Recidiva tumoral y tipo
- Fallecimiento consecuencia o no del cáncer
- CCR sincrónicos o metacrónicos
- Presencia de pólipos en colón, antes o después del diagnóstico tumoral (características y número)
- Neoplasias relacionadas con el SL
- Otras neoplasias no relacionadas con SL

• Información familiar

Siempre que fue posible se incluyó información de tres generaciones.

Se concertó una entrevista con todos los pacientes objeto de estudio o en su defecto con un familiar de primer grado (en caso de fallecimiento) En esta entrevista se les informó del objetivo del estudio y se les entregó el consentimiento informado para inclusión en el mismo. El estudio fue autorizado por el comité de ética del hospital. Una vez aceptado el consentimiento se recogió información referente a la estructura y antecedentes familiares neoplásicos de al menos tres generaciones: número y relación de familiares, edad en el momento de la entrevista, fallecimientos y causa, historia familiar de tumores y edades en el momento del diagnóstico.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez analizados estos datos, los pacientes fueron clasificados en tres grupos diferentes en función de su árbol genealógico.

- Sospecha de SL: casos en los que se cumplían los criterios de Ámsterdam.
- Agregación familiar para neoplasias relacionadas con SL, independientemente de la presencia o no de neoplasias no relacionadas con dicho síndrome.
- Agregación familiar para neoplasias no asociadas con SL, cuando sólo exista agregación para dichas neoplasias y al menos dos de ellas en familiares de primer grado.
- Esporádico, en el caso de que sea el único individuo de la familia que haya presentado un CCR y no existieran antecedentes familiares asociados a SL.

2. MUESTRAS

2.1. Obtención de la muestra

La muestra de los pacientes objeto de estudio fue la pieza quirúrgica del tumor extirpado, a excepción de aquellos pacientes con anatomía patológica previa de carcinoma “in situ” y aquellos en los que los tumores eran irreseccables (estadio IV), que fue la biopsia endoscópica en los que resultó posible obtener material suficiente. El estudio histológico de las muestras fue llevado a cabo en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre (Madrid).

En aquellos individuos con IMS positivo tras análisis de la muestra, se volvía a contactar de nuevo con ellos para extraer una muestra de sangre periférica, para el estudio de posibles mutaciones en los genes de reparación de errores de ADN más frecuentes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*), asociados al SL. En el caso de que el individuo objeto de estudio

hubiese fallecido, se extraería la muestra del familiar más cercano que hubiera desarrollado CCR o una neoplasia característica del SL a una edad más temprana.

2.2 Muestra tumoral

El tejido tumoral se extrajo a partir de bloques de parafina. Es importante puntualizar que antes de proceder a la extracción del ADN en tejido tumoral, debemos determinar la proporción en el tejido de células tumorales y células normales, para ello debemos de teñir el material con hematoxilina – eosina; únicamente se seleccionaron para el estudio aquellas en las que la proporción de células tumorales era igual o mayor del 70%. Cuando los tejidos presentaban una proporción de células tumorales inferior al 70%, se trata de separar el tejido tumoral del sano en dos bloques distintos.

- Tinción Hematoxilina – Eosina
 - Cortar el tejido parafinado en secciones de 3 μm de grosor con ayuda del micrótomo.
 - Incubar el corte a 70 °C durante 1 hora.
 - Desparafinar en dos ocasiones, aplicando Xilol durante 2 minutos.
 - Hidratar las muestras durante 2 minutos con Etanol absoluto y posteriormente otros 2 minutos con etanol 95 %.
 - Lavar 2 minutos con agua destilada.
 - Teñir con Hematoxilina de Mayer durante 15 minutos.
 - Lavar de nuevo 2 minutos con agua destilada.
 - Teñir 2 minutos con Eosina.
 - Eliminar los restos de Eosina con etanol 70%
 - Deshidratar mediante pasos sucesivos con etanol 95% (30 segundos), etanol puro (2 minutos) y Xilol (2 minutos, dos veces).
 - Montar el cubre muestras con Eukit o DPX.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

- Extracción de ADN a partir de muestra parafinada
 - Recoger 3 cortes de tejido (aproximadamente 10 μm de grosor) en un tubo de 1.5 ml.
 - Añadir 1000 μl de xilol y agitar en vórtex. Incubar 5 minutos a 65°C.
 - Centrifugar a 12000 rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
 - En caso de persistir parafina, deberían repetirse los dos pasos anteriores el número de veces que fuera necesario.
 - Añadir 1000 μl de etanol absoluta para eliminar los restos de xilol y mezclar con vórtex. Incubar 5 minutos a 65°C.
 - Centrifugar a 12000 rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos: Eliminar el sobrenadante.
 - Repetir el lavado con etanol al 50%. Incubar 5 minutos a 65°C.
 - Centrifugar a 12000 rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar secar hasta que se hayan evaporado los restos de etanol.
 - Resuspender el centrifugado en 400 μl de tampón (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% Nonidet P40, 4.5% Tween 20)
 - Añadir 40 μl de Proteinasa K (10 mg/ml, mezclar con vórtex e incubar a 55°C hasta que el tejido esté completamente digerido.
 - Volver a agitar la muestra con vórtex y añadir 440 μl de mezcla fenol / cloroformo / alcohol isoamílico en proporción 25:24:1.
 - Pasar la mezcla a una columna de purificación *Phase Lock Gel Light* (Eppendorf AG, Hamburg Alemania) y centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos.
 - Recuperar la fase acuosa y añadir 440 μl de mezcla fenol / cloroformo / alcohol isoamílico en proporción 25:24:1. Pasar la mezcla a una nueva columna de purificación *Phase Lock Gel Light* (Eppendorf AG, Hamburg Alemania) y centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos.
 - Recuperar la fase acuosa y añadir 440 μl de cloroformo. Pasar la mezcla a una nueva columna de purificación *Phase Lock Gel Light* (Eppendorf AG, Hamburg Alemania) y centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

- Centrifugar a 12000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Retirar el sobrenadante.
- Lavar con 1 ml de etanol frío al 75% y centrifugar a 12000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Retirar el sobrenadante.
- Retirar el sobrenadante y resuspender el ADN en 30 µl de agua destilada estéril.

2.3 Sangre periférica.

Sólo en los casos en los que la muestra tumoral presentaba IMS y/o ausencia de expresión de algunas de las proteínas del sistema MMR , se obtuvo una muestra de sangre periférica (15 ml de sangre en EDTA), del paciente afectado por el tumor o en caso de fallecimiento de este, del familiar con mayor probabilidad de ser portador de mutación para el estudio de los genes relacionados con el SL.

La extracción del ADN genómica se realizó tanto de forma manual como de forma automatizada.

- Extracción manual

Se empleó el kit *DNA purification system Puregene* (Gentra Systems Minneapolis MN)

- Añadir 10 ml de sangre a un tubo Falcon de 50 ml que contenga 30 ml de RBC Lysis Solution. Homogeneizar e incubar durante 5 minutos.
- Centrifugar a 3000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Decantar el sobrenadante dejando el *pellet* de leucocitos en un volumen de 200-400 µl de líquido residual.
- Agitar en vórtex para resuspender las células.
- Añadir 10 ml de *CellLysis Solution + RNase A Solution*; homogeneizar e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugar a 3000 rpm y 4°C durante 15 minutos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

- Añadir 3.5 ml de *Protein Precipitation Solution* a las células lisadas y agitar en vórtex durante 20 segundos.
 - Centrifugar a 3000 rpm y 4°C durante 15 minutos.
 - Desechar el pellet de proteínas y pasas el sobrenadante (contiene la suspensión de ADN) a un tubo Falcon estéril de 50 ml que contenga 10 ml de isopropanolol al 100%
 - Invertir el tubo un mínimo de 50 veces y observar la aparición de la madeja de ADN.
 - Extraer la madeja de ADN con cuidado con la ayuda de una pipeta Pasteur esterilizada, pasarla por dos tubos que contengan un pequeño volumen de etanol frío al 70%.
 - Dejar secar durante 5 minutos para eliminar los restos de etanol.
 - Resuspender en 30 µl de agua destilada estéril.
 - Agitar suavemente durante 2 horas a 37°C para conseguir la correcta disolución del ADN.
- Extracción automática

Se empleó el sistema *Magna Pure LC* (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Alemania); a partir de una muestra de 1 ml de sangre periférica, el sistema añade:

 - 0.115ml de solución Proteinasa K (digestión de proteínas)
 - 0.84 ml de tampón de lisis, unión (favorece la lisis celular y genera las condiciones salines adecuadas para los pasos posteriores)
 - 0.54 ml de reactivo MGP (retiene el ADN en sus partículas magnéticas)
 - 2.42 ml de “Tampón de lavado I” (elimina todo lo que no se haya unida a las partículas magnéticas del reactivo MGP.
 - 1.28 ml de “Tampón de lavado II” (elimina restos celulares y disminuye la concentración salina)
 - 0.84ml de “Tampón de lavado III” (eliminar resto de etanol)
 - 200 µl de “Tampón de disolución” previamente calentado (para resuspender el ADN purificado)

2.4 Valoración de la cantidad y calidad del ADN extraído.

Una vez extraído el ADN, se procedió a evaluar la calidad y cantidad de este mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Pasos del procedimiento:

- Preparación del gel de agarosa:
 - Colocar 1.5g de agarosa (agarosa Media, Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid) en un matraz de 250ml y añadir 150 ml de tampón TBE 1x (Tris, ácido bórico, EDTA) Llevar a ebullición en un microondas hasta que se disuelva la agarosa.
 - Añadir 3 μ l de una disolución de bromuro de etidio (10mg/dl).
 - Verter la mezcla TBE 1x/ agarosa / bromuro de etidio sobre una bandeja sellada por los extremos con cinta adhesiva y colocar un peine cerca del borde. Dejar solidificar durante 30 minutos.
 - Retirar la cinta adhesiva y el peine. Colocar el gel en una cubeta horizontal (Laboratorios Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña) y cubrirlo completamente con tampón TBE 1x.

- Migración electroforética:
 - Cargar en cada pocillo del gel una mezcla de 2 μ l del ADN extraído y 3 μ l de tampón de carga (glicerol, azul de bromofenol y xilencianol).
 - Conectar la cubeta de electroforesis a una fuente de energía y dejar migrar la muestra durante 20 minutos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

- Visualizar el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (GelDOc 2000, Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña). Comprobar la intensidad de las bandas obtenidas.
- Cuantificación del ADN y valoración de su pureza.
 - Preparar una dilución 1:200 de ADN extraído (2 µl de ADN en 400 ml de agua destilada).
 - Colocar la dilución en una cubeta de cuarzo y recoger las medidas de absorbancia a 260, 280 y 230 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta Beckman DU530 Life Science (Beckman Coulter Inc. California). Los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a 260 nm, por lo que es a esa longitud de onda la concentración puede ser calculada mediante la fórmula siguiente:

$$C = \frac{\text{Abs } 260 \times 100 \times \text{FD}}{\epsilon \times b}$$

C= concentración mmol/l

Abs 260 = absorbancia a 260 nm

FD= Volumen de la dilución dividido entre la cantidad alicuotada
(en este trabajo el valor es de 200)

ε= Coeficiente de extinción molar. Se encuentra tabulado para unas condiciones determinadas.

b= Trayecto óptico, habitualmente estandarizado para 1 cm.

- Los ratios de absorbancia 280/ 260 y 260/230 nm, se utilizan para evaluar la pureza del ADN. Se acepta que un ADN es puro cuando ambos ratios oscilan entre 1.8 y 2.0. Valores inferiores a 1.8 en el rango 280/260

indicarían contaminación por proteínas y valores inferiores a 1.8 en el rango 260/230 indicarían restos de sales en la muestra.

3. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLTES EN TEJIDO TUMORAL.

3.1. Panel Bethesda

Este estudio fue llevado a cabo con la colaboración del Dr. Daniel Rueda; del departamento de biología molecular del Hospital 12 de Octubre.

El denominado “panel Bethesda” se recomienda actualmente para la determinación del estado de IMS en tumores sospechosos de SL (Boland et. al 1998), incluye el estudio de cinco microsatélites: BAT25, BAT26, D5S346 (APC), D17S250 (MFD15CA) Y D2S123 (Tabla III.1). Se consideran tumores IMS+ aquellos con dos o más marcadores del panel alterados y tumores IMS-/EMS el resto.

Tabla III.1 Características de los marcadores microsatélites y los fluorocromos empleados para el análisis de IMS (*HNPPC Microsatellite instability test*; Roche Molecular Biochemicals)

Marcador microsatélite	Localización cromosómica (gen próximo al marcador)	Tamaño del fragmento (Bp)	Fluorescencia
BAT-25	4q12 (c-kit)	110-130	6-FAM
BAT-26	2p16.3-p21 (MSH2)	100-120	TET
D5S346	5q21-q22 (APC)	100-130	HEX
D17S250	17q11.2-q12 (BRCA1)	140-170	TET
D2S123	2p16 (MSH2)	200-230	6-FAM

Bp: pares de bases.

Se empleó el kit *HNPPC Microsatellite Instability Test* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante (Tabla III.2), un termociclador *GeneAmp* ®9700 (PE Applied Biosystems) y el programa de temperaturas detallado en la Figura III.1.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla III.2 Mezcla de PCR utilizada par el estudio de IMS. (1) Volumen necesario para conseguir 200 ng de ADN. (2) Cantidad necesaria de agua para completar el volumen de la reacción (depende de X).

	Volumen (μ l)
ADN purificado 200 ng	X ¹
Multi Primer Mix	5
Enzyme Máster Mix	5
Agua destilada	Y ²
Volumen final de reacción	25

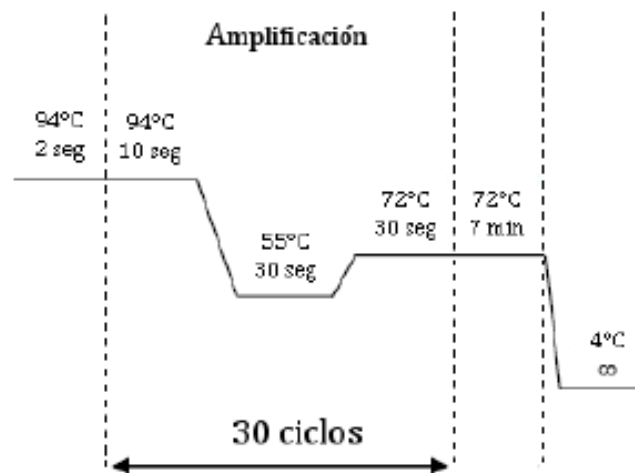


Figura III. 1 Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la PCR multiplex para el estudio de la inestabilidad en las secuencias microsatélites.

A continuación, se tomó 1 μ l del producto de PCR purificado y se le añadieron 12 μ l de formamida desionizada y 0.1 μ l de estándar interno TAMRA-500. Los fragmentos fueron sometidos a electroforesis de alta resolución en un secuenciador ABI primis® 3700 (PE Applied Biosystems), analizados con el software *Genescan* 3.5 (PE Applied Biosystems). Fig III.2

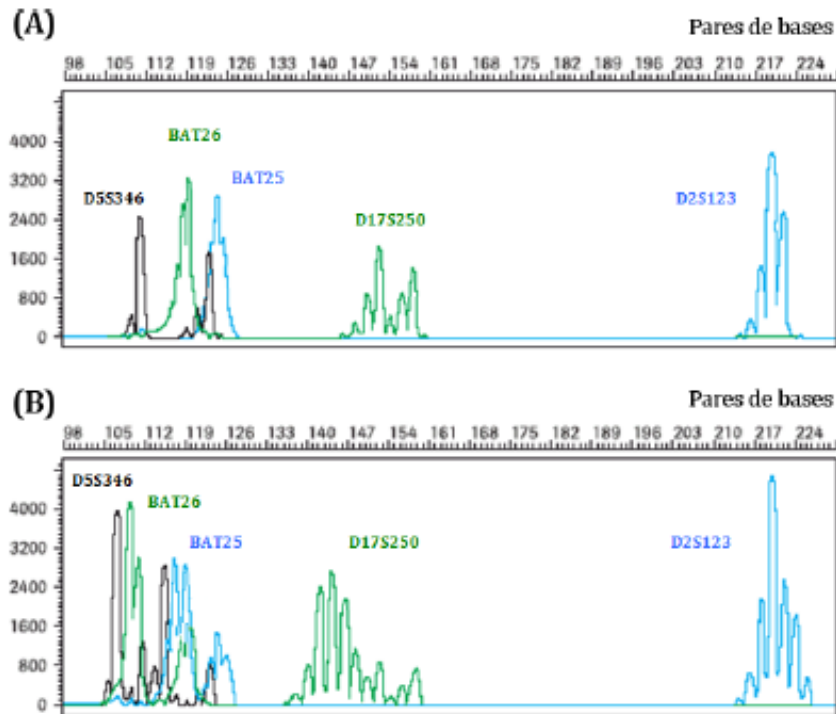


Figura III. 2 Resultado de la amplificación de un ADN normal (A) y de una muestra tumoral clasificada como inestable para todos los marcadores microsatélites analizados (B).

3.2 Análisis inmunohistoquímico de proteínas MMR

El estudio inmunohistoquímico se llevo a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre (Madrid). Todas las tinciones fueron realizadas en el inmunoteñidor automático *TechMate 500* (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca).

Durante este procedimiento se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Seccionar en cortes de 4 μm de grosor el tejido parafinado y previamente fijado en formol.
- Desparafinar el tejido en estufa a una temperatura de 36°C durante 12h.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

- Hidratar durante 10 minutos en xileno en dos ocasiones, posteriormente introducir 5 minutos en etanol al 95%, 5 minutos en etanol al 70% y 2 minutos en agua destilada.
- Desenmascarar el antígeno en olla a presión con *buffer* de Na₃C₃H₅O (COO)₃ 10 mM a PH 5.6 o Tris-EDTA PH 9 durante 3 minutos (Tabla III.3)
- Inactivar la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% (solución bloqueante S2023, DAKO, Glostrup, Dinamarca) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Incubar con el anticuerpo primario (Tabla III.3) e inmunodetectar con polímeros de alta sensibilidad unidos a moléculas inmunoglobulinas anti-ratón (anticuerpos secundarios) biotiniladas.
- Añadir estreptavidina marcada con peroxidasa e incubar con diaminobenzidina como sustrato.
- Contrateñir con Hematoxilina de Harry.
- Lavar y deshidratar con etanol al 95% (30 segundos), etanol absoluto (30 segundos), xileno (10 minutos) y nuevamente xileno 1 hora.

El análisis de las muestras se informó como positivo a negativo en función de la presencia o ausencia de expresión de cada una de las proteínas estudiadas.

Tabla III.3 Anticuerpos, clones, proveedores y diluciones utilizadas en el estudio IHQ de las muestras.

Proteína	Clon	Proveedor	Dilución	Desenmascaramiento
MLH1	G168-15	BD PharMingen	1:50	Tris-EDTA, PH 9
MSH2	FE11	Oncogene	1:50	Tris-EDT, PH 9
MSH6	44	BD Transduction Lab	1:50	Na ₃ C ₃ H ₅ O (COO) ₃ , PH 5.6

3.3 Estudio molecular de los genes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*).

Este estudio fue realizado en colaboración con Dr. Daniel Rueda, miembro del departamento de Biología Molecular del Hospital 12 de octubre.

- Genes *MLH1* y *MSH2*
 - Análisis de mutaciones

La mezcla de PCR (tabla III.4) fue amplificada en un termociclador GeneAmp® 9700 (PE Applied Biosystems) de acuerdo al programa de temperaturas detallado en la Figura III.3.

Tabla III.4 Mezcla de PCR utilizada para la amplificación de *MLH1* y *MSH2*. (1) Volumen necesario para conseguir 50 ng de ADN. (2) Cantidad necesaria de agua para completar el volumen final de la reacción

	Volumen (µl)
ADN purificado 50 ng	X ¹
Primer sentido 10 µM	2.5
Primer antisentido 10 µM	2.5
Tampón PCR 10X (BioTaq)	2.5
dNTPs (1.25 mM)	2
ADN Taq polimerasa BioTaq	2
Agua destilada	Y ²
Volumen final de reacción	25

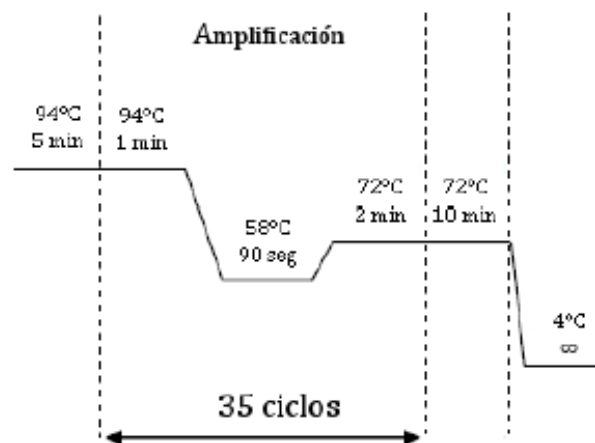


Figura III.3 Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas para la PCR del estudio molecular de los genes *MLH1* y *MSH2*.

Una vez realizada la PCR, se realizó sobre los fragmentos de ADN purificados, una electroforesis vertical con gradiente de desnaturalización sobre geles de poliacrilamida (Guldberg y Guttler 1993, Makec et al. 1997). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema *DCode™* Universal Mutation Detection System (*Bio-Rad*, California, USA) a una temperatura de 65°C y una intensidad de corriente de 17 mA en un tiempo de 18 horas. Tras tinción con Bromuro de etidio, el gel fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (*GelDoc 2000*, *Bio-Rad*, California, USA). Las modificaciones en cuanto a las condiciones de desnaturalización empleadas en este trabajo con respecto a las recomendadas por otros autores (Wijnene et al 1995, Wijnen et al. 1996) se encuentran recogidas en los Anexos 2A y 2B.

Los fragmentos con un patrón de migración anómalo fueron secuenciados empleando como cebador la secuencia complementaria de M13 (Anexos 2A y 2B). Las variantes genéticas halladas fueron descritas utilizando la nomenclatura recomendada por la Sociedad de Variaciones del Genoma Humano (HGVS, Human Genome Variation Society) (<https://www.hgvs.org>).

- Análisis grandes deleciones genómicas

Los cambios en el número de copias de un gen no suelen identificarse mediante la secuenciación, ya que la presencia del alelo sano enmascara la ausencia en la otra copia. Por este motivo el análisis de grandes deleciones genómicas fue realizado mediante la técnica MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification), un método de PCR multiplex que consigue solventar esta limitación y permite detectar anomalías en el número de copias de las secuencias de ADN genómico.

El reactivo comercial Salsa MLPA Kit P003-B1 *MLH1/MSH2* (MRC- Holland, Ámsterdam, Holanda) fue el utilizado para el estudio de los exones *MLH1* y *MSH2*, un

III. MATERIAL Y MÉTODOS

reactivo compuesto por una mezcla de 43 sondas diferentes (una para cada exón de *MLH1*, una para cada exón de *MSH2* y 8 sondas control) (Anexo 2C).

El procedimiento consta de los siguientes pasos:

- a. Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas.
 - Diluir la muestra de ADN hasta disponer de una concentración de 100 ng en 5 μ l.
 - Desnaturalizar en un termociclador a 98°C durante 5 minutos y dejar atemperar.
 - Añadir 1.5 μ l de la mezcla de sondas SALSA y 1.5 μ l del tampón MLPA.
 - Incubar a 95°C durante 1 minuto y a 60°C durante 16 horas.

- b. Reacción de ligación
 - Preparar en hielo la mezcla de ligación (Tabla III.5) y añadir 32 μ l a cada muestra desnaturalizada e hibridada con las sondas.
 - Incubar a 54°C durante 15 minutos y a 98°C durante 5 minutos.

Tabla III.5 Mezcla de ligación utilizada en la PCR multiplex para el análisis de grandes deleciones genómicas de los genes *MLH1* y *MSH2*

	Volumen (μ l)
Tampón A de la ligasa - 65	3
Tampón A de la ligasa - 65	3
Ligasa - 65	1
Agua destilada	25

c. Reacción de PCR

-Calentar a 60°C una mezcla de 4 µl de SALSA de PCR 10x, 26 µl de agua destilada y 10 µl de mezcla de PCR (Tabla III.6).

- Amplificar de acuerdo con el programa de temperaturas especificado en la Figura III.4.

- Chequear el resultado de la PCR en un gel de Agarosa 2% teñido con bromuro de etidio y visualizar en un transiluminador de luz ultravioleta.

Tabla III.6 Mezcla de PCR utilizada para el análisis de grandes deleciones en los genes *MLH1* y *MSH2* mediante MLPA. (1) Secuencia sentido 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3' (marcado fluorescente). (2) Secuencia antisentido 5'- GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'

	Volumen (µl)
Primer sentido SALSA ¹	2
Primer antisentido SALSA ²	2
Tampón dilución de enzima	2
ADN Taq polimerasa (SALSA)	0.5
Agua destilada	5.5

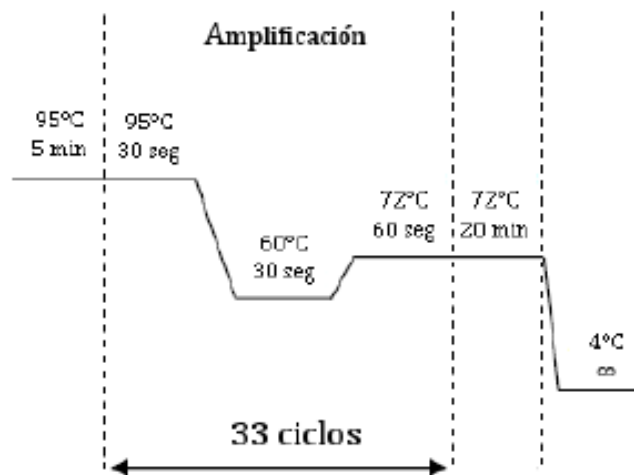


Figura III.4 Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la reacción de PCR multiplex para el estudio molecular de los genes *MLH1* y *MSH2*.

d. Visualización

-Añadir 12 μ l de formamida desionizada y 0.1 μ l de estándar interno TAMRA-500 A 1 μ l del producto de PCR purificado. Analizar la mezcla en un secuenciador ABI PRIMS® 3700 (PE Applied Biosystems) con ayuda del software *GeneScan* 3.5 (PE Applied Biosystems)

▪ Estudio de hipermetilación del promotor del gen *MLH1*

Como controles positivos se utilizaron las líneas celulares RKO y SW48, caracterizadas por mostrar IMS con ausencia de mutación en los genes MMR y presencia de hipermetilación del promotor del gen *MLH1* en ambos alelos. Como control negativo se empleó sangre periférica de un individuo sano.

El análisis fue realizado mediante modificación con bisulfito sódico, una técnica basada en la capacidad de este reactivo para convertir los residuos de citosina no metilados en uracilos (Frommer *et al.* 1992). Posteriormente, el ADN modificado puede ser amplificado y secuenciado, proporcionando información detallada sobre el estado de metilación de las islas *CpG*. Para la ejecución de la técnica se utilizaron protocolos descritos por otros autores (Herman *et al.* 1998, Suter *et al.* 2004) a los que fueron incorporadas ciertas variaciones. Pasos del procedimiento:

a. Modificación con bisulfito

-Incubar una mezcla de 10 μ l de ADN (100mg/ μ l) de agua destilada y 5.7 μ l de NaOH 3M, a 37°C durante 15 minutos.

-Añadir 33 μ l de hidroquinona 16.4mM y 530 μ l de bisulfito sódico 3.03 mM PH=5, ambos preparados en fresco.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

-Agregar una gota de aceite de mineral e incubar en oscuridad en oscuridad a 50°C durante 16 horas.

- Separar el aceite de la muestra y purificar las muestras mediante el kit *Wizard® DNA Clean-Up System* (Promega Corporation, Madison, USA).

- Añadir 1 ml de resina DNA Clean-up a la muestra, resuspender y pasar a una jeringa.

- Filtrar mediante vacío y lavar la columna con 1 ml de isopropanolol al 80% (2 veces). Descartar la jeringa y transferir la jeringa a un tubo de 1.5 ml.

- Centrifugar a 14000 rpm y a temperatura ambiente durante 1 minuto. Transferir la columna a otro tubo y añadir 40 µl de agua destilada a 50°C para extraer el ADN. Añadir 4,4 µl de NaOH e incubar durante 15 minutos a 37°C.

- Añadir 1 µl de glucógeno (10 mg/ml), 17 µl de acetato amónico 10 M y 500 µl de etanol absoluto frío para precipitar el ADN. Centrifugar a 14.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Descartar el sobrenadante.

- Lavar con 800 µl de etanol frío al 75%. Centrifugar a 14.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Descartar el sobrenadante. Dejar secar y resuspender el sedimento de ADN en 20 µl de agua destilada.

b. PCR específicas de presencia / ausencia de metilación

Se utilizaron los *primer* descritos en la bibliografía (Herman *et al.* 1998), adquiridos a través de *Sigma-Genosys Ltd* (Sigma-aldrich, Cambridgeshire, Gran Bretaña). La mezcla de PCR (Tabla III.7) fue amplificada en un termociclador *GeneAmp® 9700* (PE Applied Biosystems) de acuerdo con el programa de temperaturas de la Figura III.5.

Tabla III.7 Mezcla de PCR utilizada en el estudio de hipermetilación del promotor del gen *MLH1*. (1) Secuencia sentido del cebador específico de metilación 5'-ACGTAGACGTTTTATTAGGGTTCGC-3'. Secuencia sentido del cebador específico de ausencia de metilación 5'TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT-3'. (2) Secuencia antisentido del cebador específico de metilación 5'-CCTCATCGTAACTACCCGCG-3'. Secuencia antisentido del cebador específico de ausencia de metilación 5'-ACCACCTCATCATAACTACCCACA-3'. (3) Volumen necesario para conseguir 100 ng de ADN. (4) Cantidad de agua necesaria para completar el volumen de reacción.

	Volumen (µl)
ADN modificado	X ³
Primer sentido 20 µM ¹	0.5
Primer antisentido 20 µM ²	0.5
Tampón PCR 10X (+MgCl ₂)	2.5
dNTPs (1.25 mM)	4
ADN polimerasa (Herculase® Stratagene California USA)	0.2
Agua destilada	Y ⁴
Volumen final de reacción	25

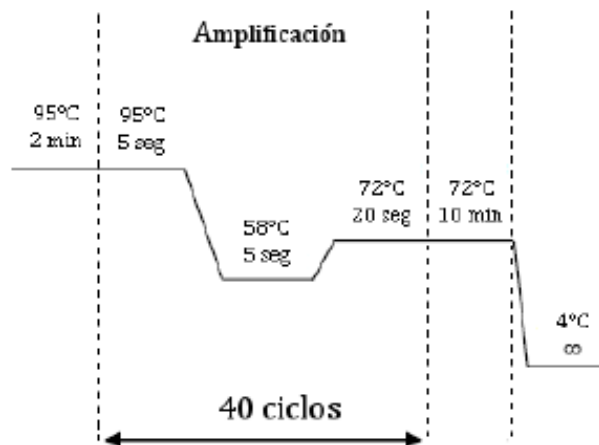


Figura III.5 Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la reacción de PCR utilizada para el estudio de hipermetilación del promotor del gen *MLH1*.

c. PCR independiente del estado de hipermetilación

Se utilizaron los *primers* descritos en la bibliografía (Herman *et al.* 1998), adquiridos a través de *Sigma-Genosys Ltd* (Sigma-aldrich, Cambridgeshire, Gran Bretaña). La mezcla de PCR (Tabla III.8) fue amplificada en un termociclador *GeneAmp®9700* (PE Applied Biosystems) de acuerdo con el programa de temperaturas de la Figura III.8.

Tabla III.8 Mezcla para la PCR independiente del estado de hipermetilación del promotor del gen *MLH1*. (1) Secuencia sentido 5' GAGTAGTTTTTTTTTTAGGAGTGAAG-3'. (2) Secuencia antisentido 5'-AAAAACTATAAAACCCTATACCTAATCTA-3'. (3) Volumen necesario para conseguir 100 ng de ADN. (4) Cantidad de agua necesaria para completar el volumen de reacción.

	Volumen (µl)
ADN modificado	X ³
Primer sentido 100 µM ¹	1
Primer antisentido 100 µM ²	1
Tampón PCR 10X (+MgCl ₂)	2.5
dNTPs (1.25 mM)	4
ADN polimerasa (Herculase® Stratagene California USA)	0.2
Agua destilada	Y ⁴
Volumen final de reacción	25

d. Digestión con el enzima de restricción *BstUI*

La modificación del ADN con bisulfito fue combinada con la digestión mediante enzimas de restricción (método COBRA, *Combined Bisulfite Restriction Analysis*). El producto de PCR (5 µl) fue digerido con la enzima *BstUI*, capaz de reconocer específicamente la secuencia 5'-CGCG-3'. Puesto que la secuencia de ADN se ve afectada por la modificación con bisulfito, los lugares de restricción quedarán determinados por el estado de metilación (Figura III.6).

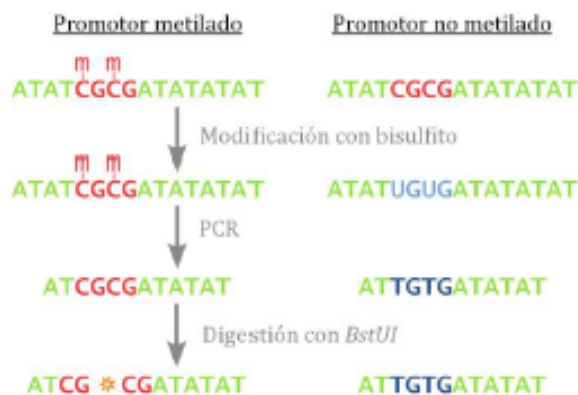


Figura III.6 Secuencia de pasos que conforman el método COBRA. Cuando las islas CpG se encuentran no metiladas, la modificación con bisulfito transforma las citosinas en uracilos y el producto de PCR no es reconocido por la enzima *Bst*UI.

La mezcla de digestión (Tabla III.9) fue incubada a 60°C durante 4 horas, posteriormente, los fragmentos digeridos fueron visualizados en gel de agarosa al 3%.

Tabla III.9 Mezcla para la digestión con la enzima *Bst*UI. (1) Volumen de dilución de ADN necesario para conseguir una adecuada visualización de los productos digeridos. (2) Cantidad de agua necesaria para completar el volumen total de la reacción. (3) Disolución tampón compuesta por Tris-HCl 10mM, NaCl 50mM, MgCl2 10mM y ditiotreitól 1mM

	Volumen (µl)
Producto de PCR	X ¹
Disolución tampón ³	1.5
<i>Bst</i> UI 10U/ µl	0.3
Agua destilada	Y ²
Volumen final de reacción	15

e. Secuenciación

El producto no digerido fue purificado para su posterior secuenciación. Los fragmentos fueron purificados con el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, los fragmentos fueron sometidos a electroforesis de alta resolución en un secuenciador *ABI PRISM® 3700* (PE

Applied Biosystems), y analizados con el software *GeneScan 3.5* (PE Applied Biosystems) Figura III.7

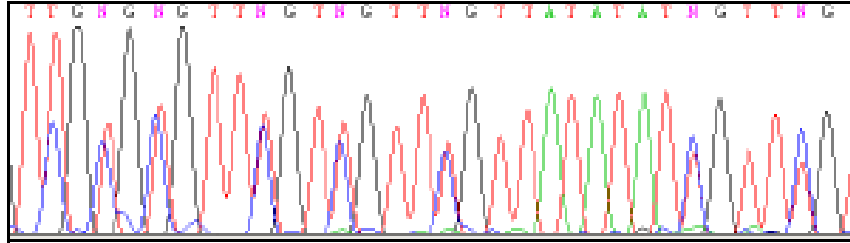


Figura III.7 Ejemplo de la secuencia obtenida en un paciente con hipermetilación del promotor del MLHA en uno de sus alelos, cuando solo uno de los alelos está metilado (heterocigosis), se observan dos picos superpuestos (C y T).

- Gen *MSH6*

El estudio de mutaciones del gen *MSH6* se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en condiciones parcialmente desnaturalizantes (dHPLC, *denatured high performance liquid chromatography*).

- Amplificación de exones y regiones intrónicas adyacentes

Los cebadores fueron inicialmente diseñados (ANEXO 2D) y posteriormente comprados a *Sigma-Genosys Ltd* (Sigma-aldrich, Cambridgeshire, Gran Bretaña). La composición de la mezcla de PCR fue común para todos los fragmentos (Tabla III.10), sin embargo, las condiciones de reacción fueron diferentes en función del fragmento que se iba a amplificar (ANEXO 2D). Se definieron tres programas de temperatura para que las condiciones fueran las idóneas para la reacción de amplificación de cada uno de los fragmentos; “PCR tiempo corto”, “PCR tiempo intermedio” y “PCR tiempo largo” (Figura III.8).

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador GeneAmp® 9700 (PE Applied Biosystems).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla III.10 Mezcla de PCR utilizada para la amplificación de exones y regiones intrónicas adyacentes al gen MSH6. (1) Volumen necesario para conseguir 100 ng de ADN. (2) Cantidad de agua destilada necesaria para completar el volumen final de la reacción

	Volumen (μl)
ADN purificado (100 ng)	x ¹
Primer sentido 10 μM	1
Primer antisentido 10 μM	1
Tampón PCR 10X (Roche)	2.5
MgCl ₂	1.5
dNTPs (1.25 mM)	4
ADN Taq polimerasa (Roche)	1
Agua destilada	y ²
Volumen final de reacción	25

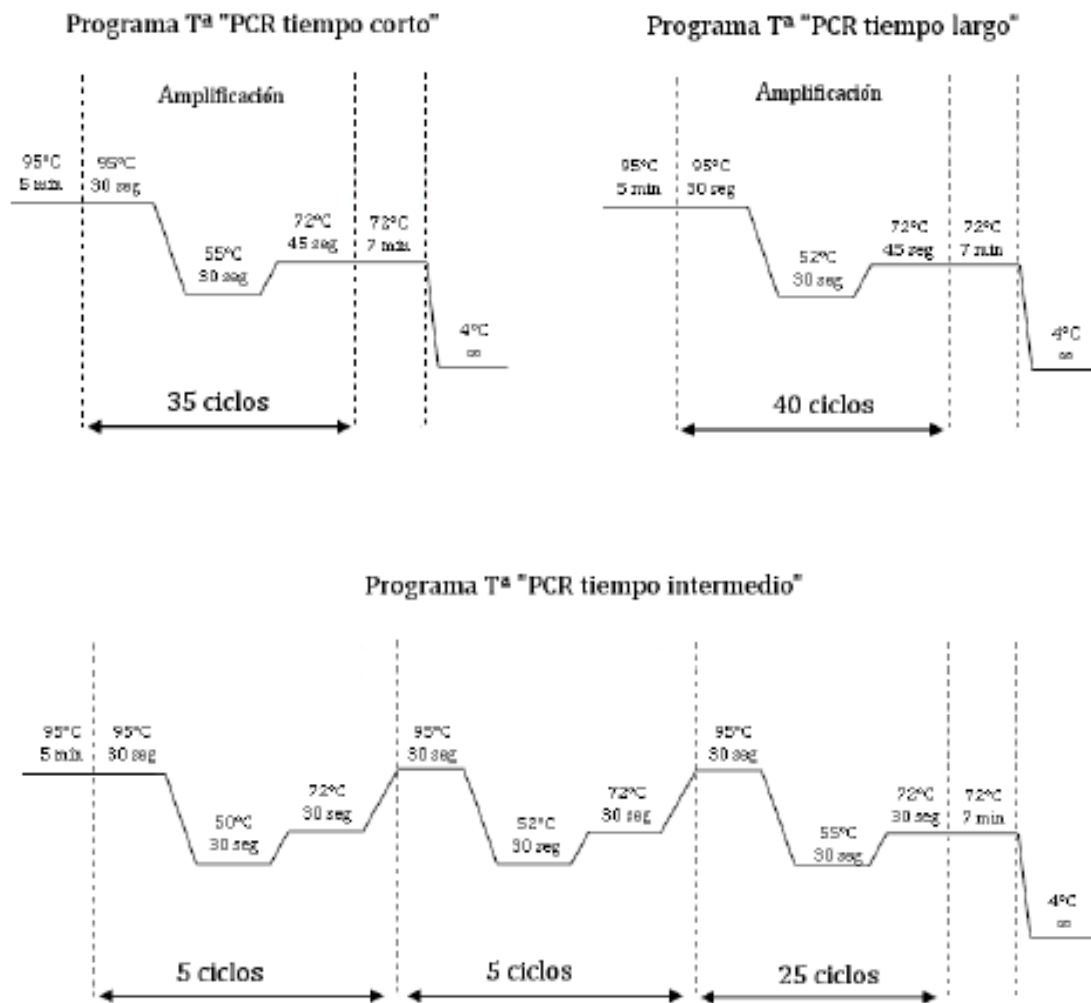


Fig III. 8 Esquema de los tres programas de temperatura diseñados para la amplificación de los distintos fragmentos de MSH6.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la evaluación del estado mutacional se utilizó el sistema WAVE® (Transgenomic, Gran Bretaña), basado en cromatografía de intercambio iónico en fase reversa, con posterior detección ultravioleta. La fase estacionaria se llevo a cabo mediante una matriz no porosa de bolsas poliméricas de poliestireno-divinilbenceno recubiertas de cadenas de 18 carbonos (Columna C-18), mientras que la fase móvil consistió en una combinación de TEAA 0.1M y acetonitrilo al 25%. Los resultados fueron analizados con el software Navigator™ (Transgenomic, Gran Bretaña) (Figura III.9)

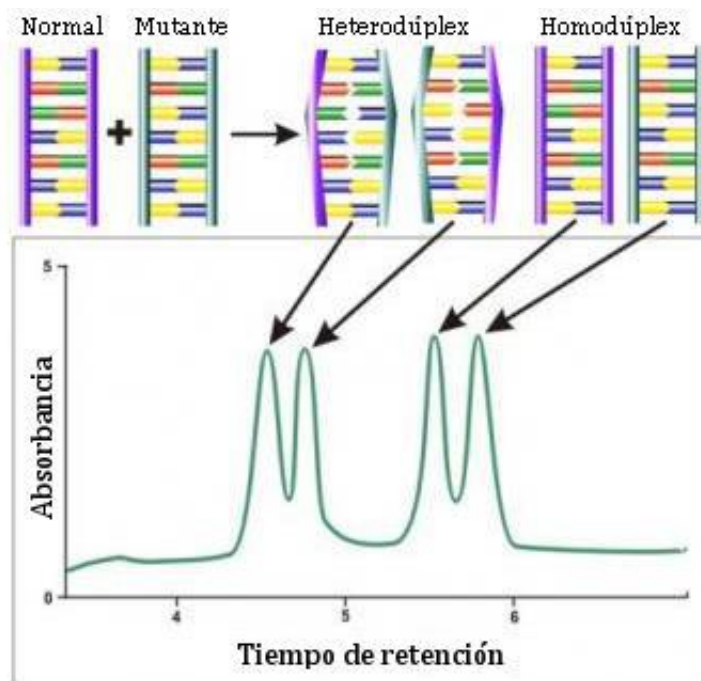


Figura III. 9 Ejemplo de la visualización del estado mutacional del gen *MSH6* mediante dHPLC. Los tiempos de retención varían en función de la naturaleza de heterodúplex u homodúplex de los fragmentos de PCR que pasan por el detector de PCR que pasan por el detector de UV. Imagen modificada de www.transgenomics.com

Los fragmentos fueron purificados con el kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, una vez purificados, se tomó 1 μ l del producto de y se le añadieron 12 μ l de formamida desionizada y 0.1 μ l de estándar interno TAMRA-500. Los fragmentos fueron sometidos a electroforesis de alta resolución en un secuenciador ABI PRISM® 3700 (PE Applied Biosystems), y analizados con el software GeneScan 3.5 (PE Applied Biosystems). Fueron secuenciados aquellos fragmentos con cromatogramas anómalos

sugestivos de heterodúplex “alelo normal-alelo mutado” u homodúplex “alelo mutado-alelo mutado”.

4. ESTUDIO MOLECULAR DE *BRAF*

El estado mutacional del exón 15 de *BRAF* (incluido el “punto caliente”, p.V600E, que acumula más del 90% de las mutaciones del gen), fue evaluado mediante análisis HRM (High Resolution Melting) en el sistema *LightCycler*® 480 de Roche (Roche Diagnostics). Se utilizó el reactivo comercial *LightCycler*® LC480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics) y unas secuencias de primers diseñadas con el sistema *NCBI Primer BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>):

5'-AATGCTTGCTCTGATAGGAAAATGA-3'(primer sentido)

5'GCAGCATCTCAGGGCCAAAA-3' (primer antisentido)

Cada reacción contenía 3 ng de ADN de cada primer, 3 mM de MgCl₂, disolución *LightCycler*® LC480 High Resolution Melting Máster (Roche Diagnostics) y agua destilada hasta un volumen final de 10 µl, siendo amplificada de acuerdo con el programa de temperaturas detallado en la Figura III.3

La reacción abarcó desde los 40°C hasta los 93°C, con una pendiente de 0.02°C por segundo. Los productos de PCR fueron purificados con *ExoSAP-IT*® (Affymetric, Santa Clara, CA) y secuenciadas utilizando el kit *BigDye*® terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) en un secuenciador automático *ABI PRIMS*®3130 (Applied Biosystems). (Figura III. 12)

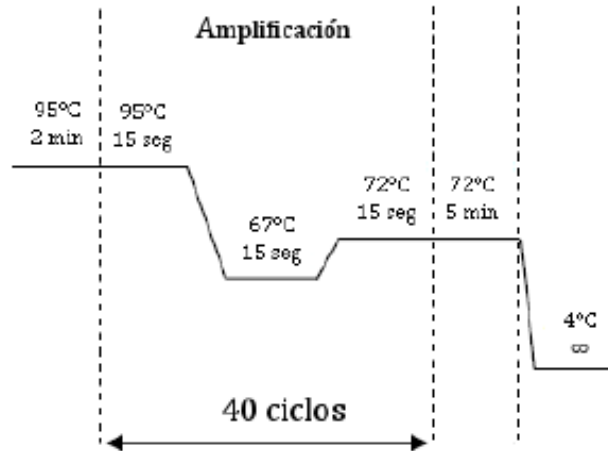


Figura III.10. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en el análisis HRM para el estudio molecular del gen *BRAF*.

5. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA MEDIANTE ARRAYS DE CGH (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION)

Este estudio fue realizado con la colaboración del Dr. Juan Luis García, integrante del Departamento de Genética molecular en Onco-Hematología del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca.

5.1 Marcaje fluorescente

Se utilizó como espécimen de referencia *Human Genomic DNA Male G1471/Female G1521* (Promega Corporation, Madison, USA). Las muestras de ADN control y problema fueron marcadas con el kit *NimbleGen Dual-Colon DNA Labelling* (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania). El ADN tumoral fue etiquetado con Cy3 (fluoróforo verde) y el ADN de referencia como Cy5 (fluoróforo rojo).

Para llevar a cabo la elongación de la cadena, se incubó la muestra con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y una mezcla de dNTPs (5mM cada uno de

ellos) a una temperatura de 37°C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se añadió EDTA 0.5M para detener la reacción y posteriormente se precipitó la muestra se lavó con etanol y se cuantificó (Fig III.10)

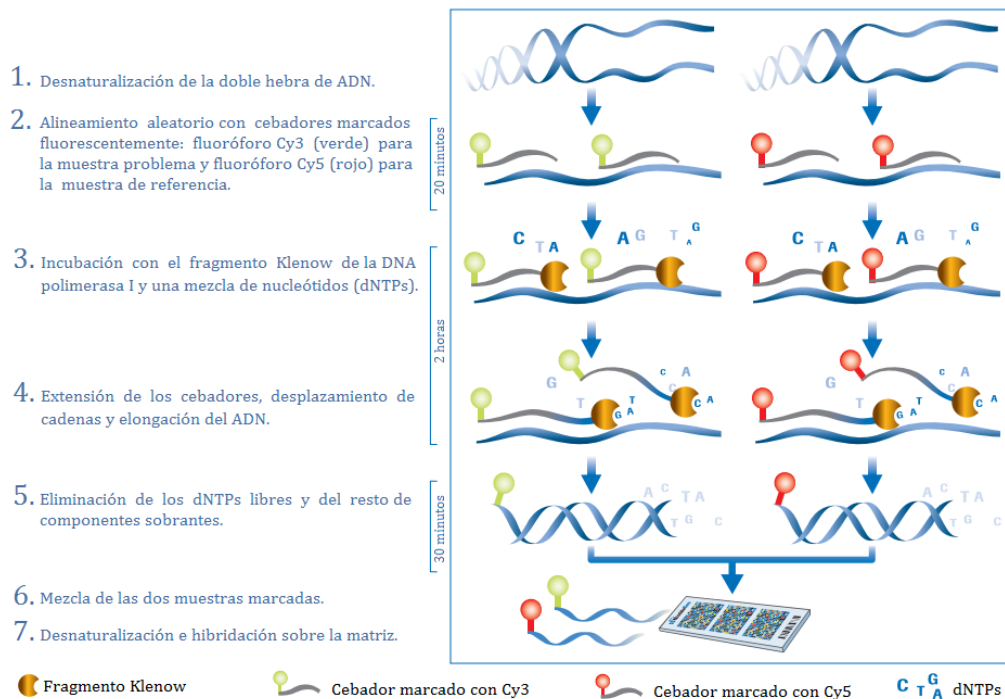


Fig.III.11 Esquema del marcado fluorescente para la hibridación de muestras en microarray. Imagen tomada del manual *NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kits 48 and 192 Reactions*” (Roche Diagnostics)

5.2 Hibridación sobre microarrays

Tras cuantificar las cantidades de ADN marcado, se llevó a cabo la hibridación sobre una matriz de microarray siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Se aplicó 1µg en cantidades equimolares de la muestra problema y de la muestra control sobre un microarray de oligonucleótidos provisto por NimbleGen (Roche NimbleGen Inc., Reykjavik, Islandia). El formato de microarray empleado (12x135K) permitió la determinación simultánea de 12 pares de muestras independientes sobre el mismo soporte y cada uno de ellos fue evaluado mediante 135.000 sondas isotérmicas empíricamente testadas. Estas sondas abarcaban por completo el genoma humano, con una separación media de 12.524 pares de bases y una longitud aproximada de 45-75 bases (Fig III.11).

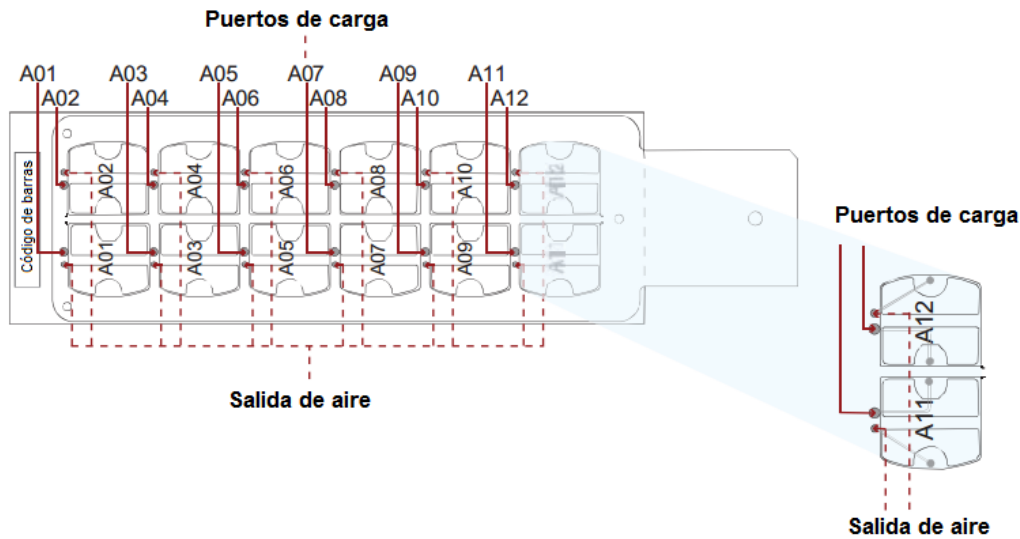


Fig III.12 Esquema placa de microarray CGH empleado para el análisis de las muestras (formato 12x135, Roche NimbleGen Inc., Reykjavik, Islandia) Imagen tomada del manual NimbleGen Arrays User's Guide (Roche Diagnostics)

La hibridación se llevó a cabo durante 48h a una temperatura de 42°C, en una cámara de hibridación de Roche NimbleGen. Finalizada esta etapa, las placas fueron lavadas y secadas en varias ocasiones, para garantizar la calidad de los datos generados.

5.3 Escaneado y procesamiento de los datos

Las placas de microarray fueron examinadas con un escáner de microarrays MS 200 (Roche NimbleGen Inc., Reykjavik, Islandia), que midió las intensidades de Cy3 y Cy5 a 532 y 635 respectivamente. Las imágenes fueron procesadas mediante MS 200 Data Collection Software (Roche NimbleGen Inc.) e importadas (formato .tif) al software DEVA v1.2.1 (Roche NimbleGen Inc.) para su análisis.

Todas las intensidades de fluorescencia fueron corregidas restando el valor de la señal de fondo. Posteriormente se calculó la ratio Cy5/Cy3 de cada segmento y se transformó en logaritmo en base 2 (\log_2 ratio), que fue normalizado con respecto a los ratios de todos los autosomas (los cromosomas sexuales fueron excluidos del estudio).

En condiciones normales, las dos muestras de ADN compiten en igualdad de condiciones par hibridar sobre las sondas de array, observándose el color correspondiente a la suma de ambos fluorocromos (amarillo). En situaciones de pérdida o ganancia de material genético, la competencia entre muestras hace que el color observado corresponda al fluorocromo hibridado en mayor proporción. Por tanto:

- Cuando $\log_2 \text{ratio} > 0$ --> $\text{Cy5} > \text{Cy3}$. El color observado fue rojo, indicando una menor dosis génica en el ADN tumoral que en la muestra de referencia.
- Cuando $\log_2 \text{ratio} < 0$ --> $\text{Cy5} < \text{Cy3}$. El color observado fue verde, indicando una mayor dosis génica en el ADN tumoral que en la muestra de referencia.
- Cuando $\log_2 \text{ratio} = 0$ --> $\text{Cy5} = \text{Cy3}$. El color observado fue amarillo (suma de rojo y verde). Indicando la misma dosis génica en el ADN tumoral que en la muestra de referencia.

En todos los casos se utilizó el método CBS (Circular Binary Segmentation), un procedimiento que permite ubicar las CNV mediante una serie de hipótesis estadísticas (Olshen et al. 2004). Este método se encuentra disponible en el Software waviCGH, un servidor web para el análisis y visualización de datos procedentes de arrays-CGH (Carro et al. 2010).

Todas las regiones cromosómicas que exhibieron cambios en el número de copias fueron examinadas utilizando el navegador UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) para determinar la ubicación y la importancia del cambio detectado.

5.4 Cálculo del índice de inestabilidad genómica

Se consideraron estables, todos aquellos tumores con una proporción de genoma aberrante inferior al 20%.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos obtenidos mediante arrays-CPG se utilizaron para calcular el índice de inestabilidad genómica (GII, Genomic Instability Index). Éste índice fue computado de dos maneras diferentes teniendo en cuenta el método descrito por Bonnet y sus colaboradores en 2012 (Bonnet et al. 2012):

- Fracción de genoma alterado, teniendo en cuenta el valor normalizado del número total de segmentos evaluados.
- Número de copias de los segmentos alterados con respecto al total de los segmentos del ensayo.

Posteriormente, todos los segmentos analizados fueron comparados con el valor normalizado de segmentos alterados, para definir su estado GNL (*Gain, normal, loss*).

El índice de inestabilidad genómica total (GIII total) se calcula teniendo en cuenta todos los segmentos que no se encuentran en un estado de GNL normal, con la siguiente fórmula matemática:

$$\mathbf{GII\ total} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i \neq 0) = 1 - \frac{1}{n \sum_{i=1}^n (x_i = 0)}$$

n = número total de brazos cromosómicos estudiados

X_n = Datos obtenidos para cada segmento

La escala ordinal de los datos permite descomponer el GII total en distintas fracciones, posibilitando el cálculo de la porción de genoma por cada tipo de aberración (ganancia o pérdida), únicamente cambiando la etiqueta $x_i \neq 0$ por; $x_i = +1$ y $x_i = -1$, respectivamente.

$$\mathbf{GII\ ganancias} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i = +1)$$

$$\mathbf{GII\ pérdidas} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i = -1)$$

n = número total de brazos cromosómicos estudiados

X_n = Datos obtenidos para cada segmento

5.5 Cálculo del número y frecuencia de las CNV

Con el objetivo de establecer el perfil de inestabilidad de nuestra muestra y definir las alteraciones genéticas específicas de la misma se generaron curvas de frecuencia que plasmaron gráficamente los patrones globales de INC:

Una vez establecida una idea cuantitativa se realizó una descripción cualitativa de las CNV. Inicialmente se calculó la cifra promedio de cada alteración en cada tumor y posteriormente en la muestra completa.

Tanto las alteraciones recurrentes como su frecuencia fueron comparadas en busca de rasgos comunes y/o diferenciados entre los tumores localizados en las distintas partes del colon, considerándose las diferencias estadísticamente significativas entre las distintas localizaciones como posibles vías de carcinogénesis específicas de dicha localización.

6. ANÁLISIS DEL FENOTIPO METILADOR DE ISLOTES DE CpG

El estado de metilación de las regiones promotoras del panel de genes del Fenotipo Metilador de Islotes CpG comprende los siguientes genes: *CACNA1G*, *CDKN2A*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* Y *SOCS1* (Ogino S et al. 2006, Weisenberger DJ. et al. 2006). Estos genes fueron estudiados mediante la técnica de “methylation specific multiplex ligation-dependent probe amplification” (MS-MLPA) (Nygren AO et al. 2005), con el kit comercial SALSA MLPA (ME042-B1, MRC-Holland), siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante.

Los productos de MSMLPA fueron analizados mediante electroforesis capilar en un analizador 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y los resultados de esta examinados con el software Genemapper v3.5.

El índice de metilación de los locus CpG específicos, se calcularon dividiendo el área normalizada de una muestra de una sonda digerida y su equivalente no digerido (Ogino S et al 2007).

- FM – Alto se definió como la presencia de $> 6/8$ promotores de genes metilados
- FM – Bajo si presentaban entre 1-5/8 promotores de genes metilados
- FM – 0 si no existían promotores metilados 0/8

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el estudio descriptivo, las variables cualitativas vienen expresadas por número de casos (n), acompañadas del porcentaje total de casos de la variable en cuestión. Las variables cuantitativas vienen expresadas mediante la media y la desviación estándar.

Para comparar las características clínico-patológicas, familiares, genéticas e inmunohistoquímico entre las diferentes categorías dentro de cada grupo y entre los grupos, se utilizó la prueba *Chi cuadrado* (χ^2) de Pearson para variables categóricas, y el *test exacto de Fisher* (test no paramétrico). Las medias de las edades de aparición de la enfermedad (variables continuas) se compararon mediante la prueba de *T de Student* para muestras independientes. Se realizó la prueba estadística de ANOVA (variables continuas) para en aquellos casos en los que se compararon variables continuas de más de dos categorías.

Para la realización de estas pruebas se utilizó el programa estadístico SPSS v.20.0 para Windows (Chicago, Illinois, EE. UU.).

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

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-CLÍNICAS Y FAMILIARES

1.1 MUESTRA TOTAL

Se incluyeron en el estudio un total de 88 pacientes procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid) todos ellos cumplían criterios de inclusión; tenían una edad igual o inferior de 45 años y habían sido tratados de un CCR primario entre Enero de 2002 y Diciembre de 2009.

Seis de estos pacientes fueron excluidos finalmente del estudio por cumplir criterios de poliposis adenomatosa familiar, y por tanto tener identificadas claramente sus bases moleculares.

A. Edad al diagnóstico y sexo.

La edad media de diagnóstico de CCR fue de 39.56 años con una desviación estándar de 4.9 años, con un rango de edad que iba desde los 27 años como edad más precoz y 45 años como edad más tardía de diagnóstico.

En el caso del sexo se encontró un predominio de hombres (49 casos, 59.8%) sobre las mujeres (33 casos, 40.2%). (Tabla IV.1)

TABLA IV.1 CCR < 45a según edad y sexo

CARACTERÍSTICAS	CCR <45a n (%)
PACIENTES	82 (100)
EDAD (DE)	39.56 (4.9)
SEXO	
Varones	49 (59.8)
Mujeres	33 (40.2)

B. Localización tumoral.

La localización tumoral en el grupo de estudio fue bastante equilibrada, observándose un ligero predominio de los tumores localizados en el colon izquierdo 42.7%, frente a los localizados en colon derecho (24.45) y recto (32.7%). (Tabla IV.2)

TABLA IV.2 CCR < 45 a y localización

CARACTERÍSTICAS	CCR <45a n (%)
LOCALIZACIÓN	
Colon derecho	20 (24.4)
Colon izquierdo	35 (42.7)
Recto	27 (32.9)

C. Características histológicas

Respecto a las características histológicas, sólo 60 pacientes del total de la muestra (74%) fueron clasificados como adenocarcinoma y los 22 restantes (27%) resultaron carcinoma sobre pólipos malignizados.

Entre las características de los adenocarcinomas podemos decir que en un 13.3% de eran pobremente diferenciados, el 32% eran productores de mucina y el 7% eran tumores con células en anillo de sello o “signet ring cells”. (Tabla IV.3)

TABLA IV.3 CCR < 45 a y características histológicas

CARACTERÍSTICAS	CCR <45a n (%)
INDIFERENCIADOS	8/60 (13.3)
MUCOSECRETORES	19/60 (32)
CÉLULAS ANILLO DE SELLO	4/60 (7)

D. Estadio Tumoral

Para la estadificación tumoral se tuvo en cuenta la clasificación de Dukes, pudiendo observarse una distribución homogénea, con un ligero predominio de los estadios A (28%) y B (31.7%) frente a estadios avanzados C (17.1%) y D (23.2%). (Tabla IV.4)

TABLA IV.4 CCR < 45 a y estadio tumoral.

CARACTERÍSTICAS	CCR <45a n (%)
ESTADIO TUMORAL (<i>Dukes</i>)	
A	23 (28)
B	26 (31.7)
C	14 (17.1)
D	19 (23.2)

E. Pólipos asociados y otras neoplasias

Más de la mitad de los pacientes (56%) presentaron pólipos colónicos (antes, sincrónicos o posteriores a la intervención), siendo el número medio de estos 1.8; estos pólipos fueron predominantemente adenomatosos (47.8%), en segundo lugar, mixtos (34.8%) y con menor frecuencia hiperplásicos (17.4%). Un total de 5 pacientes presentó otros tumores primarios en el colon, 4 de ellos de forma sincrónica y 1 de ellos de forma metacrónica. Por otro lado 9 pacientes presentaron neoplasias extracolónicas, de las cuales dos de ellas se asociaban a síndrome de Lynch. En total el 13.4 % de los pacientes presentó neoplasia primaria múltiple en el tiempo que duró el estudio. (Tabla IV.5)

TABLA IV.5 CCR < 45 a y pólipos asociados

CARACTERÍSTICAS	CCR <45a n (%)
PÓLIPOS ASOCIADOS	46 (56)
Nº MEDIO (DS)	1.8 (2.5)
TIPO HISTOLÓGICO	
Adenomatosos	22 (47.8)
Hiperplásicos	8 (17.4)
Mixtos	16 (34.8)
CCR sincrónico	4 (4.8)
CCR metacrónico	1 (1.2)
Neoplasia primaria múltiple	11 (13.4)

F. Historia familiar de cáncer de colon.

En cuanto a las características familiares de la muestra, el 18% de las familias presentaba criterios Ámsterdam II para el SL. Llama la atención que 27 familias (33%) tenían criterios de agregación familiar y neoplasias asociadas características del SL, sin llegar a cumplir los mencionados criterios y además 9 familias (11%) presentaron criterios de agregación familiar para neoplasias diferentes a las del espectro SL. El número de casos esporádicos de la muestra fue del 31 (38%). (Tabla IV.6)

TABLA IV.6 CCR < 45 a e historia familiar

CARACTERÍSTICAS	CCR <45a n (%)
Hª CÁNCER FAMILIAR	
Familiar con criterios Ámsterdam II	15 (18)
Agregación familiar + neoplasia Lynch	27 (33)
Agregación familiar + neoplasia no Lynch	9 (11)
ESPORÁDICO	31 (38)

G. Supervivencia

La supervivencia global media fue de 58.51% y la supervivencia libre de enfermedad de 50.79 meses, si excluimos de la muestra los pacientes que en el momento del diagnóstico presentaban enfermedad a distancia (19), la

supervivencia global se incrementa hasta 71.54 % y la supervivencia libre de enfermedad hasta 66.71 meses. (Tabla IV.7)

Entre los pacientes que no presentaban enfermedad a distancia al diagnóstico, 10 (15.8%) presentaron recidiva tumoral, 3 de ellos (30%) a nivel locorregional y 7 de ellos (70%) a distancia. (Tabla IV.7)

La mortalidad global de la muestra fue del 31,7% (26 pacientes), con una edad media al fallecimiento de 43 años. (Tabla IV.7)

TABLA IV.7 CCR < 45 a y pronóstico

CARACTERÍSTICAS	CCR <45a n (%)
SUPERVIVENCIA GLOBAL	58.51
SLE	50.79
SUPERVIVENCIA GLOBAL *	71.54
SLE *	66.7
RECIDIVA TUMORAL SI/NO	10 (15.8)
TIPO RECIDIVA	
Locorregional	3 (30)
A distancia	7 (70)
MORTALIDAD SI/NO	26 (31.7) / 56 (68.3)

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

SLE: supervivencia libre de enfermedad

1.2 MUESTRAS POR LOCALIZACION TUMORAL.

A. Tumores de colon derecho

Un total de 20 (24%) pacientes de las muestras se localizaron en el colon derecho. Los sujetos de este grupo tenían una edad media de 39.1 años y no existía un claro predominio entre sexos; la mitad de los sujetos fueron mujeres y la mitad varones. (Tabla IV.8)

En cuanto a las características histológicas, estas solo se estudiaron en 16 muestras, ya que el resto de las biopsias fueron pólipos degenerados o casos en estadio IV, paliativos sin cirugía. El 25% de los tumores eran pobremente diferenciados, solamente 6 (37.5%) eran secretores de mucina y ninguno de ellos tenía células en anillo de sello. (Tabla IV.8)

La mayor parte de los tumores tenían un estadio Dukes intermedio, un 20% eran tumores limitados a la pared colónica (estadio A), el 60% infiltraban la serosa o grasa mesentérica (estadio B), el 15% tenían ganglios positivos (estadio C) y sólo en un caso (5%) se identificó metástasis a distancia (estadio D).

En el 14% de los pacientes con una lesión en colon derecho, se identificaron otros pólipos asociados, el número medio de estos fue de 3 por paciente y la mitad de ellos tenían componente mixo (50%), un 36% eran adenomatosos y solo dos de ellos (14% hiperplásicos). El 20% de los pacientes intervenidos tuvo otro tumor en el colon de forma sincrónica o metacrónica y el 25% tenía asociado otro tumor primario en otra localización incluida la colónica. (Tabla IV.8).

En cuanto a las características familiares de este grupo tenemos que un total de 8 pacientes (40%), cumplían criterios Ámsterdam para SL, 7 pacientes (35%) presentaban agregación familiar y neoplasia del espectro Lynch y solo un paciente (5%) tenía

agregación familiar para SL y neoplasias no relacionadas con el mismo. Los casos esporádicos fueron 4 (20%). (Tabla IV.8)

El pronóstico de estos pacientes fue similar al de la muestra total, con una supervivencia global del 34.5% y una supervivencia libre de enfermedad del 42.6 %. (Tabla IV.8)

TABLA IV.8 Características clínico-patológicas del CCR en colon derecho en <45 a

CARACTERÍSTICAS	CCR derecho <45a n (%)
PACIENTES	20 (24)
EDAD (DE)	39.1 (6)
SEXO	
Varones	10 (50)
Mujeres	10 (50)
CARACTERÍSTICAS HITOLÓGICAS	
Indiferenciados	4/16 (25)
Mucosecretorios	6/16 (37.5)
Células anillo de sello	0/16 (0)
ESTADIO TUMORAL (<i>Dukes</i>)	
A	4 (20)
B	12 (60)
C	3 (15)
D	1 (5)
PÓLIPOS ASOCIADOS	14 (70)
Nº MEDIO (DS)	3 (3.2)
TIPO HISTOLÓGICO	
Adenomatosos	5 (36)
Hiperplásicos	2 (14)
Míxtos	7 (50)
CCR sincrónico o metacrónico	4 (20)
Neoplasia primaria múltiple	5 (25)
Hº CÁNCER FAMILIAR	
Familiar con criterios Amsterdam II	8 (40)
Agregación familiar + neoplasia Lynch	7 (35)
Agregación familiar + neoplasia no Lynch	1 (5)
ESPORÁDICO	4 (20)
SUPERVIVENCIA GLOBAL (SD)	81.6 (34.5)
SLE	72.4 (42.6)

DE: desviación estándar, SLE: supervivencia libre de enfermedad,

B. Tumores de colon izquierdo

El colon izquierdo fue la localización más frecuente para los tumores de la muestra, un 43% (35) se asentaron aquí, la mayor parte de los pacientes eran varones (63% vs 27%) y la edad media de los sujetos era similar a la del grupo del colon derecho (39.3 años). (Tabla IV.9)

Solo 24 muestras fueron detalladas histológicamente, de ellas 3 tumores (12.5 %) eran tumores pobremente diferenciados, 8 de ellos (33%) poseían células productoras de mucosidad y 2 (8%) presentaron células en anillo de sello. (Tabla IV.9)

En cuanto al estadio tumoral de las muestras, se observó un reparto uniforme para tumores estadio A y estadio B (34%), solo 3 muestras (9%) tenían ganglios positivos (estadio C) y un 23% tenían extensión a distancia al diagnóstico. (Tabla IV.9)

Un total de 21 pacientes (60%), tenían pólipos en otras localizaciones del colon, cuyo número medio fue de 1.6 por pacientes. El tipo histológico más frecuente eran los adenomatosos (48%), siendo los hiperplásicos y mixtos los menos frecuentes, 19% y 33% respectivamente. (Tabla IV.9)

Ninguno de los individuos de la muestra tuvo una neoplasia colorrectal sincrónica o metacrónica y 4 pacientes (11%) tenía una neoplasia primaria múltiple. (Tabla IV.9)

En un 48% de los casos, los tumores desarrollados en el seno de las familias de los pacientes eran tumores esporádicos, un total de 6 familias (17%) cumplían criterios Amsterdam II para SL, 6 familias (17%) presentaban agregación familiar para SL y tumores relacionados con este síndrome y otras 6 familias (17%) agregación familiar para SI y tumores no típicos de este síndrome. (Tabla IV.9)

La supervivencia global fue del 32.6% y la supervivencia libre de enfermedad fue del 37.2%. (Tabla IV.9)

TABLA IV.9 Características clínico-patológicas del CCR en colon izquierdo en <45 a

CARACTERÍSTICAS	CCR izquierdo <45a n (%)
PACIENTES	35 (43)
EDAD (DE)	39.3 (4.2)
SEXO	
Varones	22 (63)
Mujeres	13 (37)
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS	
Indiferenciados	3/24 (12.5)
Mucosecretorios	8/24 (33)
Células anillo de sello	2/24 (8)
ESTADIO TUMORAL (<i>Dukes</i>)	
A	12 (34)
B	12 (34)
C	3 (9)
D	8 (23)
PÓLIPOS ASOCIADOS	21 (60)
Nº MEDIO (DS)	1.6 (1.9)
TIPO HISTOLÓGICO	
Adenomatosos	10 (48)
Hiperplásicos	4 (19)
Míxtos	7 (33)
CCR sincrónico o metacrónico	0 (0)
Neoplasia primaria múltiple	4 (11)
Hº CÁNCER FAMILIAR	
Familiar con criterios Ámsterdam II	6 (17)
Agregación familiar + neoplasia Lynch	6 (17)
Agregación familiar + neoplasia no Lynch	6 (17)
ESPORÁDICO	17 (48)
SUPERVIVENCIA GLOBAL	55.4 (32.6)
SLE	48.7 (37.2)

DE: desviación estándar, SLE: supervivencia libre de enfermedad,

C. Tumores de recto

En 27 pacientes de la muestra (33%) la lesión estudiada estaba localizada en recto, el 63% de los pacientes (17) eran varones y la edad media del grupo era de 40.2 años, similar al resto de grupos. (Tabla IV.10)

Se estudiaron las características histológicas de un total de 20 muestras y se observó que solamente un tumor era indiferenciado (5%), 5 de ellos eran productores de mucina (25%) y 2 muestras (10%) tenían células en anillo de sello. (Tabla IV.10)

En este caso, a diferencia con respecto al resto de grupos, el estadio mayoritario era el D con 10 pacientes (37%), en tercer lugar, el C con 8 pacientes (37%), en segundo lugar el A con 7 pacientes (26%) y el estadio minoritario el B con 2 pacientes (7%). (Tabla IV.10)

Un 41% de los pacientes presentaron pólipos a lo largo del seguimiento, siendo la media de estos de 1.2. por paciente. El tipo histológico más frecuente eran los adenomas 64%, siendo la proporción de hiperplásicos y mixtos equivalentes (18%). Un solo paciente presentó una neoplasia metacrónica en colon (4%) y 2 pacientes presentaron múltiples neoplasias primarias (7%). (Tabla IV.10)

En cuanto a las características familiares de este grupo, sólo una familia (4%) presentó criterios Ámsterdam II + para SL, un total de 14 familias (56%) presentaron agregación familiar para SL y neoplasias del espectro Lynch, 2 familias presentaron agregación familiar para neoplasias diferentes del espectro Lynch y por último en un total de 10 familias los tumores se consideraron esporádicos (37%). (Tabla IV.10)

La supervivencia global de los pacientes que desarrollaron tumores en esta localización fue del 29.4% y la supervivencia libre de enfermedad de 36.7 meses. (Tabla IV.10)

TABLA IV.10 Características clínico-patológicas del CCR en recto en <45

CARACTERÍSTICAS	CCR recto<45a n (%)
PACIENTES	27 (33)
EDAD (DE)	40.2 (4.69)
SEXO	
Varones	17 (63)
Mujeres	10 (37)
CARACTERÍSTICAS HITOLÓGICAS	
Indiferenciados	1/20 (5)
Mucosecretorios	5/20 (25)
Células anillo de sello	2/20 (10)
ESTADIO TUMORAL (<i>Dukes</i>)	
A	7 (26)
B	2 (7)
C	8 (30)
D	10 (37)
PÓLIPOS ASOCIADOS	11 (41)
Nº MEDIO (DS)	1.2 (2.3)
TIPO HISTOLÓGICO	
Adenomatosos	7 (64)
Hiperplásicos	2 (18)
Míxtos	2 (18)
CCR sincrónico o metacrónico	1 (4)
Neoplasia primaria múltiple	2 (7)
Hº CÁNCER FAMILIAR	
Familiar con criterios Amsterdam II	1 (4)
Agregación familiar + neoplasia Lynch	14 (56)
Agregación familiar + neoplasia no Lynch	2 (8)
ESPORÁDICO	10 (37)
SUPERVIVENCIA GLOBAL (SD)	44.6 (29.4)
SLE	36.7 (35.2)

1.3 ANÁLISIS COMPARATIVO POR LOCALIZACIONES

Una vez realizado el estudio descriptivo de las características anatómo-clínicas y familiares de la muestra general y de cada localización por separado, se analizaron las

diferencias de cada característica entre grupos. Estos resultados se muestran detalladamente en la tabla IV.11.

La edad media de diagnóstico entre los CCR de los diferentes grupos fue similar, alrededor de los 40 años, no existiendo diferencias significativas entre grupos. En cuanto al sexo se observó un predominio de varones frente a mujeres para los tumores localizados en colon izquierdo y recto; pero estas diferencias no fueron significativas. (Tabla IV.11)

Los tumores de colon derecho fueron los más indiferenciados y también aquellos con mayor componente mucinoso; siendo mayores las células en anillo de sello en los tumores rectales; sin alcanzar significación estadística. (Tabla IV.11)

El 80% de los tumores localizados en colon derecho presentaron estadios precoces, A y B de Dukes; mientras que los tumores más avanzados, estadios C y D, estaban localizados en recto. En los tumores de colon izquierdo se observó una distribución más homogénea en cuanto al estadio tumoral. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para todos los grupos. (Tabla IV.11)

En cuanto al número de pólipos colónicos asociados, y el hallazgo de tumores sincrónicos y metacrónicos; estos fueron mayores en los pacientes con tumores localizados en colon derecho, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. En el caso de las neoplasias primarias múltiples, fue más frecuente encontrarlos en pacientes con tumores en colon derecho, pero estas diferencias no fueron significativas. (Tabla IV.11)

El 40% de los pacientes con tumores en colon derecho presentaron criterios Ámsterdam II para SL, el porcentaje más elevado de agregación familiar para SL y tumores del espectro Lynch fue para los pacientes con tumores localizados en recto (56%), los casos esporádicos fueron más frecuentes en los sujetos con tumores en colon

IV.RESULTADOS

izquierdo (48%); siendo todos estos hallazgos estadísticamente significativos. (Tabla IV.11)

En cuanto al pronóstico, estudiado en supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, este empeoraba progresivamente desde el colon derecho al recto, mostrando mejor pronóstico los tumores localizados en colon derecho y peor pronóstico los localizados en recto; siendo estos hallazgos estadísticamente significativos. (Tabla IV.11)

TABLA IV.11 Comparativa en las características clínico-patológicas del CCR según su localización en <45 a

CARACTERÍSTICAS	CCR <45a n (%)	CCR derecho <45a n (%)	CCR izquierdo <45a n (%)	CCR recto <45a n (%)	P
PACIENTES	82 (100)	20 (24)	35 (43)	27 (33)	
EDAD (DE)	39.6(4.9)	39.1 (6)	39.3 (4.2)	40.2 (4.69)	NS
SEXO					
Varones	49 (59.8)	10 (50)	22 (63)	17 (63)	
Mujeres	33(40.2)	10 (50)	13 (37)	10 (37)	NS
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS					
Indiferenciados	8/60 (13.3)	4/16 (25)	3/24 (12.5)	1/20 (5)	NS
Mucosecretorios	19/60 (32)	6/16 (37.5)	8/24 (33)	5/20 (25)	NS
Células anillo de sello	4/60 (7)	0/16 (0)	2/24 (8)	2/20 (10)	NS
ESTADIO TUMORAL (<i>Dukes</i>)					
A	23 (28)	4 (20)	12 (34)	7 (26)	
B	26 (32)	12 (60)	12 (34)	2 (7)	
C	14 (17)	3 (15)	3 (9)	8 (30)	
D	19 (23)	1 (5)	8 (23)	10 (37)	0.002
PÓLIPOS ASOCIADOS	46 (56)	14 (70)	21 (60)	11 (41)	NS
Nº MEDIO (DS)	1.8 (2.5)	3 (3.2)	1.6 (1.9)	1.2 (2.3)	0.046
TIPO HISTOLÓGICO					
Adenomatosos	22 (48)	5 (36)	10 (48)	7 (64)	NS
Hiperplásicos	8 (17)	2 (14)	4 (19)	2 (18)	
Mixtos	16 (35)	7 (50)	7 (33)	2 (18)	
CCR sincrónico o metacrónico	5 (6)	4 (20)	0 (0)	1 (4)	0.01
Neoplasia primaria múltiple	11 (13)	5 (25)	4 (11)	2 (7)	NS
Hº CÁNCER FAMILIAR					0.006
Criterios Amsterdam II	15 (18)	8 (40)	6 (17)	1 (4)	
Agregación + neoplasia Lynch	27 (33)	7 (35)	6 (17)	14 (56)	
Agregación + neoplasia no Lynch	9 (11)	1 (5)	6 (17)	2 (8)	
ESPORÁDICO	31 (38)	4 (20)	17 (48)	10 (37)	
SUPERVIVENCIA GLOBAL (DE)	58.5 (34.5)	81.6 (34.5)	55.4 (32.6)	44.6 (29.4)	<0.001
SLE	50.8 (39.9)	72.4 (42.6)	48.7 (37.2)	36.7 (35.2)	0.006

SLE: supervivencia libre de enfermedad.

2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

2.1 MUESTRA TOTAL

Del total de la muestra incluida en el estudio, como se ha indicado con anterioridad, 6 pacientes fueron excluidos por presentar PAF y un paciente no pudo incluirse en el estudio molecular por no obtenerse muestra suficiente para su análisis, en este caso se trató de un paciente con un tumor rectal. Por tanto, el estudio molecular se llevó a cabo en los 81 pacientes restantes.

A. VÍA MUTADORA O INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Un total de 12 casos de la muestra analizada (14.8%) presentó inestabilidad de microsatélites (IMS, inestabilidad de microsatélites), el resto de los tumores fueron estables (85.2%) (EMS, estabilidad de microsatélites). (Tabla IV.12)

TABLA IV.12 Características moleculares de la vía mutadora en CCR <45 a

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	CCR <45a n (%)
VIA MUTADORA IMS	
IMS	12/81 (14.8)
EMS	69/81 (85.2)

Estudio inmunohistoquímico tumoral

En el estudio inmunohistoquímico de las proteínas correspondientes al sistema de reparación MMR, se identificó una ausencia de expresión de la proteína Mlh1 en cinco tumores inestables, en cuatro de ellos la pérdida de expresión era secundaria a una mutación germinal y uno de ellos se acompañaba de una pérdida de expresión de Pms2.

Seis de los 12 tumores inestables presentaron pérdida de expresión de Msh2, sólo en cuatro se identificó mutación del gen correspondiente. La pérdida de expresión de Msh6 se identificó en 5 tumores, cuatro de ellos se acompañaron también de una ausencia de expresión de Msh2. (Tabla IV.13)

TABLA IV.13 Estudio IHQ de la vía mutadora en CCR <45 a

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	CCR <45a n (%)
VIA MUTADORA IMS	
IHQ (pérdida expresión MMR)	
MLH1	5/81 (6.2)
MSH2	6/81 (7.4)
MSH6	5/81 (6.2)
PMS2	1/81 (1.5)

Estudio genético sangre periférica del sujeto

De las muestras de sangre extraídas de los pacientes en cuyos tumores se identificó IMS, se extrajo en ADN para proceder al estudio completo de los genes MMR. De los 12 casos analizados diez mostraron mutación en alguno de los principales genes implicados en la reparación del ADN.

El número de mutaciones en *MLH1* Y *MSH2* fue el mismo en nuestra muestra, uno de los casos no mostró mutación genética, sino hipermetilación del gen *MLH1* y en el otro no se encontraron alteraciones genéticas a nivel de los genes relacionados, a pesar de la ausencia de expresión de la proteína Msh6. (Tabla IV.14)

TABLA IV.14 Estudio genético de la vía mutadora en CCR <45 a

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	CCR <45a n (%)
VIA MUTADORA IMS	
Estudio genético	
<i>MLH1</i>	4/10 (40)
<i>MSH2</i>	4/10 (40)
<i>MSH6</i>	2/10 (20)

Características Clínico – Patológicas y familiares de la vía mutadora

Se estudiaron las características clínico-patológicas y familiares de los pacientes de la muestra divididas en dos grupos, en función de la estabilidad o inestabilidad de microsatélites.

Se observó que los pacientes cuyos tumores eran inestables presentaban una edad menor al diagnóstico (34.33 años vs 40.4 años) y que este tipo de tumores eran más frecuentes en los hombres (75%) que en las mujeres (25%) en las que predominaban los tumores estables; siendo estas diferencias estadísticamente significativas. (Tabla IV.15).

TABLA IV.15 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Distribución según edad y sexo.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO - PATOLÓGICAS	IMS	EMS	p
PACIENTES	12 (14.8)	69 (85.2)	
EDAD (DE)	34.33 (4.9)	40.4 (4.3)	NS
SEXO			
Hombres	9 (75)	40 (58)	0.008
Mujeres	3 (25)	29 (42)	

IV.RESULTADOS

Los tumores inestables se localizaron en colon derecho e izquierdo con la misma proporción (50%) mientras que ninguno se localizó en el recto; en cuanto a los estables, estos mostraron especial predilección por el colon izquierdo (42%) y el recto (37.7%), siendo el colon derecho la localización menos frecuente para este tipo de tumores (20.3%), considerándose estas diferencias estadísticamente significativas. (Tabla IV.16)

TABLA IV.16 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Distribución según localización en el colon.

CARACTERÍSTICAS	IMS	EMS	p
LOCALIZACIÓN			
Colon derecho	6 (50)	14 (20.3)	0.02
Colon izquierdo	6 (50)	29 (42.0)	
Recto	0	26 (37.7)	

En cuanto a las características histológicas, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos; los tumores inestables fueron más indiferenciados (18.2% vs 12.2%); mostraron una mayor producción de moco (54.9% vs 26.5%) y un número mayor de células en anillo de sello (18.2% vs 4.1%). El número de pólipos asociados fue algo mayor para los tumores inestables (66.7% vs 53.6%), siendo los pólipos mixtos los más frecuentes en los pacientes con tumores inestables (50%) y los adenomatosos en los pacientes con tumores estables (54.1%). (Tabla IV.17)

TABLA IV.17. CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Características histológicas y pólipos asociados.

CARACTERÍSTICAS	IMS	EMS	p
INDIFERENCIADOS	2/11 (18.2)	6/49 (12.2)	NS
MUCOSECRETORES	6/11 (54.9)	13/49 (26.5)	0.07
CÉLULAS ANILLO DE SELLO	2/11 (18.2)	2/49 (4.1)	0.48
PÓLIPOS ASOCIADOS	8 (66.7)	37 (53.6)	0.25
TIPO HISTOLÓGICO			
Adenomatosos	2 (25)	20 (54.1)	
Hiperplásicos	2 (25)	6 (16.2)	
Mixtos	4 (50)	11 (29.7)	

IV.RESULTADOS

Los tumores estables de los pacientes de la muestra se diagnosticaron con mayor frecuencia en estadios tempranos (31.9% A) o avanzados (26.1% D), en cambio los tumores inestables se diagnosticaron en su mayoría en estadios intermedios (75% B y 16.7% C), estos resultados fueron estadísticamente significativos. (Tabla IV.18).

TABLA IV.18 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Distribución según estadio tumoral.

CARACTERÍSTICAS	IMS	EMS	p
ESTADIO TUMORAL (<i>Dukes</i>)			
A	1 (8.3)	22 (31.9)	< 0.001
B	9 (75)	17 (24.6)	
C	2 (16.7)	12 (17.4)	
D	0	18 (26.1)	

La SLE y la ST fueron más favorables para los pacientes que presentan IMS. Cuando se excluyen aquellos casos que presentaban enfermedad a distancia en el momento del diagnóstico y/o recidiva tumoral a lo largo del seguimiento, la SLe y la ST aumenta en el grupo de EMS sin alcanzar los valores del grupo MSI. La tasa de mortalidad también fue mayor en el grupo con EMS.

TABLA IV.19 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Pronóstico

CARACTERÍSTICAS	IMS	EMS	p
TOTAL PACIENTES			
ST	86	54.81	0.003
SLE	80.416	46.37	0.006
PACIENTES CON METÁSTASIS AL DIAGNÓSTICO			
ST	87.55	69.93	
SLE	87.55	70.06	
RECIDIVA TUMORAL	25	17.3	NS
MORTALIDAD	16.66	30.43	NS

IV.RESULTADOS

Como era de esperar, la agregación familiar fue mayor en los tumores con IMS, además en un 83.3% de estos pacientes se cumplían criterios Ámsterdam II, un 33% presentaron neoplasias asociadas al SL y el 11% presentó agregación familiar con neoplasias no relacionadas con el SL. Un 46.4% de los tumores con EMS fueron esporádicos, el 8.7% presentó agregación familiar con criterios Ámsterdam II, un 26.1% presentó agregación familiar y desarrollo neoplasias asociadas al SL y el 18.8 % presentó agregación familiar con neoplasias no relacionadas con el SL. Las diferencias en relación con los antecedentes familiares resultaron estadísticamente significativas. (Tabla IV.20).

TABLA IV.20 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía mutadora. Distribución según historia familiar.

CARACTERÍSTICAS	IMS	EMS	
Hª CÁNCER FAMILIAR			0.0005
Familiar con criterios Ámsterdam II	10 (83.3)	6 (8.7)	
Agregación familiar + neoplasia Lynch	27 (33)	18 (26.1)	
Agregación familiar + neoplasia no Lynch	9 (11)	13 (18.8)	
ESPORÁDICO	31 (38)	32 (46.4)	

B. VIA SERRADA O FENOTIPO METILADOR DE ISLAS CPG

Se realizó el estudio de patrones de metilación en 68 pacientes del total de la muestr, siendo las proporciones como sigue: el 19,1% presentan factor metilador alto (FM-Alto), el 41,17% factor metilador bajo (FM-Bajo) y el 39,7% factor metilador nulo (FM-0). (Tabla IV.21)

IV.RESULTADOS

TABLA IV.21 CCR <45 a. Características de la vía serrada. Clasificación molecular del CCR y en función del grado de metilación.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	CCR <45a n (%)
VIA SERRADA	
CIMP	
FM- 0	27/68 (39.7)
FM- Bajo	28/68 (41.2)
FM- Alto	13/68 (19.1)

Características Clínico – Patológicas y familiares de la vía serrada.

El grupo predominante en la muestra fueron los tumores con un FM-Bajo (41.2%) y los FM-0 (39.7%), siendo el grupo FM-Alto el menos frecuente (19.1%). Los tumores FM-Alto aparecieron a edades más precoces (36.9 años, frente a 39.3 y 40.15 en FM-Bajo y FM-0 respectivamente) y fueron más frecuentes en el sexo femenino (53.8% frente 35.7% y 33% en FM-Bajo y FM-0 respectivamente). (Tabla IV.22)

TABLA IV.22 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía serrada. Distribución según edad y sexo.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO - PATOLÓGICAS	FM Alto	FM Bajo	FM 0	p
PACIENTES	13 (19.1)	28 (41.2)	27 (39.7)	
EDAD (DE)	36.9 (6.4)	39.4 (5)	40.15 (4.5)	0.18
SEXO				
Hombres	6 (46.2)	18 (64.3)	18 (66.7)	
Mujeres	7 (53.8)	10 (35.7)	9 (33.3)	0.43

En cuanto a la localización, los FM-Alto mostraron predilección por el colon derecho (61.5%), mientras que los FM-Bajo se localizaron con mayor frecuencia en el colon izquierdo (50%), en cuanto a los FM-0 su distribución fue similar para el colon izquierdo y el recto (51.9% y 40.7% respectivamente), siendo valores con significación estadística. (Tabla IV.23)

IV.RESULTADOS

TABLA IV.23 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía serrada. Distribución según la localización en el colon.

CARACTERÍSTICAS	FM Alto	FM Bajo	FM 0	p
LOCALIZACIÓN				
Colon derecho	8 (61.5)	6 (21.4)	2 (7.4)	0.007
Colon izquierdo	3 (23.1)	14 (50.0)	14 (51.9)	
Recto	2 (15.4)	8 (28.6)	11 (40.7)	

En las tres categorías del FM, el estadio precoz fue el predominante al diagnóstico (A y B de Dukes), principalmente en el grupo FM-Alto (A 30,8%, B 46,2%, C 15,4% y D 7,7%). (Tabla IV.24).

TABLA IV.24 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía serrada. Distribución según el estadio tumoral.

CARACTERÍSTICAS	FM Alto	FM Bajo	FM 0	p
ESTADIO TUMORAL (<i>Dukes</i>)				
A	4 (30.8)	7 (25.0)	7 (25.9)	NS
B	6 (46.2)	9 (32.1)	10 (37)	
C	2 (15.4)	7 (25.0)	4 (14.8)	
D	1 (7.7)	5 (17.9)	6 (22.2)	

Los tumores FM-Alto fueron los más indiferenciados (22.2% vs a 13.6% y 0% en FM Bajo y 0 respectivamente), este grupo fue también en el que mayor proporción de células productoras de mucina existía (44.4% vs 36.4% y 20.8 % en FM-Bajo y 0 respectivamente). El número de pólipos colónicos asociados fue mayor para los tumores del grupo FM-Alto (76.9%) siendo los pólipos mixtos los predominantes.

IV.RESULTADOS

TABLA IV.25 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía serrada. Características histológicas y pólipos asociados.

CARACTERÍSTICAS	FM Alto	FM Bajo	FM 0	p
INDIFERENCIADOS	2/9 (22.2)	3/22 (13.6)	0	0.27
MUCOSECRETORES	4/9 (44.4)	8/22 (36.4)	5/24 (20.8)	0.3
CÉLULAS ANILLO DE SELLO	0/9 (0)	3/22 (13.6)	0/24 (0)	0.12
PÓLIPOS ASOCIADOS	10 (76.9)	14 (50.0)	14 (52)	0.23
TIPO HISTOLÓGICO				
Adenomatosos	3 (30)	8 (57.1)	8 (57.1)	NS
Hiperplásicos	1 (10)	2 (14.3)	4 (28.6)	NS
Mixtos	6 (60)	4 (28.6)	2 (14.3)	NS

La proporción de tumores que presentó IMS fue mayor para el grupo FM-Alto (30.8% vs 14.3% y 7.4% en FM-Bajo y 0 respectivamente) al igual que el porcentaje de mutaciones en los genes MMR (30.8% vs 7.1% en FM Bajo y 7.4% en CIMP 0) y la hipermetilación del promotor de MLH1. En cuanto a la mutación de BRAF, observamos que ninguno de los tumores FM-Alto y FM-0, presentó BRAF mutado y uno de los tumores FM-Bajo si que presentó esta mutación (3.6%). (Tabla IV.26)

TABLA IV.26 CCR <45 a. Características moleculares de la vía serrada en función del grado de metilación.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	FM Alto	FM Bajo	FM 0	p
MSI	4 (30.8)	4 (14.3)	2 (7.4)	0.15
Expresión Mlh1	2 (15.4)	1 (3.6)	0	0.09
Mutación MMR	4 (30.8)	2 (7.1)	2 (7.4)	0.06
Mutación BRAF	0	1 (3.6)	0	NS

En cuanto a la agregación familiar, esta estuvo presente en los tres grupos, pero fue mayor para los tumores FM-Alto, tanto la asociada a positividad para criterios Ámsterdam II (30.8%) como la agregación y el desarrollo de neoplasias del espectro Lynch (23.1%). Los casos esporádicos fueron minoritarios en todos los grupos (38.5% en FM-Alto, 42.9% en FM-Bajo y 37% en FM-0). (Tabla IV.27)

TABLA IV.27 CCR <45 a. Características clínico-patológicas de la vía serrada. Distribución según historia familiar.

CARACTERÍSTICAS	CIMP High	CIMP Low	CIMP 0	p
Hª CÁNCER FAMILIAR				NS
Familiar con criterios Amsterdam II	4 (30.8)	55(17.9)	5 (14.8)	
Agregación familiar + neoplasia Lynch	3 (23.1)	5 (17.9)	8 (29.6)	
Agregación familiar + neoplasia no Lynch	1 (7.7)	6 (21.4)	4 (14.8)	
ESPORÁDICO	5 (38.5)	12 (42.9)	10 (37)	

C. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CCR

La clasificación molecular del CCR (Ogino y Goel 2008), se establece teniendo en cuenta las dos vías de carcinogénesis descritas hasta ahora; la vía mutadora o IMS y la vía serrada o fenotipo metilador de islas CpG (CIMP), de acuerdo con las características de estas vías de carcinogénesis tendremos cuatro tipos de tumores. Teniendo en cuenta esta clasificación, podemos decir, que el grupo mayoritario de nuestra muestra fue el MSS-CIMP Low, con un total de 49 pacientes (72.1%), y el minoritario el MSI-CIMP High, con un total de 4 pacientes (5.9%). (Tabla IV.28)

TABLA IV.28 Clasificación molecular del CCR <.45 a

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	CCR <45 a n (%)
CLASIFICACIÓN MOLECULAR	
IMS – FM Alto	4/68 (5.9)
IMS – FM Bajo 0	6/68 (8.8)
EMS – FM Alto	9/68 (13.2)
EMS – FM Bajo 0	49 /68 (72.1)

En cuanto a la edad, el grupo más joven fue el IMS-FM Alto, con una media de 29.25 años, y el grupo con edades más altas al diagnóstico el EMS-FM Alto, con una edad media al diagnóstico de 40.3 años; siendo estos resultados estadísticamente significativos. (Tabla IV.29)

IV.RESULTADOS

TABLA IV.29 Clasificación molecular del CCR < 45 a. Distribución por edad y sexo

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO - PATOLÓGICAS	IMS- FM Alto	IMS- FM Bajo 0	EMS- FM Alto	EMS- FM Bajo 0	p
PACIENTES	4 (5.9)	6 (8.8)	9 (13.2)	49 (72.1)	
EDAD (DE)	29.25 (3.3)	37.17 (3.3)	40.3 (1.3)	40.1 (5.4)	<0.001
SEXO					NS
Hombres	2 (50)	5 (83.3)	4 (44.4)	31(63.3)	
Mujeres	2 (50)	1 (16.7)	5 (55.6)	18 (36.7)	

La localización más frecuente para los tumores del grupo IMS-FM Alto, fue el colon derecho (75%), seguido por el grupo EMS-FM Alto (55.6%); en el colon izquierdo fueron predominantes los tumores IMS-FM Bajo (66.7%) y en segundo lugar los EMS-FM Bajo (49%). En el recto los tumores fueron mayoritariamente del grupo EMS-FM Bajo (38.8%), el resto cumplían criterios EMS-FM Alto (22.2%) y ninguno cumplió criterios IMS-FM Alto ni criterios IMS-FM Bajo.

En el grupo IMS, independientemente del FM, los tumores se diagnosticaron en estadios más tempranos, el 25% de los tumores IMS-FM Alto presentaron estadio A, el 75% de los IMS-FM Alto presentaron estadio B y el 100% de los tumores IMS -FM Bajo presentaron estadio B. En las categorías EMS, la distribución fue más homogénea. (Tabla IV.30)

TABLA IV.30 Clasificación molecular del CCR <45 a. Distribución según localización y estadio tumoral

CARACTERÍSTICAS	IMS- FM Alto	IMS- FM Bajo 0	EMS -FM Alto	EMS-FM Bajo 0	p
LOCALIZACIÓN					
Colon derecho	3 (75)	2 (33.3)	5 (55.6)	6 (12.2)	0.004
Colon izquierdo	1 (25)	4 (66.7)	2 (22.2)	24 (49.0)	
Recto	0	0	2 (22.2)	19 (38.8)	
ESTADIO TUMORAL (<i>Dukes</i>)					
A	1 (25)	0	3 (33.3)	14 (28.6)	0.011
B	3 (75)	6 (100)	3 (33.3)	13 (26.5)	
C	0	0	2 (22.2)	11 (22.4)	
D	0	0	1 (11.1)	11 (22.4)	

IV.RESULTADOS

Los tumores EMS fueron más indiferenciados (33.3% y 7.5% EMS-FM Alto y EMS-FM Bajo respectivamente), la producción de moco fue mayor en los IMS-FM Bajo (66.7%) y en los EMS-FM Alto (50%). El 16.7% de los tumores IMS-FM Bajo y el 5% de los EMS-FM Bajo presentaron células en anillo de sello. (Tabla IV.31).

Hubo una importante asociación entre los tumores IMS-FM Alto y la existencia de pólipos en otras localizaciones (100%) y estos fueron un 50% adenomatosos y otro 50% mixtos; la distribución de pólipos en colon en tumores del resto de grupos fue similar. (Tabla IV.31)

TABLA IV.31 Clasificación molecular del CCR < 45 a. Características histológicas.

CARACTERÍSTICAS	IMS- FM Alto	IMS- FM Bajo 0	EMS -FM Alto	EMS-FM Bajo 0	p
INDIFERENCIADOS	0	0	2/6 (33.3)	3/40 (7.5)	0.13
PRODUCTORES DE MOCO	1/3 (33.3)	4/6 (66.7)	3/6 (50)	9/40 (22.5)	0.08
CÉLULAS EN ANILLO DE SELLO	0	1/6 (16.7)	0	2/40 (5)	NS
PÓLIPOS ASOCIADOS	4 (100)	4 (66.7)	6 (66.7)	24 (49.0)	NS
TIPO HISTOLÓGICO					
Adenomatosos	2 (50)	0	1 (16.7)	16 (66.7)	0.018
Hiperplásicos	0	2 (50)	1 (16.7)	4 (16.7)	
Mixtos	2 (50)	2 (50)	4 (66.7)	4 (16.7)	

El 50% de los tumores del grupo IMS-FM Alto tuvieron lesiones sincrónicas o metacrónicas en colon y también un 50% neoplasia primaria múltiple. La proporción de mutaciones en los genes MMR y la pérdida de expresión Mlh1 fue mayor para el grupo IMS-FM Alto como era de esperar. (Tabla IV.32)

En los casos inestables, se evidenció una destacable agregación familiar, con un 100% de casos que cumplían criterios de Ámsterdam II y presentaban agregación familiar para neoplasias relacionadas con el SL, sin ningún caso de CCR esporádico ($p < 0,001$) en comparación con los grupos con EMS donde la agregación familiar no era tan manifiesta. (Tabla IV.33)

IV.RESULTADOS

TABLA IV.32 Clasificación molecular del CCR < 45 a. Mutaciones en los genes MMR y pérdida de expresión de Mlh1

CARACTERÍSTICAS	IMS- FM Alto	IMS- FM Bajo 0	EMS – FM Alto	EMS -FM Bajo 0	p
Expresión Mlh1	2 (50)	1 (16.7)	0	0	0.0015
Mutación MMR	4 (100)	3 (50)	0	0	<0.001
Mutación BRAF	0	0	0	1(2.1)	NS

TABLA IV.33 Clasificación molecular del CCR < 45 a. Historia familiar.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	IMS - FM Alto	IMS- FM Bajo 0	EMS– FM Alto	EMS-FM Bajo 0	p
CCR Sincrónico o Metacrónico	2 (50)	0	1 (11.1)	5 (10.2)	NS
Neoplasia primaria múltiple	2 (50)	0	2 (22.2)	8 (16.3)	NS
Hª CÁNCER FAMILIAR					<0.001
Familiar con criterios Ámsterdam II	4 (100)	5(83.3)	0	5 (10.2)	
Agregación familiar + neoplasia Lynch	0	1 (16.7)	3 (33.3)	12 (24.5)	
Agregación familiar + neoplasia no Lynch	0	0	1 (11.1)	10 (20.4)	
ESPORÁDICO	0	0	5 (55.6)	22 (44.9)	

D. VIA SUPRESORA O INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

Se realizó el análisis de la INC en 59 pacientes del total, mediante la técnica de CGH-array (*Comparative Genomic Hybridization*), siendo excluidos los 6 individuos con criterios de PAF, junto con los 22 en los que la cantidad de muestra resultó insuficiente.

Para determinar el grado cuantitativo de inestabilidad, se calculó el índice de inestabilidad genómica (GII). El GII fue similar para las ganancias y las pérdidas y la media del número de copias alteradas (CNA) fue de 95.8, siendo mayores las pérdidas totales que las ganancias. (Tabla IV.34)

IV.RESULTADOS

TABLA IV.34 CCR < 45 a. Características moleculares de la vía supresora.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	CCR <45 a
VIA SUPRESORA	
GII	
GII ganancias	0.15106 (0.14927)
GII pérdidas	0.16546 (0.18246)
GII normal	0.68347 (0.28335)
CNA	95.80 (72.50)
GANANCIAS TOTALES	45.60 (26.00)
PÉRDIDAS TOTALES	50.20 (44.00)

GII: Genomic instability index, CNA: Copy number alterations

A continuación, se realizó un estudio cualitativo de las áreas cromosómicas recurrentemente alteradas, observándose que las alteraciones recurrentes más frecuentes en nuestra muestra fueron las siguientes: (ANEXO 3A)

- Pérdidas: 1p36 (61%); 14q11 (61%); 5q13.2 (57%); 9q13q21(57%); 1p12-q21 (53%); 11p11-q12 (50%).
- Ganancias: 19q13-p12 (57%); 19q13-q13 (52%); 17q24-q25 (50%).

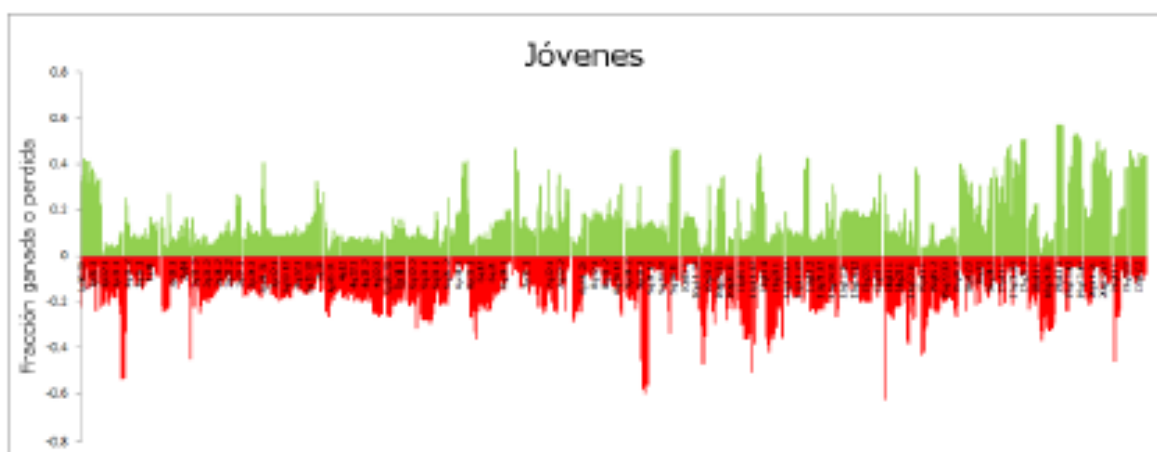


Fig IV. 1. Gráfico de frecuencias de los perfiles de inestabilidad observados y bandas cromosómicas donde se localizan dichas alteraciones. Verde = Ganancia / Rojo = Pérdida

3. ANÁLISIS COMPARATIVO VÍAS DE CARCINOGENÉISIS Y LOCALIZACIÓN.

En nuestro estudio la IMS estuvo presente en el 30% de los tumores localizados en el lado derecho, en el 17% de los localizados en el colon izquierdo y en ninguno de los tumores de recto (0%). (Tabla IV.35)

Un total de 10 casos presentaron una mutación germinal en los genes de las proteínas reparadoras MMR; 2 en *MLH1* y 4 en *MSH2* en el caso del colon derecho y 2 en *MLH1* y 2 *MSH6* en el colon izquierdo. En uno de los tumores localizado en colon izquierdo, la pérdida de expresión de Mlh1 se debía a la hipermetilación del promotor de Mlh1. Estos resultados fueron estadísticamente significativos. (Tabla IV.35)

Los tumores localizados en el colon derecho mostraron un importante componente de Fenotipo Metilador (FM); este fue alto en el 50% de los casos (FM Alto) y bajo en el 37.5% de los casos (FM Bajo). Los tumores de colon izquierdo y recto mostraron solamente un 10% de fenotipo metilador alto (FM Alto), siendo estos resultados estadísticamente significativos. (Tabla IV.35)

En cuanto a la clasificación molecular del CCR, los tumores de colon derecho mostraron una distribución uniforme para todas las categorías (19% IMS-FM Alto, 12.5% IMS-FM Bajo, 31% EMS-FM Alto y 37.5% EMS-FM), los tumores de colon izquierdo y recto fueron mayoritariamente estables y con fenotipo metilador bajo (77.5% y 90.5% respectivamente). (Tabla IV.35)

El índice de inestabilidad genómica (GII) más alto fue para los tumores localizados en el lado izquierdo, las diferencias en este grupo fueron sobretodo a expensas de pérdidas. El número de copias alteradas también fue mayor para esta localización, siendo el más bajo para los tumores rectales. En cuanto al grupo de los tumores rectales, este fue el que presentó el mayor número de cromosomas completos alterados. (Tabla IV.35)

El estudio cualitativo de las regiones cromosómicas recurrentemente alteradas (CNV) identificó las regiones recurrentes alteradas en función de la localización tumoral. (ANEXO 3B). Las más frecuentes fueron:

- Colon derecho
Pérdidas: 1q12-q21.1 (69%); 5q13.2-q13.2 (69%); 9p13.1-p13.1 (69%);
9p12-p11.2 (85%); 9q13-q21.11 (69%); 10q11.22-q11.22 (77%);
16p13.12-p12.3 (69%)
Ganancias: 7q22.1-q22.1 (69%); 19p13.3-q13.42 (69%); 21q22.3-122.3
(69%).
- Colon izquierdo
Pérdidas: 1q21.1-q21.1 (61%); 5q13.2-q13.2 (64%); 11p11.12-p11.12
(61%)
Ganancias: 16q21-q22.1 (54%); 20q11.21-q11.22 (57%)
- Recto
Pérdidas: 14q11.1-q11.2 (53%)
Ganancias: 17q21.31-q21.32 (53%); 19p13.3-q13.43 (58%); 22q11.1-
q11.1 (53%).

IV.RESULTADOS

TABLA IV. 35 características moleculares de las diferentes vías de carcinogénesis en el CCR <45 a según su localización en el colon.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	CCR <45a n (%)	CCR derecho <45 ^a n (%)	CCR izquierdo <45a n (%)	CCR recto <45a n (%)	P (X ²)
VIA MUTADORA					
IMS	12/81 (14.8)	6/20 (30)	6/35 (17)	0/26 (0)	0.016
EMS	69/81 (85.2)	14/20 (70)	29/35 (83)	26/26 (100)	
IHQ (pérdida expresión MMR)	10/81 (12.2)	6/20 (30)	4/35 (1.4)	0/26	0.009
VIA SERRADA					
CIMP					0.005
FM- 0	27/68 (39.7)	2 /16 (12.5)	14/31 (45)	11/21 (52)	
FM- Bajo	28/68 (41.2)	6/16 (37.5)	14/31 (45)	8/21 (38)	
FM- Alto	13/68 (19.1)	8/16 (50)	3/31 (10)	2/21 (10)	
Clasificación MOLECULAR					0.007
IMS – FM Alto	4/68 (5.9)	3/16 (19)	1/31 (3)	0/21 (0)	
IMS – FM Bajo 0	6/68 (8.8)	2/16 (12.5)	4/31 (13)	0/21 (0)	
EMS – FM Alto	9/68 (13.2)	5/16 (31)	2/31 (6.5)	2/21 (9.5)	
EMS – FM Bajo 0	49/68 (7.1)	6/16 (37.5)	24/31 (77.5)	19/21 (90.5)	
VIA SUPRESORA					
GII					
GII ganancias	0.15106	0.048321	0.124064	0.115086	NS
GII pérdidas	0.16546	0.020220	0.227445	0.018711	0.009
GII normal	0.68347	0.870251	0.692384	0.830362	0.05
CNA	95.80 (72.50)	91.5 (45)	121 (128)	61.6 (77)	0.14
GANANCIAS TOTALES (DS)	45.60 (26.00)	43 (22)	55 (67)	34 (47)	NS
PÉRDIDAS TOTALES (DS)	50.20 (44.00)	48.5 (22)	66 (63)	28 (32)	0.03
CR Completos Alterados (DS)		1.5 (2)	3 (3)	3.5 (4)	0.14

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1. EL CANCER COLORRECTAL EN EL ADULTO JOVEN

A nivel mundial el CCR constituye la tercera neoplasia más frecuente tras el cáncer de pulmón y mama y la segunda causa de muerte después del cáncer de pulmón; en 2018 se registraron 1,9 millones de casos nuevos de CCR y fallecieron por el mismo alrededor de 900 mil personas. El riesgo de padecer CCR es mayor en países desarrollados, lo que hace pensar en una importante repercusión del estilo de vida occidental en el desarrollo del CCR. (Ferlay *et al.* 2018; Freddie B *et al.* 2018 - GLOBOCAN).

El riesgo acumulado de CCR en la población general es de 2-6% y este riesgo se ve incrementado con la edad. La mayor parte de los CCR ocurren en edades comprendidas entre los 60 y 70 años, el CCR en adultos joven posee una incidencia anual entre el 2-8% y representa un 10% del total de las neoplasias colorrectales, estos datos han aumentado en los últimos años. (Boley y Ferlay 2005, Siegel RL *et al.* 2009, Stigliano *et al.* 2014). Algunos estudios asocian este incremento en la incidencia a una universalización en los test de screening (Young *et al.* 2015).

El CCR de aparición precoz presenta características clínico-patológicas, familiares y moleculares muy variables, por lo que se divide en diferentes subgrupos atendiendo a las mismas (Perea J *et al.* 2011). Este tipo de tumores son muy diferentes entre sí, y muestra además características muy diferenciadas con respecto a los tumores desarrollados en pacientes de mayor edad (Osorio *et al.* 2014, Kirzin *et al.* 2014).

En general los tumores desarrollados en edades tempranas son tumores frecuentemente avanzados e incluso metastásicos en el momento del diagnóstico,

indiferenciados, productores de mucina, con mayor porcentaje de células en anillo de sello, mayor número de tumores sincrónicos y metacrónicos y desarrollo de pólipos durante el seguimiento (Osorio *et al.* 2014). En cuanto a la localización de estos tumores, no existe una opinión uniforme en la literatura; unas series apuntan a una mayor predilección por el colon izquierdo, mientras que otras señalan el colon derecho como localización más frecuente; probablemente por su posible vinculación con el SL (Issa JP *et al.* 2004, Goel *et al.* 2010, Wang *et al.* 2015)

Generalmente este tipo de tumores desarrollados a edades tempranas poseen un componente hereditario asociado, pero se ha demostrado que entre un 19.7% y un 41% de los pacientes jóvenes poseen estabilidad de microsatélites (Perea *et al.* 2014) y que solamente un 25% de los pacientes con CCR en edad joven poseen SL asociado (Kirzin *et al.* 2014).

Desde el punto de vista molecular el CCR de aparición precoz puede subdividirse en tumores con IMS, que se relacionan con el SL y por otro lado tumores EMS. Algunos autores han sugerido diferencias en los mecanismos moleculares que subyacen tras la edad de inicio de la enfermedad, pues se ha visto que los factores desencadenantes de la inestabilidad genómica son diferentes en función de esta. Así, pese a que la IMS en población joven suele deberse a mutaciones en alguno de los genes que componen el sistema MMR, en población anciana suele estar relacionada con fenómenos epigenéticos (Perea *et al.* 2011).

Los tumores EMS en adultos jóvenes, muestran predominio de la localización izquierda y el recto, mayor presencia de mucina o células en “anillo de sello”, menores tasas de mutación en *BRAF* y frecuencias de alteraciones epigenéticas mucho más bajas (Kirzin *et al.* 2014).

En cuanto a los tumores con EMS con INC, estos se caracterizan por edades de diagnóstico ligeramente superiores, mayor predisposición por su localización en colon

izquierdo y un menor porcentaje de tumores sincrónicos y/o metacrónicos con un mayor porcentaje de diagnóstico en fases avanzadas. Por el contrario; los tumores EMS que no presentan INC, parece asociarse con peor pronóstico, fenotipo invasivo, metástasis temprana y mayor agregación familiar, y podría estar en relación, con nuevos síndromes de CCR hereditarios (como el síndrome de CCR familiar tipo X), y con otras alteraciones moleculares como la mutación del gen KRAS, fenotipo metilador y la mutación en BRAF (Hawkins NJ *et al.* 2001, Chan TL *et al.* 2001, Banerjea A *et al.* 2009).

Además, se han observado diferencias respecto a los genotipos tumorales predominantes en cada población, y mientras los tumores IMS-INC- (MACS) prevalecen entre las personas jóvenes, los tumores IMS-INC+ lo hacen entre las ancianas (Boardman *et al.* 2007).

Tomando como premisa estas diferencias, parece razonable pensar que los tumores de inicio temprano y tardío puedan tener diferentes bases moleculares, que quizá también impliquen vías de carcinogénesis todavía no caracterizadas (Perea *et al.* 2010).

2. CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS Y FAMILIARES

2.1 MUESTRA TOTAL

La edad media de nuestra muestra al diagnóstico del CCR fue de 39.56 años con un rango de edades que iban entre los 27 como edad más precoz y los 45 como edad más tardía de diagnóstico. En cuanto a la distribución por sexo se observó un predominio de hombres (59.8%) sobre mujeres (40.2%), coincidiendo con algunos de los trabajos publicados previamente en la literatura (Frostberg *et al.* 2020, Hanna *et al.* 2020, Losi *et al.* 2005, Strum *et al.* 2019, Yeo *et al.* 2017), aunque difiere de otros que destacan la mayor proporción en el sexo femenino (Kirzin *et al.* 2014, Suzuki *et al.* 2017).

La localización tumoral constituye uno de los factores más importantes en la morfología del CCR, ya que se han observado diferencias epidemiológicas, clínico-patológicas y familiares en función de la localización del tumor en el colon (Benedix *et al.* 2010, Snaebjornsson *et al.* 2010, Yamauchi *et al.* 2012), siendo además uno de los objetivos principales de este trabajo.

En nuestra muestra existe predilección por la localización tumoral en el colon izquierdo y el recto, 42.7 % y 32.9% respectivamente, localizándose solo el 24.4% en el colon derecho. En la literatura se observa bastante variabilidad en lo que se refiere a la localización de este tipo de tumores en la población joven. Existen series que muestran predilección por el lado izquierdo como la serie de Giraldez *et al.* (2012) que muestra un predominio por el colon izquierdo y recto (81%), la serie de Chang *et al.* (2012) con el 44% de los casos en sigma y el 36% en recto, la de Suzuki *et al.* (2017) con un 29.4% en colon derecho y un 70.6% en colon izquierdo, la de Strum *et al.* (2019) con un 78% de los tumores en colon izquierdo y el 22% en colon derecho, y una de las más recientemente publicadas, la de Frostberg *et al.* (2020) con un 45% de tumores en colo izquierdo. En otras series como la de Mahdavinia *et al.* (2005) se observó que los pacientes con antecedentes familiares de CCR desarrollaban más frecuentemente tumores localizados en colon derecho (42%) mientras que los pacientes con tumores esporádicos mostraron predilección por una localización izquierda (77%), siendo por tanto necesario destacar que cuanto mayor componente familiar tengan los casos, y más concretamente de SL, más proporción de casos habrá localizados a nivel del colon derecho.

El adenocarcinoma constituyó el tipo de tumor más frecuente en nuestra serie, coincidiendo con lo descrito en la literatura (Schneider *et al.* 2014). Generalmente se asocia bajo grado de diferenciación con tumores desarrollados en edades tempranas; sin embargo en nuestra muestra solo el 13.3% de los tumores eran pobremente diferenciados, siendo mayor el porcentaje de tumores más diferenciados, este hecho se repite en series descritas en la literatura como la de Yeo *et al.* (2017) con un 18.8% de tumores indiferenciados, la de Suzuki *et al.* (2017) con un 10.1% de tumores indiferenciados o la

de Liang *et al.* (2015) con un 26.7%. Estos datos destacan con la mayoría de la literatura publicada, ya que generalmente se describe como característica del CCR de aparición precoz un mayor porcentaje de tumores con bajo grado de diferenciación; esto se observó en la serie de Chang *et al.* (2012) con un 73% de tumores que presentaban bajo grado de diferenciación.

El 32% de los tumores de nuestra muestra fueron adenocarcinomas mucinosos y el 7% presentaban células en anillo de sello. En otras series publicadas en la literatura como la de Suzuki *et al.* (2017), el porcentaje de tumores mucinosos fue del 5.9% y en la serie de Yeo *et al.* (2017), un 8.9% de los tumores eran adenocarcinomas mucinosos y un 19% presentaban células en anillo de sello. En los CCR de pacientes jóvenes existe un predominio de tumores mucinosos y un mayor porcentaje de células en anillo de sello, características que son típicas además en tumores hereditarios. La presencia de mucina suele ser un factor de mal pronóstico, pero este hecho no está claro en la literatura ya que en algunas series como la de Gao *et al.* (2013) y la de Mekenkamp *et al.* (2012) se considera un factor de mal pronóstico, en otras como la de Langner *et al.* (2012) esto no queda claro.

En nuestra serie, la presencia de mucina se asoció con valores pronósticos desfavorables. Además, la diferenciación mucinosa confiere al tumor distintas características en función de la localización de este; en el recto se consideraría un marcador de mal pronóstico y en el colon proximal todo lo contrario (Schneider *et al.* 2014), este hecho podría relacionarse a una vinculación con un síndrome familiar, generalmente SL, en aquellos tumores mucinosos desarrollados en colon proximal (Banerjea *et al.* 2009).

La estadificación tumoral es fundamental para establecer el pronóstico y el riesgo de recidiva de la enfermedad, así como la planificación terapéutica y una adecuada revaloración post tratamiento que nos ayude a determinar la efectividad de este. En nuestro estudio la distribución de la muestra por estadios fue bastante homogénea; con un ligero predominio de los estadios iniciales, el 28% de los tumores no rebasaba la

muscular propia (estadio A), el 31.7% rebasaban la muscular propia e incluso infiltraban la serosa o la grasa pericólica (estadio B), el 17.1% presentaba metástasis ganglionares (estadio C) y el 23.2% metástasis a distancia (estadio D). En la literatura se observa un claro predominio de estadios avanzados III y IV, con porcentajes alrededor del 60%; 58% para Frostberg *et al.* (2020), 63.3% para Yeo *et al.* (2017), 63.3% para la serie de Strum *et al.* (2019), y 66.4% para la serie de Suzuki *et al.* (2017).

Este hallazgo puede ser un claro reflejo de la ausencia de programas de screening poblacional para el CCR por debajo de los 50 años, durante los años en los que se han recogido las muestras de los estudios. En el caso de pacientes con antecedentes familiares o personales de CCR, en los que sí se realizan test de screening, es más fácil que el tumor se diagnostique en estadio precoz; en el caso contrario, la falta de sospecha clínica podría enlentecer el diagnóstico. Por este motivo es muy importante tener en cuenta cualquier signo de alarma en este colectivo poblacional para realizar el diagnóstico en un estadio precoz y mejorar el pronóstico de la enfermedad. Por otra parte, debemos tener en cuenta que el CCR desarrollado en edades tempranas, tiene unas características histológicas y genéticas que le confieren una gran agresividad, lo que podría contribuir a un desarrollo acelerado.

En cuanto a nuestros resultados, hay que destacar que el programa de cribado poblacional del CCR en la comunidad de Madrid (PREVECOLON) se instauró definitivamente en el 2017, pero previamente ya se venía realizando en algunos centros, por lo que puede que éste sea el motivo por el que en nuestra muestra el diagnóstico no haya sido tan tardío como muestra la literatura.

Más de la mitad de los pacientes de nuestra serie (56%) presentaron pólipos colónicos a lo largo del seguimiento, siendo el número medio de estos 1.8 por paciente. La histología predominante fueron los adenomas (47.8%), en segundo lugar, los mixtos (34.8%) y en tercer lugar los hiperplásicos (17.4%). Hay pocas series en la literatura en las que se describa la aparición de pólipos durante el seguimiento. En el caso de la serie de Chang *et al.* (2012) se observó que el 35% de los pacientes desarrolló pólipos durante

el seguimiento, y en la serie de Liang *et al.* (2015) el 30.1% siendo en su mayoría adenomas. Es importante tener en cuenta estos datos, ya que el seguimiento en estos pacientes no debe limitarse a los 5 años de seguimiento estándar en todo paciente con un CCR, debemos de tener en cuenta que aquellos pacientes que pueden desarrollar pólipos durante el seguimiento; independientemente de que sean o no casos de síndrome de CCR hereditarios ya que en algún momento alguno de ellos puede malignizar. (Perea J. *et al* 2019)

Un total de 5 pacientes de nuestra muestra (6%) desarrollo un tumor sincrónico o metacrónico colónico, de ellos 4 aparecieron de forma sincrónica al tumor principal (4.8%) y 1 (1.2%) de forma metacrónica. La mayoría de ellos correspondió a casos con SL. En total 11 pacientes (13.4%) presentaron una neoplasia primaria a lo largo de la evolución. Teniendo en cuenta la literatura sabemos que el porcentaje de tumores sincrónicos y/o metacrónicos oscila entre el 5 y el 10%. En la serie publicada por Liang *et al.* (2003) se observó que el 9.8% de los pacientes presentaba un tumor sincrónico / metacrónico. En la serie publicada por nuestro grupo en 2010 (Perea *et al.*) el porcentaje fue menor, el 7% de los pacientes menores de 45 años desarrollaba un tumor sincrónico o metacrónico, independientemente de la estabilidad de microsatélites. En el caso de series más recientes este porcentaje se repite; en el caso de la serie de Suzuki *et al.* (2017) este porcentaje fue del 5.9% y en el caso de la serie de Frostberg *et al.* (2020) este porcentaje fue del 5.3%.

En cuanto al pronóstico de la enfermedad; la supervivencia total de nuestra muestra fue del 58.51 y la supervivencia libre de enfermedad de 50.79 meses. Excluyendo los tumores con estadio avanzado al diagnóstico, la ST aumentó hasta el 71.54 % y la SLE hasta 66.7 meses, entre estos sólo en 10 pacientes hubo recidiva tumoral (15.2%); siendo locorregional en el 30% de los pacientes y a distancia en el 70%. La mortalidad de nuestra serie fue del 31.7%.

Si comparamos estos resultados con lo publicado en la literatura encontramos series en las que los pacientes presentan malos resultados, como la de Lin JT *et al.* (2005)

y la de Fonseca LM *et al.* (2012) y series como la de O'Connell JB *et al.* (2004) en las que el pronóstico es similar o incluso mejor. Estas diferencias pueden deberse a la inclusión dentro de la muestra de pacientes jóvenes con tumores hereditarios; especialmente con SL, que tienen mejor pronóstico que los casos esporádicos (Popat S *et al.* 2005, Benerjea *et al.* 2009). En la serie de Chang *et al.* (2012) se observó una supervivencia a los cinco años en el grupo de jóvenes del 94% similar a la del grupo de pacientes añosos, aunque la recurrencia y el desarrollo de metástasis fue mayor para el grupo de jóvenes. En la serie de Yeo *et al.* (2013) la supervivencia a los cinco años fue similar para los pacientes jóvenes y los añosos (59.4% y 61.1% respectivamente), mientras que la tasa de metástasis locorregional y a distancia fue mayor para el grupo de los jóvenes (65,7% y 31,5% respectivamente). En la serie de Liang *et al.* (2015) la supervivencia a los cinco años fue del 66.8%, similar a la serie anterior.

A modo de conclusión, en estos pacientes que desarrollan tumores colónicos a edades tempranas, es importante que no sólo se vigile en ellos una posible recidiva, debemos tener en cuenta además que son pacientes con una alta probabilidad de desarrollar pólipos a lo largo de su vida que a su vez podrían malignizar, así como tumores sincrónicos y metacrónicos e incluso lesiones malignas en otras localizaciones. Por este motivo es importante realizar un seguimiento exhaustivo y de por vida en estos pacientes, estandarizado en el colon e individualizado en el resto de los órganos que pudieran estar implicados, independientemente o no de que se relacione esta patología con un síndrome hereditario.

Como hemos mencionado antes en la introducción el CCR representa una de las patologías tumorales con mayor número de casos familiares, hasta un 30% de los tumores son atribuibles a causas heredadas (Binefa *et al.* 2014). Dentro de este 30% distinguiremos entre CCR hereditario y el CCR familiar. El CCR hereditario constituye alrededor de un 5% de los tumores heredados y es aquel en el que se identifica un claro modelo de transmisión, generalmente una alteración genética en una línea germinal. Dentro de este tipo de CCR se incluye el SL (2-5%) y la PAF entre otros. Por otro lado, el CCR familiar constituye el 20-30% restante, es aquel en el que se observa una

agregación de casos familiares, pero no se asocia a un claro patrón hereditario, dentro de este grupo se encontraría el síndrome familiar tipo X (Shiovitz *et al.* 2014).

Del total de los 82 casos estudiados de nuestra muestra (una vez excluidas las familias que presentaban PAF); un total de 31 pacientes (38%) no presentaban antecedentes familiares de CCR ni neoplasias relacionadas con el SL; considerando a estos tumores como esporádicos. El resto de los individuos, un total de 51, cumplían criterios de CCR familiar, 15 pacientes (18%) presentaban criterios Ámsterdam positivos y 36 presentaban agregación familiar; entre los cuales un 33% de las familias habían desarrollado neoplasias del espectro SL y un 11% habían desarrollado neoplasias diferentes.

En cuanto a los datos publicados en la literatura, observamos que el porcentaje de casos con antecedentes familiares relacionados con el SL varía en función de la edad de corte en que se realiza el diagnóstico de CCR a edad temprana. En la serie de Jaspersen *et al.* (2010), en la que los individuos estudiados tenían menos de 35 años, el 18% de los casos cumplían criterios Ámsterdam y el 28% criterios Bethesda. En la serie de Steinhagen *et al.* (2012), en la que se analizó el CCR de pacientes menores de 50 años, el 4.5% presentó criterios Ámsterdam positivos y un 30.8% presentaron agregación familiar para CCR. En la serie de Strum *et al.* (2019) el 13.8% de los pacientes presentó agregación familiar, en este grupo el límite de edad fue 50 años. En la serie de Frostberg *et al.* (2020), la edad de corte para el estudio fue 40 años y el porcentaje de pacientes con antecedentes familiares de CCR fue del 25%. Teniendo en cuenta estos resultados podemos concluir que cuanto menor es la edad de corte de la muestra mayor será el porcentaje de casos con IMS y por tanto con SL y por el contrario cuanto mayor es la edad de corte, mayor número de casos con EMS.

Algunos autores han sugerido la combinación de la edad precoz con otras características clinicopatológicas y/o familiares, como una herramienta efectiva en la identificación de pacientes con SL (Perea *et al.* 2011). En este trabajo Perea *et al.* (2011), analiza la presencia de antecedentes familiares neoplásicos en el grupo del adulto joven

con CCR con un grupo control de edad avanzada, observándose un predominio de casos con antecedentes o agregación familiar en el grupo de adulto joven (61% vs 24,7%). Del grupo de adultos jóvenes el 20% cumplía criterios Ámsterdam para el SL y sólo un caso lo cumplía en el grupo de CCR de edad avanzada.

Como se verá más adelante, no en todos los pacientes jóvenes Ámsterdam II positivos de nuestra serie se identificó una causa genética responsable de la enfermedad (ver Apartados 1.4 y 2.3 de los Resultados), hecho que sugiere la existencia de un posible componente genético que podría estar en relación con nuevos síndromes hereditarios. Estos casos son habitualmente designados como CCR familiar tipo X (Goel *et al.* 2010, Stigliano *et al.* 2014) y se cree que podrían constituir el resultado del efecto sinérgico de varios genes de baja penetrancia que considerados de forma conjunta son capaces de conferir un riesgo aumentado de padecer esta neoplasia.

2.2 ANÁLISIS COMPARATIVO TENIENDO EN CUENTA LA LOCALIZACIÓN TUMORAL.

En la medicina actual, el CCR no se considera una entidad única y aislada (Iacopetta B. 2002); en los últimos años se han producido importantes investigaciones científicas en la genética molecular del CCR y las diferentes vías de carcinogénesis con el objetivo de mejorar la efectividad terapéutica de este tipo de tumor.

En 1990 Bufill *et al.* comienzan a describir el CCR en función de su localización anatómica, este fue un intento de subclasificar el CCR, ya que los datos clínicos mostraban diferencias epidemiológicas, patogénicas, genéticas, epidemiológicas y moleculares en función de la localización anatómica.

En la práctica clínica actual, es de todos conocido que la localización tumoral en el colon dirige el manejo terapéutico, tanto el tipo de técnica quirúrgica como el tratamiento quimioterápico.

Las diferencias entre el cáncer de colon derecho, izquierdo y de recto, son consecuencia de diferencias entre el colon derecho, izquierdo y recto; relacionadas con el distinto origen embriológico, las distintas propiedades fisiológicas, biológicas y genéticas (Iacopetta B. 2002; Li FY *et al.* 2009; Shen Rl *et al.* 2017). Estas diferencias podrían contribuir a que las vías de carcinogénesis que dan lugar a los tumores colorrectales sean diferentes en función de la localización anatómica en el colon.

En la literatura existen varias publicaciones que comparan las características clínico-patológicas, familiares y moleculares del CCR en función de la edad de diagnóstica (Osorio *et al.* 2014) y en función de la localización en el colon (Iacopetta B. 2002; Li FY *et al.* 2009; Shen Rl *et al.* 2017); pero existe poca bibliografía en la que se estudien las características diferenciales del CCR en el adulto joven teniendo en cuenta su localización. En nuestro estudio y una vez descritas y comparadas con la literatura las características clínico-patológicas y familiares del CCR en menores de 45 años, estudiaremos y compararemos con la literatura estas mismas características teniendo en cuenta la localización de los tumores en el colon.

En nuestra muestra el 24.45% de los tumores se localizaron en el colon derecho, el 42.7% en el colon izquierdo y el 32.9% en el recto. Históricamente la incidencia de los tumores localizados en el colon izquierdo era mayor que los del lado derecho; pero los últimos informes de la *American Cancer Society* confirman una mayor proporción global de tumores en colon derecho (41%) frente al colon izquierdo (22%) entre 2009 y 2013, independientemente de la edad al diagnóstico (Siegel RL *et al.* 2017)

La literatura nos dice que por lo general los tumores localizados en el colon derecho suelen diagnosticarse a edades más tempranas y su distribución por sexos es más

homogénea, mientras los tumores localizados en el colon izquierdo y en el recto se diagnostican a edades mayores y predominan en el sexo masculino. (Snaebjornsson *et al.* 2010)

La edad media de diagnóstico en nuestra muestra entre los CCR de las diferentes localizaciones fue similar, alrededor de los 40 años; no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre grupos. En cuanto al sexo, en el caso del colon derecho la proporción estaba igualada entre varones y mujeres y en el caso del colon izquierdo y el recto se observó un predominio de varones frente a mujeres (60% varones vs 40% mujeres) pero estas diferencias no fueron significativas.

Si tenemos en cuenta la literatura nos encontramos trabajos como la revisión sistemática de Iacopetta B. (2002), en la que describe un predominio del CCR derecho en mujeres e izquierdo en varones; así como un mayor porcentaje de CCR izquierdo en jóvenes y derecho en pacientes más mayores. Nawa *et al.* (2006), observa también, un porcentaje mayor de CCR derecho en pacientes añosos y al realizar una estratificación por edad describe que la proporción de CCR derecho es mayor en menores de 40 años (33%) y en mayores de 80 años (43%). Snaebjornsson *et al.* (2010), coincide también con lo anterior, describiendo que a medida que aumenta la edad en las mujeres, aumentan los casos de CCR derecho, en cambio en los hombres la mayor parte de los CCR derechos se producen a edades tempranas. Por tanto, nuestros resultados en una población menor de 45 años coinciden con lo publicado en la literatura, sin criterio de edad al diagnóstico, la mayor parte de los CCR se localizan en el colon izquierdo y el recto y existe un predominio del sexo masculino (59.8%).

Desde el punto de vista histopatológico los tumores de colon derecho y los que se desarrollan en adultos jóvenes presentan características semejantes: presentan bajo grado de diferenciación, alto porcentaje de células en anillo de sello, y elevado componente mucinoso. (Nawa T *et al.* 2008; Snaebjornsson P *et al.* 2010). Los carcinomas mucinosos disminuyen su frecuencia alrededor de un 2.5% desde el colon proximal al distal (Iacopetta B. *et al.* 2002).

En nuestra serie los tumores localizados en colon derecho fueron los más indiferenciados (25%) y también aquellos con mayor componente mucinoso (37.5%), aunque la diferencia con respecto al porcentaje de componente mucinoso en colon izquierdo era muy pequeña (33%). En cambio, fueron los tumores localizados en colon izquierdo y recto los que mayor porcentaje de células en anillo de sello presentaron, 8% y 10% respectivamente; no siendo ninguno de estos resultados estadísticamente significativo.

Estos resultados difieren a lo esperado según la literatura descrita, ya que al tratarse de una serie de CCR en adultos jóvenes se podría esperar un porcentaje mayor de tumores con componente mucinoso y células en anillo de sello; características comunes en los síndromes hereditarios como el SL (Ghazi S. *et al.* 2012). Esto podría no ser así, por el alto porcentaje de tumores EMS de la muestra.

El 80% de los tumores de nuestra serie localizados en colon derecho, presentaron estadios precoces A y B de Dukes; mientras que los tumores más avanzados, estadios C y D, estaban localizados en el recto. En los tumores de colon izquierdo se observó una distribución más homogénea en cuanto al estadio tumoral. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para todos los grupos.

En lo publicado con respecto a este tema, independientemente de la edad de diagnóstico, el CCR localizado en el lado derecho suele diagnosticarse en estadio más avanzado que en el caso de los tumores del lado izquierdo y el recto, este hecho se relaciona con la sintomatología específica de los tumores según su localización; los tumores derechos son menos sintomáticos que los localizados en sigma y recto y cuando se diagnostican suelen presentar estadios más avanzados (Nawa T. *et al.* 2008). Si tenemos en cuenta la edad de diagnóstico tumoral, la bibliografía nos dice que la mayoría de los tumores en el adulto joven son diagnosticados en estadio precoz (Losi L. *et al.*

2005; Chang DT. *et al.* 2012; You YN *et. al* 2011), lo que si se corresponde con nuestra serie.

Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que un alto porcentaje de los individuos de nuestra muestra con CCR derecho, tienen antecedentes familiares para SL, por tanto, en estos pacientes el screening para el CCR se ha realizado de manera electiva y por tanto, se han diagnosticado tumores en colon derecho con estadios más precoces.

En cuanto al desarrollo de pólipos durante el seguimiento, se observó un porcentaje mayor de pólipos en los pacientes con tumores en colon derecho (70%) y colon izquierdo (60%), siendo este porcentaje menor para aquellos que tenían antecedente de un tumor en recto (41%), estos resultados no fueron estadísticamente significativos, pero si lo fue el número medio de pólipos desarrollados por localización, siendo mayor el número absoluto en el colon derecho. En cuanto a la histología, los pólipos adenomatosos fueron los que predominaron en el colon izquierdo y los mixtos en el colon derecho.

En la literatura existe poca información acerca de este tema, nombraremos la serie de Chang *et al.* (2012) que describe que en un 35% de los pacientes con CCR a edades tempranas se observaron pólipos durante el seguimiento, y la serie de Liang *et al.* (2015) el 30.1%; en ninguna de estas dos series se especificaba la localización de los pólipos desarrollados.

En cuanto al pronóstico tumoral, observamos que la supervivencia global de nuestra muestra empeora de forma progresiva desde el colon derecho al recto. En cuanto a la supervivencia libre de enfermedad ocurre lo mismo, mostrando mejor pronóstico los tumores localizados en colon derecho y peor pronóstico los localizados en recto; siendo estos hallazgos estadísticamente significativos.

Si tenemos en cuenta lo publicado en la literatura observamos que varios estudios han explorado las posibles diferencias en la supervivencia global entre tumores localizados en el colon derecho y el izquierdo, independientemente de la edad de diagnóstico; y observamos que existe cierta controversia. El estudio de Benedix F. *et al.* (2010) nos dice que a pesar de que las metástasis a distancia son más comunes en los tumores localizados en el colon izquierdo, la supervivencia es significativamente peor en el colon derecho que en el izquierdo, ajustada por estadio tumoral. Weiss JM *et al.* (2011), observa que en su serie al realizar una estratificación por edad no existían diferencias en la supervivencia global entre el colon derecho e izquierdo, excepto para el estadio III. Por otra parte, nombrar la aportación de Gao P. *et al.* (2013) que observó que la localización tumoral fue un factor protector independiente para los tumores mucinosos, los tumores mucinosos rectales tenían peor pronóstico que los derechos.

El hecho de que el pronóstico de nuestra serie sea peor para los tumores localizados en recto, puede ser debido a que no se ha realizado estratificación por estadio, coincidiendo que los tumores en colon derecho tenían estadios más precoces, que los localizados en el recto.

El 40% de los pacientes con tumores en colon derecho presentaron criterios Ámsterdam II para SL, el porcentaje más elevado de agregación familiar para SL y tumores del espectro Lynch fue para los pacientes con tumores localizados en recto (56%), los casos esporádicos fueron más frecuentes en los sujetos con tumores en colon izquierdo (48%); siendo todos estos hallazgos estadísticamente significativos.

Estos resultados son similares a lo publicado en la literatura, sin tener en cuenta el criterio de la edad. En el SL lo más común es encontrarnos con tumores localizados en el colon derecho, por tanto, será más frecuente encontrarnos tumores localizados en esta zona en pacientes con criterios Ámsterdam II positivos. Por otra parte, en nuestra serie es muy importante la agregación familiar que existe en todas las localizaciones (Jasperson KW *et al.* 2010, Balmaña J *et al.* 2010)

No sorprende la asociación entre tumores localizados en colon derecho y agregación familiar, ya que las neoplasias en esta localización se relacionan más a menudo con síndromes familiares. Sin embargo, si lo hace la asociada a los tumores localizados en colon izquierdo y recto. Este hecho, nos haría plantear la posibilidad de que existan otros síndromes familiares asociados a tumores en estas localizaciones, cuyas características anatómo-clínicas y moleculares aún no estarían descritas (*Valle et al.* 2007).

3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

3.1 MUESTRA TOTAL

3.1.1 VIA MUTADORA O INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

La vía mutadora o inestabilidad de microsatélites (IMS) surge de forma paralela al desarrollo del modelo descrito por Fearon y Vogelstein (1990). Esta vía es la responsable de aproximadamente el 10-15% de los tumores esporádicos y del 95% de los casos hereditarios (*Altonen et al.* 1993, *Thibodeau et al.* 1993). En el caso de los tumores hereditarios, su origen se debe a mutaciones germinales; mientras que en el caso de los tumores esporádicos estos son consecuencia de un silenciamiento epigenético del gen *MLH1* por hipermetilación de su región promotora (*Osorio et al.* 2014).

Esta vía se produce por una alteración en sistema de reparación de los errores producidos durante la replicación del ADN controlada por varios genes (*MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *MSH6*, etc). La acumulación de errores puede afectar a genes encargados de codificar la progresión tumoral (*TGF β -R-II*, *IGF2-R*), la apoptosis celular (*BAX*, *Caspasa-5*) y la señalización de la vía WNT (*Axina*, *β -catenina*, *Tcf4*) (*Pinheiro et al.* 2015), o a las secuencias microsatélites (sucesiones de nucleótidos cortas y altamente

repetitivas) (Stigliano *et al.* 2014). En este último caso se produce una alteración que inactiva el sistema MMR, los errores acumulados no pueden ser corregidos y el ADN posee un número de repeticiones diferente al ADN normal, lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites.

En general, los carcinomas con IMS suelen mostrar dotaciones cromosómicas intactas y ausencia de mutaciones en los genes alterados en la vía supresora (*APC*, *KRAS* y *p53*). Estos tumores, se localizan en la parte proximal del colon y están asociados a mejor pronóstico (Hveem *et al.* 2014, Mouradov *et al.* 2013).

El estudio molecular de la vía mutadora se lleva a cabo mediante el panel Bethesda o realizando una IHQ tumoral; ambos han sido descritos previamente. En nuestro estudio una vez establecida la sospecha de SL, en el caso de que el paciente cumpliera criterios Ámsterdam II, se realizaba el panel Bethesda y acto seguido la IHQ tumoral y el estudio genético. Revisando la literatura encontramos que se recomienda el análisis IHQ de las proteínas del sistema reparador MMR como método de detección precoz de pacientes con SL, ya que es una prueba con un sensibilidad y especificidad más elevada que los criterios Ámsterdam II (detecta hasta un 90% de los casos positivos) y nos guía en la realización del estudio genético (Pérez-Carbonell L *et al.* 2012). Además, varios estudios han demostrado que algunos pacientes portadores de errores en el sistema reparador MMR no tienen antecedentes familiares de CCR ni de otras neoplasias asociadas al SL; por este motivo estaría más que indicada la realización de la IHQ de entrada (Niessen RC. *et al.* 2006).

A. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES E INMUNOHISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DEL SISTEMA DE REPARACIÓN MMR.

De un total de 81 pacientes en los que se llevó a cabo el estudio; 12 (14.8%) presentaron IMS y los 69 tumores restantes (85.2%), fueron estables. En lo descrito en la literatura observamos porcentajes muy variables, con frecuencias de IMS que oscilan

entre el 19,7% y el 41% para este grupo de edad (Osorio et al. 2014), sin embargo, en nuestra población apenas se alcanzó el límite inferior de dicho intervalo. Estos datos tan variables podrían indicar que el porcentaje de IMS sería inversamente proporcional a la edad del individuo, es decir aumentaría cuanto menor fuese la edad de diagnóstico (Liang et al. 2003; Durno C et al. 2005).

En nuestros resultados llama la atención que la edad precoz de CCR no se asocie con una mayor proporción de SL, ya que solo un pequeño porcentaje de nuestros pacientes muestra alteraciones en el sistema de reparación de AD. Diferentes publicaciones han sugerido que sólo 1 de cada 20 tumores de inicio temprano son consecuencia de mutaciones germinales, presentando el resto naturaleza esporádica y etiología genética poco conocida (Antelo et al. 2012, Chang et al. 2012, Stigliano et al. 2014). Los resultados obtenidos en nuestra serie corroboran esta afirmación, ya que, por cada 20 adultos jóvenes, sólo hubo 1,6 en los que se detectase mutación a nivel germinal.

En el estudio IHQ en todos los tumores que presentaban IMS se identifica ausencia de expresión de alguna de las proteínas del sistema de reparación MMR. Se identificó una ausencia de expresión de la proteína Mlh1 en cinco tumores inestables, en cuatro de ellos la pérdida de expresión era secundaria a una mutación genética y uno de ellos se acompañaba de una pérdida de expresión de Pms2. Seis de los 12 tumores inestables presentaron pérdida de expresión de Msh2, sólo en cuatro se identificó mutación del gen correspondiente. La pérdida de expresión de MSH6 se identificó en 5 tumores, cuatro de ellos se acompañaron también de una ausencia de expresión de Msh2.

El 14.8% de los tumores de la muestra tenían una alteración IHQ, porcentaje que se encuentra dentro de lo descrito en la literatura (Goel A et al. 2010, Giráldez MD et al. 2012, Steinhagen E et al. 2012).

B. ANÁLISIS GENÉTICO

De las muestras de sangre extraídas de los pacientes en cuyos tumores se identificó IMS, se extrajo en ADN para proceder al estudio completo de los genes MMR. De los 12 casos analizados, diez (83.3%) mostraron una mutación en alguno de los principales genes implicados en la reparación del ADN. El número de mutaciones en *MLH1* Y *MSH2* fue el mismo en nuestra muestra (40%), uno de los casos no mostró mutación genética, sino hipermetilación del gen *MLH1* y en el otro no se encontraron alteraciones genéticas a nivel de los genes relacionados, a pesar de la ausencia de expresión de la proteína *MSH6*.

En la literatura se describe una variabilidad en el porcentaje de mutaciones que oscila entre el 8.9% y el 92.6%, guardando relación esta gran oscilación con el criterio de edad empleado en la selección de los pacientes (Antelo *et al.* 2012, Liang *et al.* 2003). En cuanto a la localización de las mutaciones, en la serie de Niessen *et al.* (2006) observamos que el 32% de las alteraciones identificadas correspondía a *MLH1*, el 36% a *MSH2* y el 32% a *MSH6*, y más tarde en lo publicado por el grupo de Perea *et al.* (2010), el 37,5 % de las mutaciones se hallaron en *MLH1* y el 62,5% en *MSH2*.

C. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y FAMILIARES DE LA VIA MUTADORA

En nuestro trabajo, se estudiaron y compararon las características clínico-patológicas y familiares de los pacientes de la muestra divididos en dos grupos en función de la estabilidad o IMS.

Se observó que los pacientes cuyos tumores con IMS presentaban una edad menor al diagnóstico (34.33 años vs 40.4 años) y que este tipo de tumores eran más frecuentes en los hombres (75%) que en las mujeres (25%), en las que predominaban los tumores estables; siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

En la literatura publicada se repiten estas diferencias; Losi *et al.* (2005), con una muestra en la que la edad límite eran 45 años, observa una edad media de 38.2 años en el grupo IMS y de 40.1 en el grupo EM. Perea *et al.* (2011), publica resultados similares a los anteriores, con una edad media para los tumores inestables de 37 años y de 41 años para los EMS. Estas discrepancias entre nuestra serie y lo anteriormente publicado podría deberse a que en nuestro grupo el porcentaje de SL sea mayor.

Los tumores con IMS se localizaron en colon derecho e izquierdo en la misma proporción (50%), y ninguno de ellos lo hizo en el recto. En cuanto a los tumores con EMS, estos mostraron especial predilección por el colon izquierdo (42%) y el recto (37.7%), siendo el colon derecho la localización menos frecuente para ellos (20.3%), considerándose estas diferencias estadísticamente significativas. En los resultados descritos en la literatura, tanto en la serie de Losi *et al.* (2005) como en la de Perea *et al.* (2010) alrededor del 60% de los tumores IMS y alrededor del 40% de los EMS se localizaban en el colon derecho. Por tanto, los datos de estas series coinciden con nuestros resultados, observándose un predominio de los tumores inestables en el colon derecho y de los estables en el izquierdo y el recto.

Los tumores inestables eran más indiferenciados que los estables (18.2% vs 12.2%), aunque el porcentaje de estos era bajo. Eran más mucosecretorios (54.9% vs 26.5%), y se observó en ellos un número mayor de células en anillo de sello (18.2% vs 4.1%). En los trabajos de Liang *et al.* (2002), Losi *et al.* (2005) y Perea *et al.* (2010), la mayor parte de los tumores estables e inestables tenía un grado medio de diferenciación. En las series en las que el número de pacientes con SL era mayor, si que se observaba un predominio de bajo grado de diferenciación y un mayor porcentaje de producción de moco (Klarskov N *et al.* 2012).

Los tumores estables de los pacientes de la muestra se diagnosticaron con mayor frecuencia en estadios tempranos (31.9% A) o avanzados (26.1% D), en cambio los

tumores inestables se diagnosticaron en su mayoría en estadios intermedios (75% B y 16.7% C), estos resultados fueron estadísticamente significativos. En cuanto a este tema, la literatura publicada no muestra consenso; si bien Losi *et al.* (2005) describe un predominio de estadios intermedios, en el trabajo de Liang *et al.* (2003) se observa un claro predominio de los estadios avanzados; sin que en ambas series se observen diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos.

El pronóstico de los tumores IMS, expresado en ST, SLE, recidiva tumoral y mortalidad, fue más favorable para los tumores IMS; estos datos mejoraban en el caso de los tumores EMS al excluir del estudio a aquellos tumores que presentaban enfermedad a distancia en el momento del diagnóstico y/o recidiva tumoral a lo largo del seguimiento, aunque no llegaban a igualarse a los resultados del grupo IMS. Estos resultados coinciden con lo publicado en la literatura

La agregación familiar fue mayor en los tumores con IMS, además en un 83.3% de estos pacientes se cumplían criterios Ámsterdam II, un 33% presentaron neoplasias asociadas al SL y el 11% presentó agregación familiar con neoplasias no relacionadas con el SL. Un 46.4% de los tumores con EMS fueron esporádicos, el 8.7% presentó agregación familiar con criterios Ámsterdam II, un 26.1% presentó agregación familiar y desarrollo neoplasias asociadas al SL y el 18.8 % presentó agregación familiar con neoplasias no relacionadas con el SL. En la serie de Losi *et al.* (2005) el 50% de los tumores IMS pertenecían a familias que cumplían criterios Ámsterdam II y el 36% eran esporádicos; en la serie de Steinhagen *et al.* (2012; solo el 16% de los tumores IMS se definían como SL. En nuestra serie sólo el 46.4% de los tumores EMS eran esporádicos; este hecho hace pensar en la existencia de un posible componente genético que podría estar en relación con síndromes hereditarios aún no descritos. Estos casos son habitualmente designados como CCR familiar tipo X (Goel *et al.* 2010, Stigliano *et al.* 2014) y se cree que podrían constituir el resultado del efecto sinérgico de varios genes de baja susceptibilidad que, combinados, serían capaces de conferir un riesgo aumentado de padecer esta neoplasia.

3.1.2 VÍA SERRADA O FENOTIPO METILADOR DE ISLAS CpG

La vía serrada ha sido la última vía de carcinogénesis descrita, es responsable del 35% de los CCR y se caracteriza por la metilación de islas CpG promotoras de genes supresores de tumores. Los tumores que se originan a partir de esta vía no siguen la secuencia clásica adenoma – carcinoma; se originan a partir de pólipos serrados (Anderson 2014, Yamane *et al.* 2014). El proceso de carcinogénesis se inicia a partir de una mutación que activa el gen *BRAF*, produciendo la inhibición de la apoptosis y la metilación aleatoria de los islotes *CpG* localizados en las regiones promotoras de múltiples genes (Arvelo *et al.* 2015). Es una vía rápida, que origina tumores agresivos y de predominio proximal, estirpe mucinosa, pobremente diferenciados y que poseen una alta tasa de mutaciones en *BRAF* o *KRAS* y baja tasa de mutaciones en p53 (Kocarnik *et al.* 2015; Nazemalhosseini *et al.* 2013). En ocasiones este tipo de tumores pueden presentar IMS (Schneider *et al.* 2014, Snover 2011), siendo en este caso más agresivos.

En nuestra serie se realizó el estudio de patrones de metilación en 68 pacientes del total de la muestra; el 19,1% presentan factor metilador alto (FM-Alto), el 41,17% factor metilador bajo (FM-Bajo) y el 39,7% ausencia de factor metilador (FM-0).

Posteriormente se realizó una clasificación en 4 grupos teniendo en cuenta el estado de metilación de islotes de CpG y del resultado de inestabilidad de microsatélites, teniendo en cuenta la clasificación molecular del CCR propuesta por Ogino y Goel (2008). El 72.1% de los tumores mostraron estabilidad de microsatélites y fenotipo metilador bajo o nulo (EMS-FM Bajo 0), un 5.9% de los tumores combinaron inestabilidad cromosómica y fenotipo metilador alto (EMS-FM Alto), un 13.2% eran estables con un fenotipo metilador alto (EMS-FM Alto) y un 8.8% inestable con un fenotipo metilador bajo o nulo (IMS-FM Bajo 0). Teniendo en cuenta la literatura, observamos que nuestros resultados coinciden con lo publicado, si bien debemos tener en cuenta que en la serie de Hawkins NJ *et al.* (2001) y en la de Rinjsoever M. *et al* (2002) no se tiene en cuenta el grado de metilación y en los estudios no se incluyen solo adultos jóvenes.

El grado de hipermetilación, implica un comportamiento determinado al tumor, por eso a continuación se describen las características clínico-patológicas y familiares de los tumores originados a través de la vía serrada en función de su grado de metilación.

Los grupos predominantes de la muestra fueron los tumores FM-Bajo y FM-0; con un porcentaje del 41.2% y el 39.7% respectivamente; el grupo menos números fueron los FM-Alto con un porcentaje del 19.1%.

Los tumores de nuestra muestra con mayor grado de hipermetilación (FM-Alto) aparecían a edades más jóvenes, eran más frecuentes en mujeres (53.8% , frente 35.7% y 33% para los FM-Bajo y FM-0 respectivamente) y se localizaban sobretodo en el colon derecho (61.5%); mientras que los FM-Bajo eran más frecuentes en el colon izquierdo (50%) y los FM 0 se distribuían de forma similar en el colon izquierdo y en el recto (51.9% y 40.7% respectivamente). En las tres categorías el estadio precoz fue el predominante al diagnóstico (A y B de Dukes), principalmente en el grupo FM-Alto (A 30,8%, B 46,2%, C 15,4% y D 7,7%).

Desde el punto de vista anatomopatológicas, observamos que los FM-Alto son los más indiferenciados (22.2% vs a 13.6% y 0% en FM Bajo y 0 respetivamente) y los que mayor cantidad de mucina producen (44.4% vs 36.4% y 20.8 % en FM-Bajo y 0 respectivamente); además los pacientes con este tipo de tumor desarrollaron mayor número de pólipos durante el seguimiento (76.9%) siendo predominantemente pólipos mixtos.

Desde el punto de vista molecular, observamos que los FM-Alto van de nuevo en cabeza con respecto al porcentaje de IMS (30.8% vs 14.3% y 7.4% en FM-Bajo y FM-0 respectivamente), el porcentaje de mutaciones en las proteínas reparadoras MMR (30.8% vs 7.1% en FM-Bajo y 7.4% en FM-0) y la ausencia de expresión de Mlh1 por hipermetilación (15.4%).

En cuanto a la agregación familiar, esta estuvo presente en los tres grupos, pero en el grupo FM-Alto tanto la asociada a positividad para criterios Ámsterdam II (30.8%) como la agregación familiar y el desarrollo de neoplasias del espectro Lynch (23.1%), fueron elevados. Los casos esporádicos fueron minoritarios en todos los grupos.

Por tanto, concluimos teniendo en cuenta los resultados de nuestra muestra, que los tumores con alto grado de hipermetilación son proximales, de predominio en el sexo femenino, indiferenciados, productores de moco, IMS desde el punto de vista molecular, con un alto porcentaje de mutaciones en las proteínas reparadoras MMR y ausencia de mutaciones en *BRAF*. En lo publicado en la literatura, sin tener en cuenta el límite de edad en el adulto joven, Hawkins NJ *et al.* (2001) y Van Rijnsoever *et al.* (2002), describieron la relación entre el fenotipo metilador y los tumores localizados en colon derecho, el sexo femenino, el estadio avanzado, la producción de moco, la edad avanzada, el *P53* nativo, la IMS y la mutación *KRAS*. Estudios posteriores describen asociación entre el fenotipo metilador y las mutaciones en *BRAF V600E* (Kambara T *et al.* 2001; Nagasaka T *et al.* 2004; Carethers JM *et al.* 2011).

Kane MF *et al.* (1997), describen que el grupo FM-Alto presentaban un alto porcentaje de IMS, secundario a hipermetilación de *MLH1*. En la serie de Samowitz W. *et al.* (2005) observa que el 29.8% de los CCR analizados presentan FM Alto y que el 82.1% de estos tumores eran IMS; se identificó una hipermetilación de *MLH1* en el 21.3% del total, de estos el 15.3% eran IMS y el 80.6% EMS.

Parece que en el CCR del adulto joven FM-Alto puede dividirse en dos grupos. Por una parte, los FM-Alto con mutaciones en *BRAF* y por otro lado los FM-Alto con metilación del promotor del gen *MLH1* y *BRAF* no mutado (WT); este ultimo grupo presentaría características similares al SL (Goel A *et al.* 2010; Van Roon EH *et al.* 2010)

3.1.3 VIA SUPRESORA O INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

La vía supresora o inestabilidad cromosómica constituye el 85% de los CCR esporádicos y se caracteriza por el desarrollo de tumores a través de ganancias y pérdidas de fragmentos de determinados cromosomas o de cromosomas enteros (aneuploidia). Este hecho genera una progresión de cambios genéticos que se traducen en activación de protooncogenes o inactivación de genes supresores de tumores o pérdidas de heterocigosidad.

Los tumores desarrollados a través de esta vía suelen ser EMS, se localizan en el lado izquierdo del colon y se asocian con características pronósticas más desfavorables. Los tumores EMS en adultos jóvenes son tumores con etiología genética desconocida, muy heterogéneos y con características genéticas desfavorables; por este motivo son considerados tumores de alto riesgo (Perea *et al.* 2014). La literatura describe regiones genéticas alteradas en este grupo de pacientes, pero las series publicadas son pequeñas por lo que es difícil extrapolar estos resultados a la realidad.

Para determinar el grado cuantitativo de inestabilidad, se calculó el grado de inestabilidad genómica (GII). Este fue similar para las ganancias y las pérdidas, la media del número de copias alteradas fue de 95.8, siendo mayores las pérdidas totales que las ganancias.

A continuación, se realizó un estudio cualitativo de los CNV (ANEXO 3 A) observándose que las alteraciones recurrentes más frecuentes en nuestra muestra fueron las siguientes:

- Pérdidas: 1p36 (61%); 14q11 (61%); 5q13.2 (57%); 9q13q21(57%); 1p12-q21 (53%); 11p11-q12 (50%).
- Ganancias: 19q13-p12 (57%); 19q13-q13 (52%); 17q24-q25 (50%).

En cuanto a las pérdidas detectadas en nuestra serie; observamos que 14q11 (61%) y 1p36 (61%), han sido previamente descritas (Mourra *et al.* 2007) y además esta última ha sido relacionada con la diseminación tumoral en estadios II-III (Mayrhofer M. *et al.* 2014). La pérdida de 14q11 es conocida por encontrarse delecionada en aproximadamente el 30% de todos los CCR, más frecuentemente en los tumores de inicio precoz (Mourra N. *et al.* 2007). Existen otros trabajos publicados en los que las pérdidas a lo largo del cromosoma 18 se han señalado como frecuentes dentro de la enfermedad sin tener en cuenta la edad de diagnóstico (Orsetti B. *et al.* 2014).

Si tenemos en cuenta a las ganancias; observamos que 19q13.1 se asocia a una gran susceptibilidad para el CCR (Wang *et al.* 2013) y por otra parte 19p13.3-q13.42, se describe como la región más frecuentemente alterada en CCR del adulto joven (Berg M. *et al.* 2010).

Se han relacionado también con la supervivencia y diseminación tumoral, pérdidas en cromosomas 1p, 4p, 8p, 9q, 15p, 10p, 19p, 20p y ganancias en 8q y 20q (Cancer Genome Atlas Network 2012).

Nuestros resultados difieren con lo observado en la literatura; por una parte, teniendo en cuenta las pérdidas; observamos series en las que 18q11-q23 aparece en un 60% de los tumores analizados (38% en nuestra muestra); 17p13-q11 en el 39% (37% en nuestra muestra) y 10q23 en el 38% (30% en nuestra muestra). En cuanto a las ganancias; 20q11-q13 y 7p22 con porcentajes en la literatura del 68% y el 36% respectivamente y un 38% en nuestra serie (Chen Z. *et al.* 2011, Hoskins JM *et al.* 2012, Wang H. *et al.* 2013).

Las diferencias entre los porcentajes publicados y los observados en nuestro estudio, pueden ser consecuencia de los diferentes criterios de inclusión empleados, ya que la edad de corte en nuestro estudio es <45 años y >50 años en los estudios publicados (Mourra *et al.* 2007) y también secundarios a que en la literatura descrita no se ha utilizado una plataforma array-CGH para la evaluación de CNV (Boardman LA. *Et al.* 2013, Bruin SC *et al.* 2010, Molinari C. *et al.* 2011).

3.1.4 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CCR

En un principio se pensó que la vía supresora y mutadora eran mutuamente excluyentes, planteándose la existencia de únicamente dos tipos de tumores: tumores con inestabilidad cromosómica y estabilidad de microsatélites (INC+IMS-) y aquellos con estabilidad cromosómica e inestabilidad de microsatélites (INC-IMS+). Más tarde se demostró que hasta un 50% de los tumores IMS-, también eran INC- y que una pequeña porción de los IMS+ eran INC+ (Georgiades *et al* 1999, Tang *et al* 2004), surgiendo una nueva estratificación del CCR en cuatro genotipos bien diferenciados: IMS+INC+ (3%); IMS+INC- (11%); IMS-INC- (48%), IMS-INC+ (38%).

Más tarde se demostró una conexión entre las tres vías de carcinogénesis; por ello en los últimos años se propone una nueva clasificación basada en la superposición de todas ellas. Por tanto, los CCR se podrían clasificar en cuatro grupos principales: dos referidos al estado de IMS (Alto vs EMS) y dos referidos al estado del FM (Alto vs Bajo/0) todos ellos con diferentes características clínicas y moleculares.

Grupo 1: IMS-Alto, FM-Alto —> incluye hipermetilación MLH1

Grupo 2: IMS-Alto, FM-Bajo/0 —> Tumores asociados a SL

Grupo 3: IMS-Bajo/EMS, FM-Alto

Grupo 4: IMS-Bajo/EMS, FM-Bajo/0 —> Incluye los pacientes con PAF

Esta clasificación fue descrita por Jass JR *et al.* (2007) y a posteriori fue modificada por Ogino y Goel en 2008. Estos diferenciaron cuatro grupos:

- IMS-FM Alto: (5% CCR): Son más frecuentes en mujeres añosas, colon proximal, indiferenciados, con alta producción de mucina y células en anillo de sello, IMS esporádico, con frecuentemente metilación de *MLH1* y mutaciones en *BRAF*.
- IMS-FM Bajo 0 (10% CCR): Se localizan preferentemente en colon proximal, suelen presentar alto grado de diferenciación y escasa producción de mucina y células en anillo de sello; dentro de este grupo se incluye el SL.
- EMS-FM Alto (5-10% CCR): Más frecuentes en colon derecho y mujeres añosas, indiferenciados y con alto contenido de células en anillo de sello, se asocian a mutaciones en *BRAF*.
- EMS-FM Bajo 0 (75-80% CCR): es el grupo más heterogéneo, suelen afectar a varones y al colon distal.

Teniendo en cuenta esta clasificación, observamos que el grupo mayoritario de nuestra muestra fue el EMS-FM Bajo, con un total de 49 pacientes (72.1%), y el minoritario el IMS-FM Alto, con un total de 4 pacientes (5.9%). En cuanto a la edad el grupo más joven fue el IMS-FM Alto y el grupo con edades más altas al diagnóstico el EMS-FM Alto; siendo estos resultados estadísticamente significativos y similares a los descritos en la literatura (Ogino y Goel, 2008).

Los tumores IMS-FM Alto de nuestra serie, muestran un predominio por el colon derecho (75%), similar a lo descrito en la literatura (Ogino y Goel 2008; Lee MS. *et al.* 2016); el 100% de ellos son SL, sin presentar características típicas de este síndrome. Estos resultados son llamativos y podrían explicarse por dos motivos, por una parte, tenemos una muestra muy pequeña de pacientes que podría no ser representativa de la realidad y por otra parte el 100% de los individuos son SL.

El grupo de tumores IMS-FM Bajo 0, se asocia con producción de mucina, localización en colon izquierdo (66.7%) e importante agregación familiar (el 83.3 % cumplía criterios Ámsterdam II).

Los tumores del grupo EMS-FM Alto de nuestra serie, eran mayoritariamente esporádicos, la distribución por sexo fue homogénea, su localización mayoritariamente proximal, poseían un alto componente mucinoso y una importante agregación familiar. Ninguno de ellos presentó mutaciones en *BRAF*. Aunque existen similitudes con la literatura descrita (Ogino y Goel 2008; Lee MS *et al.* 2016), nuevamente es difícil establecer conclusiones al respecto por el limitado tamaño de la muestra.

Por último, el grupo mayoritario fue el EMS-FM Bajo 0. Los tumores de este grupo se caracterizaban por una localización distal, presencia de pólipos y de otras neoplasias en el seguimiento, ausencia de pérdida de expresión de Mlh1 y de mutaciones en MMR, baja proporción de mutaciones en *BRAF* y un importante componente de agregación familiar, siendo el 44,9% de ellos esporádicos. Este subgrupo de tumores podría explicarse dentro de síndromes hereditarios cuyas bases moleculares no están completamente definidas, como el síndrome familiar tipo X o los denominados MACS.

3.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS DIFERENTES VÍAS DE CARCINOGENÉISIS Y LOCALIZACIÓN TUMORAL.

En nuestro estudio la IMS estuvo presente en el 30% de los tumores localizados en el lado derecho, en el 17% de los localizados en el colon izquierdo y en ninguno de los tumores de recto. El 100% de los tumores rectales fueron EMS, predominando también este tipo de tumores frente a los IMS tanto en el colon derecho (70%) como en el izquierdo (83%; siendo estos resultados estadísticamente significativos.

Estos datos se corresponden con lo publicado en la literatura; en series como la de Losi *et al.* (2005) y Perea *et al.* (2010) se describen frecuencias similares; el 60% de los tumores IMS y el 40% de los EMS se localizaban en el colon derecho.

Un total de 10 casos presentaron una mutación germinal en los genes de las proteínas reparadoras MMR; 2 en *MLH1* y 4 en *MSH2* en el caso del colon derecho y 2

en *MLH1* y 2 *MSH6* en el colon izquierdo. En uno de los tumores localizado en colon izquierdo, la pérdida de expresión de Mlh1 se debía a la hipermetilación del promotor *MLH1*. Estos resultados fueron estadísticamente significativos.

En el estudio de la vía serrada se observó un importante componente metilador en los tumores localizados en el colon derecho; este fue alto en el 50% de los casos (FM Alto) y bajo en el 37.5% de los casos (FM Bajo). Por otro lado, sólo un 10% de los tumores de colon izquierdo y un 10% de los localizados en el recto presentaron un 10% de fenotipo metilador alto (FM Alto), siendo estos resultados estadísticamente significativos.

En lo publicado en la literatura, sin tener en cuenta el límite de edad en el adulto joven, Hawkins NJ *et al.* (2001) y Van Rijnsoever *et al.* (2002), describieron la relación entre el fenotipo metilador y los tumores localizados en colon derecho, el sexo femenino, el estadio avanzado, la producción de moco, la edad avanzada, el P53 nativo, la IMS y la mutación *KRAS*. Iacopetta (2002), también nos dice en su publicación que los tumores con alto grado de metilación o CIMP-High predominan en el colon derecho.

En cuanto a la clasificación molecular del CCR, los tumores derechos mostraron una distribución uniforme para todas las categorías con un ligero predominio para EMS-FM Bajo (37.5%). Tanto los tumores localizados en el colon izquierdo como los localizados en el recto presentaron predominio para EMS-FM Bajo, 77.5% y 90.5% respectivamente. Estos resultados fueron estadísticamente significativos.

La clasificación molecular fue inicialmente descrita por Jass JR *et al.* (2007) y posteriormente modificada por Ogino y Goel en 2008. Si tenemos en cuenta la localización tumoral, asociada a la clasificación molecular descrita en este artículo, observamos que se cumple en nuestra serie lo descrito por estos autores; los tumores localizados en colon distal eran mayoritariamente EMS-FM Bajo y el resto se localizaban fundamentalmente en colon proximal.

Para el estudio de la vía supresora se empleó la técnica de CGH-array (Comparative Genomic Hybridization), descrita previamente en total de 59 pacientes. Para determinar el grado cuantitativo de inestabilidad, se calculó el grado de inestabilidad genómica (GII) que fue más alto para los tumores localizados en el lado izquierdo, las diferencias en este grupo fueron sobretodo a expensas de pérdidas y eran estadísticamente significativas. El número de copias alteradas fue también mayor para los tumores localizados en el lado izquierdo, siendo el valor más bajo el de los tumores localizados en el recto.

Perea *et al.* (2014), describieron que los tumores con mayor inestabilidad genética eran aquellos localizados en colon izquierdo, además añadía que eran tumores con mal pronóstico y generalmente EMS, nuestros datos concuerdan con lo descrito.

El estudio cualitativo de las CNV identificó las regiones recurrentes alteradas en función de la localización tumoral. (ANEXO 3B)

En nuestra serie la región recurrente alterada más frecuente en el colon derecho fue la ganancia de 19p13.3-q13.42; esta región ha sido descrita en la literatura como la alteración más frecuente en el CCR de la población joven (Berg M. *et al* 2010). En esta misma referencia bibliográfica se describe a la pérdida 1q12-q21.2 como una de las regiones más comúnmente alteradas dentro del colon derecho e izquierdo. Otras regiones como la ganancia de 7q22.1, se ha asociado a tumores localizados en colon derecho y relacionados con el oncogen *GAEC1* (Gopalan *et al* 2010) y la pérdida de 14p11.1-11.2 se ha asociado con tumores localizados en recto y al oncogen *NDGR2*.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. En nuestra serie el CCR del adulto joven predomina en el sexo masculino y se desarrolla principalmente en el colon izquierdo. Estos tumores se caracterizaron por presentar alto contenido en mucina, estadios tempranos al diagnóstico y el 38% de ellos fueron esporádicos. Se asociaron con un alto porcentaje de pólipos y no se relacionaron con un alto porcentaje de tumores sincrónicos o metacrónicos.
2. En cuanto a las características moleculares, la mayor parte de los tumores de nuestra serie presentaron EMS (85.2%), un 19% se asociaron con factor metilador alto y el grupo mayoritario teniendo en cuenta la clasificación molecular del CCR fue el EMS-FM Bajo/0 con un 72%. Los tumores de nuestra muestra presentaron un número bajo de segmentos cromosómicos alterados y una elevada cifra de cambios recurrentes. Las regiones recurrentemente alteradas más frecuentes fueron las pérdidas de 1p36 y 14q11, y las ganancias de 19q13-p12 (57%) y 19q13-q13 (52%).
3. Los tumores localizados en colon derecho presentaron estadios precoces al diagnóstico, alto porcentaje de pólipos y tumores sincrónicos y/o metacrónicos asociados y mejor pronóstico que los localizados en otras regiones. El 40% de los pacientes de nuestra serie cumplían criterios para SL y el 20% fueron tumores esporádicos. Desde el punto de vista molecular el 30% de los tumores presentaron IMS, el 50% se asoció a un FM alto y apenas presentaron inestabilidad cromosómica.

4. Los tumores localizados en colon izquierdo presentaron características clínico-patológicas y familiares transicionales entre los localizados en el colon derecho y el recto. Fueron en su mayoría esporádicos (48%) y desde el punto de vista molecular, el 83% fueron EMS y se asociaron a un alto grado de inestabilidad genómica.

5. Los tumores rectales se diagnosticaron en estadios más avanzados, presentaron peor pronóstico y el 37% fueron esporádicos. Desde el punto de vista molecular el 100% presentó EMS, el 48% presentaron FM y teniendo en cuenta la clasificación molecular del CCR, el grupo EMS-FM Bajo/0 fue el grupo mayoritario con un 90.5%. En este grupo la inestabilidad cromosómica fue baja.

6. Los hallazgos de nuestro estudio sugieren que el CCR en el adulto joven es un grupo heterogéneo, con características diferenciales desde el punto de vista clinicopatológico, familiar y molecular. Además, observamos que las bases moleculares del CCR en este grupo poblacional varían en función de la localización tumoral, lo que podría tener implicaciones importantes en el manejo terapéutico de esta patología.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993 May 7;260(5109):812-6.
2. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Sep;27(9):1423-31.
3. American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology*. 2001;121:195-7.
4. Anderson JC, Butterly LF, Robinson CM, et al. Risk of Metachronous High-Risk Adenomas and Large Serrated Polyps in Individuals with Serrated Polyps on Index Colonoscopy: Data From the New Hampshire Colonoscopy Registry. *Gastroenterology*. 2018; 154:117-27 .e2.
5. Anderson JC. Pathogenesis and management of serrated polyps: current status and future directions. *Gut Liver*. 2014 Nov;8(6):582-9.
6. Antelo M, Balaguer F, Shia J, Shen Y, Hur K, Moreira L, et al. A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45357.
7. Argilés G., Tabernero J., Labianca R., et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up. *Ann. Oncol* 2020.
8. Armaghany T, Wilson J D, Quyen Chu, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Research* 2012 Jan; 5:19-27.
9. Armelao F, de Pretis G. Familial colorectal cancer: a review. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 28;20(28):9292-8.
10. Arriba M, García JL, Inglada-Pérez LS, Rueda D, Osorio I, et al. Array-based Comparative Genomic Hybridation defines age at onset as a factor for differential Chromosomal instability within Colorectal Cancer. *Mol Carcinog* 2015.
11. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalsecience*. 2015 Apr 9; 9:520.

12. Atkin WS, Saunders BP. Surveillance guidelines after removal of colorectal adenomatous polyps. *Gut*. 2002 Oct; 51 Suppl 5: V6-9.
13. Ayiomamitis GD, Notas G, Zaravinos A, Zizi-Sermpetzoglou A, Georgiadou M, Sfakianaki O, et al. Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer. *Can J Surg*. 2014 Jun;57(3):199-208.
14. Baca B, Beart RW Jr, Etzioni DA. Surveillance after colorectal cancer resection: a systematic review. *Dis Colon Rectum*. 2011 Aug; 54(8):1036-48.
15. Bae JM, Kim JH, Cho NY, Kim TY, Kang GH. Prognostic implication of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancers depends on tumour location. *Br J Cancer*. 2013 Aug 20;109(4):1004–12.
16. Baena R, Salinas P. Diet and colorectal cancer. *Maturitas*. 2015; 80:258-64.
17. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2015; 112:580-93.
18. Bailey, C.E.; Hu, C.-Y.; You, Y.N.; Bednarski, B.K.; Rodriguez-Bigas, M.A.; Skibber, J.M.; Cantor, S.B.; Chang, G.J. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975–2010. *JAMA Surg*. 2015, 150, 17–22.
19. Balmaña J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D; ESMO Guidelines Working Group. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2013 Oct;24 Suppl 6:vi73-80.
20. Balmaña J, Castells A, Cervantes A. ESMO Guidelines Working Group. Familial colorectal cancer risk: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2010 May; 21:Suppl 5:v78-81.
21. Balmaña J, Stockwell DH, Steyerberg EW, et al. Prediction of MLH1 and MSH2 mutations in Lynch syndrome. *JAMA*. 2006; 296:1469-78.
22. Banerjea A, Hands RE, Powar MP, et al. Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence. *Colorectal Dis* 2009; 11:601-8.
23. Bartlett DL, Chu E. Can metastatic colorectal cancer be cured? *Oncology (Williston Park)*. 2012 Mar; 26(3):266-75.
24. Bas B, Dinc B, Oymaci E, Mayir B, Gunduz UR. What are the Endoscopic and Pathological Characteristics of Colorectal Polyps? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(13):5163-7.

25. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum*. 2010 Jan;53(1):57–64.
26. Berends MJ, Hollema H, Wu Y, van Der Sluis T, Mensink RG, ten Hoor KA, et al. MLH1 and MSH2 protein expression as a prescreening marker in hereditary and nonhereditary endometrial hiperplasia and cancer. *Int J Cancer* 2001; 92: 398-403.
27. Berg M, Agesen TH, Thiis-Evensen E; INFAC-study group, Merok MA, Teixeira MR, Vatn MH, et al. Distinct high-resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci. *Mol Cancer*. 2010 May 6;9:100.
28. Bertario L, Russo A, Sala P, Varesco L, Giarola M, Mondini P, et al. Multiple approach to exploration of genotype-phenotype correltions in familial adenomatous polyposis. *Jclin oncol*. 2003 May 1; 21(9):1698-1707.
29. Bessa X, Ballesté B, Andreu M, et al. A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008; 6:206-14.
30. Bethesda guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer. *Gut*. 2012 Jun; 61(6): 865-72.
31. Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 14;20(22):6786-808.
32. Blanco-Calvo M, Concha Á, Figueroa A, Garrido F, Valladares-Ayerbes M. Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach. *Int J Mol Sci*. 2015 Jun 15;16(6):13610-32.
33. Boardman LA, Johnson RA, Petersen GM, Oberg AL, Kabat BF, Slusser JP, et al. Higher frequency of diploidy in young-onset microsatellite-stable colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2323-8.
34. Boland CR y Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. Jun 2010;138 (6): 2073-2087.
35. Boardman LA, Johnson RA, Viker KB, Hafner KA, Jenkins RB, et al. Correlation of chromosomal instability, telomere length ant telomere maintenance in microsatellite stable rectal cancer: a molecular subclass of rectal cancer. *PLoS One* 2013; 8: e80015.

36. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, 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: 5248-5.
37. Boley and, Ferlay. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-488.
38. Borràs, Josep Maria. Cribado del cáncer colorrectal en España. *Epidemiología del cáncer colorrectal. Dentro de cribado del cáncer colorrectal en España. ¿es coste efectivo? Alianza para la prevención del cáncer colorrectal. Madrid, 2011.*
39. Boyle T, Keegel T, Bull F, et al. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104:1548-61.
40. Boley and, Ferlay. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005;16: 481-488.
41. Bray F., Ferlay j., et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424.
42. Brown G, Fraser C, Schofield G, et al. Video capsule endoscopy in Peutz-Jeghers syndrome: a blinded comparison with barium follow-through for detection of small-bowel polyps. *Endoscopy.* 2006;38:385-90.
43. Bruin SC, Klijn C, Liefers GJ, Braaf LM, Joosse SA, van Beers EH, et al. Specific genomic aberrations in primary colorectal cancer are associated with liver metastases. *BMC Cancer.* 2010 Dec 2;10:662.
44. Buess G, Theiss R, Gunther M, et al. Endoscopic surgery in the rectum. *Endoscopy* 1985; 17:31-35.
45. Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med* 1990; 113: 779-788
46. Bülow C, Vasen H, Järvinen H, et al. Ileorectal anastomosis is appropriate for a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* 2000;119:1454-60.
47. Bülow S, Björk J, Christensen IJ, et al. Duodenal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *Gut.* 2004;53:381-6

48. Byfield SA, Syngal S. Clinical guidelines versus universal molecular testing: are we ready to choose an optimal strategy for Lynch syndrome identification? *Am J Gastroenterol*. 2008 Nov. 103(11):2837-40.
49. Cai G, Xu Y, Lu H, Shi Y, Lian P, Peng J, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic microsatellite and chromosomal-stable colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23:365-373.
50. Calin GA, Gafà R, Tibiletti MG, Herlea V, Becheanu G, Cavazzini L, et al. Genetic progression in microsatellite instability high (MSI-H) colon cancers correlates with clinico-pathological parameters: A study of the TGRbetaR11, BAX, hMSH3, hMSH6, IGF1R and BLM genes. *Int J Cancer*. 2000 May 20;89(3): 230-5.
51. Campos, F.G. Colorectal cancer in young adults: A difficult challenge. *World J Gastroenterol*. 2017, 23, 5041–5044.
52. Canard G, Lefevre JH, Colas C, et al. Screening for Lynch syndrome in colorectal cancer: are we doing enough? *Ann Surg Oncol*. 2012; 19:809-16. *Cancer cell* 2002; 1:233-6.
53. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 18;487(7407):330-7.
54. Cappell., Mitchell S. Pathophysiology, clinical presentation, and management of Colon cancer. *Gastroenterology clinics of North America* 2008; 37:1-24.
55. Carethers JM, Stoffel EM. Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 21;21(31):9253-61.
56. Carethers JM. Differentiating Lynch-like from Lynch syndrome. *Gastroenterology*. 2014;146:602-4.
57. Carro, Angel, Daniel Rico, Oscar M. Rueda, Ramon Diaz-Uriarte, y David G. Pisano. waviCGH: a web application for the analysis and visualization of genomic copy number alterations. *Nucleic Acids Research*. 2010; vol 38, Web server issue. doi:10.1093/nar/gkq44).
58. Castells A, Marzo-Castillejo M, Mascort J, et al. Guía de prácticas clínicas en prevención del cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol*. 2009 Dec; 32(10): 717. e1-58.
59. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009 Nov-Dec;59(6):366-78.

60. Chan TL, Curtis LC, Leung SY, Farrington SM, Ho J WC, Chan A SY, et al. Earlyonset colorectal cancer with stable microsatellite DNA and near- diploid chromosomes. *Oncogen* 2001;20:4871-4876
61. Chang AJ, Nahas CS, Araujo SE, et al. Early rectal cancer: local excision or radical surgery? *J Surg Educ.* 2008 Jan- Feb; 65(1):67-72.
62. Chang DT, Pai RK, Rybicki LA, Dimaio MA, Limaye M, Jayachandran P, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features. *Mod Pathol.* Aug 2012; 25(8):1128-39.
63. Chen Z, Liu Z, Li W, Qu K, Deng X, Varma MG, et al. Chromosomal copy number alterations are associated with tumor response to chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011 Sep;50(9):689-99.
64. Chow E, Lipton L, Lynch E, et al. Hyperplastic polyposis syndrome: phenotypic presentations and the role of MBD4 and MYH. *Gastroenterology.* 2006;131:30-9.
65. Christensen M, Katballe N, Wikman F, Primdahl H, Sorensen FB, Laurberg S, et al. Antibody-based screening for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma compared with microsatellite analysis and sequencing. *Cancer* 2002;95: 2422-2430.
66. Christoforidis D, Cho HM, Dixon MR, et al. Transanal endoscopic microsurgery versus conventional transanal excision for patients with early rectal cancer. *Ann Surg* 2009 May; 249(5):776-82.
67. Codina A, Farrés R, Olivet F. Estadificación preoperatoria del Cáncer Colorrectal. *Cir Esp* 2003; 73:17-19.
68. Couch FJ, Wang X, McGuffog L, et al. Genome-wide association study in BRCA1 mutation carriers identifies novel loci associated with breast and ovarian cancer risk. *PLoS Genet.* 2013;9:e1003212.
69. Cubiella J et al. Sociedad española de Gastroenterología
70. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch Ht, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet.* 2010 Mar 20;375(9719):1030-47.
71. da Fonseca LM, da Luz MM, Lacerda-Filho A, Cabral MM, da Silva RG. Colorectal carcinoma in different age groups: a histopathological analysis. *Int J Colorectal Dis.* 2012 Feb; 27 (2): 249-55.
72. Davis DM, Marcet JE, Frattini JC, et al. Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *J Am Coll Surg.* 2011:213:352.

73. de Angelis R, Sant M, Coleman MP, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014; 15:23-34.
74. de Jong AE, Morreau H, Van Puijbroek M, Eilers PH, Wijnen J, Nagengast FM, et al. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology* 2004;126:42-48.
75. de Jong AE, van Puijbroek M, Hendriks Y, Tops C, Wijnen J, Ausems MG, et al. Microsatellite instability immunohistochemistry and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 972-980.
76. de la Chapelle, A. Microsatellite instability. *N Engl J Med.* 2003;349: 209-210.
77. de Vos tot Nederveen Cappel WH, Buskens E, Van Duijvendijk P, et al. Decision analysis in the surgical treatment of colorectal cancer due to mismatch repair gene defect. *Gut.* 2003;52:1752-1755.
78. Desch CE, Benson AB 3rd, Somerfield MR, Flynn PJ, Krause C, Loprinzi CL, et al. Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol.* 2005 Nov20; 23(33):8512-9.
79. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastasis colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 10; 26(35):5705-12.
80. Dong Y, Zhou J, Zhu Y, et al. Abdominal obesity and colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Biosci Rep.* 2017;37(6).
81. Dunlop, MG. Guidance on gastrointestinal surveillance for hereditary non-polyposis colorectal cancer, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis, and Peutz- Jeghers syndrome. *Gut.* 2002 Oct; 51 Suppl 5: V21-27.
82. Dunn KB, Trudel ,JL. Colorectal Cancer: Adjuvant Therapy. *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery.* 2011; 773-782
83. Durno C, Aronson M, Bapat B, et al. Family history and molecular features of children, adolescent and Young adults with colorectal carcinoma. *Gut* 2005;54: 1146-50.
84. Edge SB, Byrd DR, Compton CC et al. *Colon and Rectum.* eds.: *AJCC Cancer Staging Manual.* 7 th ed. New York, NY: Springer. 2010, 143-64.

85. Fadhil W, Kindle K, Jackson D, Zaitoun A, Lane N, Robins A, et al. DNA content analysis of colorectal cancer defines a distinct 'microsatellite and chromosome stable' group but does not predict response to radiotherapy. *Int J Exp Pathol*. 2014 Feb;95(1):16-23.
86. Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, Alley L, Friedman C, Edwards B et al. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer*. 2006 Sep 1;107(5 Suppl):1153-61.
87. Fass OZ., Poels KE., Qian Y., Zhong H., Liang PS, MD. Demographics Predict Stage III/IV Colorectal Cancer in Individuals Under Age 50 *J Clin Gastroenterol* 2020; 54:714–719).
88. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1; 61(5):759-67. Review
89. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol*. 2011; 22:1958.
90. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (2013). Disponible en <http://globocan.iarc.fr>.
91. Fleshman J., Branda M., Sargent DJ., Boller Am., George V., Abbas M., Peters WR., Maun D., Chang G., Herline A., Fichera A., Mutch M., Wexner S., Whiteford M., Marks J., Wren SM:, Pisters PW., Nelson H. Effect of Laparoscopis-Assisted Resection vs Open Resection of Stage II of III Cancer on Pathologic Outcomes: The ACOSOG Z6051 Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015 Oct 6;314(13): 1346-55.
92. Foxtrot collaborative group. Feasibility of Preoperative Chemotherapy for Locally Advanced, Operable Colon Cancer: The Pilot Phase of a Randomised Controlled Trial.. *Lancet Oncol*, 13 (11) 1152-60. Nov 2012
93. Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, et al. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut*. 2001 Apr;48 (4):515-521.
94. Frostberg E., Rahr HB. Clinical characteristics and a rising incidence of early-onset colorectal cancer in a nationwide cohort of 521 patients aged 18-40 years. *Cancer Epidemiology* 66 (2020) 101704

95. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Mar 1;89(5):1827-31.
96. Fukushima T, Takenoshita S. Colorectal carcinogenesis. *Fukushima J Med Sci*. 2001 Jun;1: 1-11. Review.
97. Galcerán J, Ameijide A, Carulla M, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017;19:799-825.
98. Galcerán J, Ameijide A, Carulla M, et al. Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. REDECAN. 2014.
99. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:385-98.
100. Galler AS, Petrelli NJ, Shakamuri SP. Rectal cancer surgery: a brief history. *Surg Oncol*. 2011 Dec; 20(4): 223-30
101. Gao P, Song YX, Xu YY, Sun Z, Sun JX, Xu HM, et al. Does the prognosis of colorectal mucinous carcinoma depend upon the primary tumour site? Results from two independent databases. *Histopathology*. 2013 Nov;63(5):603-15.
102. Ghazi S, Lindfors U, Lindberg G, Berg E, Lindblom A, Papadogiannakis N, y Low- Risk Colorectal Cancer Study Group. Analysis of colorectal cancer morphology in relation to sex, age, location, and family history. *J Gastroenterol*. 2012 Jun; 47(6): 619-34.
103. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000 Jan;18(1): 136-47.
104. Giacomini CP, Leung SY, Chen X, Yuen ST, Kim YH, Bair E, Pollack JR. A gene expression signature of genetic instability in colon cancer. *Cancer Res*. 2005 Oct15; 65(20): 9200-5.
105. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology*. 2001 Jul; 121(1): 198-213.
106. Giovannucci E, Wu K (2006) Cancers of the colon and rectum. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr (eds) *Cancer epidemiology and prevention*, 3rd edn. Oxford University Press, New York.

107. Giráldez MD, López-Dóriga A, Bujanda L, Abulí A, Bessa X, Fernández-Rozadilla C, et al. Susceptibility genetic variants associated with early-onset colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2012 Mar; 33 (3): 613-9.
108. Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, Jenkins J, Cliatt J, Humbyrd CJ, DeNobile J, Soballe P, Simon R, Wright G, Lynch P, Patterson S, Lynch H, Gallinger S, Buchbinder A, Gordon G, Hawk E, Kirsch IR. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 755-62.
109. Globocan, 2012. International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer) [actualizado 9 Ene 2014, citado 27 Oct 2014]. Disponible en <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.
110. Glynne Jones R. Rectal cáncer: ESMO clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up. *Gastr Cancers*. Volume 28, suoolement 4, IV22-IV40, 2017
111. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res*. 2003;63: 1608-14.
112. Goel A, Nagasaka T, Spiegel J, Meyer R, Lichliter WE, Boland CR. Low frequency of Lynch syndrome among young patients with non-familial colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010 Nov;8(11): 966-71.
113. Gonzalez EC, Roetzheim RG, Ferrante JM, Campbell R. Predictors of proximal vs. distal colorectal cancers. *Dis Colon Rectum*. 2001 Feb; 44 (2): 251-8.
114. Goodenberger M, Lindor NM. Lynch syndrome and MYH-associated polyposis: review and testing strategy. *J Clin Gastroenterol*. 2011 Jul; 45 (6): 488-500.
115. Gopalan V, Smith RA, Nassiri MR, Yasuda K, Salajegheh A, et al.. GAEC1 and colorectal cancer: a study of the relationships between a novel oncogene and clinicopathological features. *Hum Pathol* 2010; 41: 1009-15.
116. Grady, WM. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology*. 2003 May;124 (6):1.574-1.594.
117. Grady, WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004 Jan- Jun; 23(1-2): 11-27.
118. Groen EJ, Roos A, Muntinghe FL, et al. Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis. *Ann Surg Oncol*. 2008;15:2439-50.
119. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.

120. Guillem JG, Puig- La Calle J, Cellini C, Murray M, Ng J, et al. Varying features of early age of onset “sporadic” and Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer patients. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 36-42.
121. Guldberg P, Guttler F. A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 2261-2262.
122. Gupta S, Jacobs ET, Barón JA, et al. Risk stratification of individuals with low-risk colorectal adenomas using clinical characteristics: a pooled analysis. *Gut*. 2017; 66:446-53.
123. Guldberg P, Guttler F. A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1993 May 11; 21(9): 2261-2.
124. Gurbuz AK, Giardiello FM, Petersen GM, et al. Desmoid tumours in familial adenomatous polyposis. *Gut*. 1994;35: 377-81.
125. Haanstra JF, de Vos Tot Nederveen Cappel WH, et al. Quality of life after surgery for colon cancer in patients with Lynch syndrome: partial versus subtotal colectomy. *Dis Colon Rectum*. 2012 Jun; 55(6): 653-9.
126. Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE, Wruble LD. Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. *Gastroenterology*. 1985;89: 328–336.
127. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, et al. The molecular basis of Turcot’s syndrome. *N Engl J Med*. 1995; 332:839-47.
128. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352:1851-1860.
129. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35): 5783-8.
130. Harris GJ, Church JM, Senagore AJ, Lavery IC, Hull TL, Strong SA, et al. Factors affecting local recurrence of colonic adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2002:1029-34.
131. Hawkins NJ, Tomlinson I, Meagher A, Ward RL. Microsatellite-stable diploid carcinoma: a biologically distinct and aggressive subset of sporadic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2001 Jan;84(2): 232-6.

132. Heitman SJ, Ronksley PE, Hilsden RJ, et al. Prevalence of adenomas and colorectal cancer in average risk individuals: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009; 7: 1272.
133. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*. 1998;391:184-7.
134. Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, et al. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol* 2003;162: 469-477.
135. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6870-6875.
136. Herzig DO, Buie WD, Weiser MR, et al. Clinical Practice Guidelines for the Surgical Treatment of Patients With Lynch Syndrome. *Dis Colon Rectum*. 2017;60:137-43.
137. Hotta T, Yamaue ,H. Laparoscopic surgery for Rectal Cancer. Review of published literature 2000- 2009. *Surg Today*. 2011;41: 1583–1591.
138. Hoskins JM, Ong PS, Keku TO, Galanko JA, Martin CF, Coleman CA, et al. Association of eleven common, low-penetrance colorectal cancer susceptibility genetic variants at six risk loci with clinical outcome. *PLoS One*. 2012;7(7):e41954.
139. Holleczeck B, Rossi S, Domenic A, Innos K, Minicozzi P, Francisci S, et al. EUROCORE-5 Working Group. On-going improvement and persistent differences in the survival for patients with colon and rectum cancer across Europe 1999-2007 ---- Results from the EUROCORE-5 study. *Eur J Cancer*. 2015; 51:2158-68.
140. Hveem TS, Merok MA, Pretorius ME, Novelli M, Bævre MS, Sjo OH, et al. Prognostic impact of genomic instability in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014 Apr 15;110(8):2159-64.
141. Iacopetta. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer*. 2002 Oct 10;101(5):403-8.
142. Ijspeert JEG, Bossuyt PM, Kuipers EJ, et al. Smoking status informs about the risk of advanced serrated polyps in a screening population. *Endosc Int Open*. 2016;4:E73-8.
143. Issa, JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec; 4(12): 988-93.

144. Jaap Bonjer H, Deijen CL, Abis G, Cuesta MA, Van der Pas M, de Langede E, Lacy AM, Bemelman WA, Andersson J, Angenete E, Rosenberg J, Fuerst A, et al. A Randomized trial of laparoscopic versus open surgery for rectal cancer. *N Engl J Med.* 2015 Apr 15; 372: 1324-1332
145. Jacobs D., Zhu R., Luo J. , Grisotti G. , Heller D. et al. Defining Early-Onset Colon and Rectal Cancers. *Front Oncol.* 2018 Nov 6; 8:504.
146. Jasperson KW, Thuy M. Vu, Angela L. Schwab, Deborah W Neklason, Miguel A. Rodriguez-Bigas, et al. Evaluating Lynch syndrome in very early onset colorectal cancer probanda without apparent polyposis. *Familial cancer* 2010; 9: 99-107.
147. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Heredity and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun; 138(6): 2044-2058.
148. Jass, JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50: 113-130.
149. Järvinen 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.
150. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011: 61:69.
151. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea A-M, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology.* 2007; 133:48-56.
152. Johnson V, Lipton LR, Cummings C, Eftekhari Sadat AT, Izatt L, Hodgson SV, et al. Analysis of somatic molecular changes, clinicopathological features family history and germline mutations in colorectal cancer families evidence for efficient diagnosis of HNPCC and for the existence of distinct group of non HNPCC families. *J Med Genet* 2005; 42: 756-762.
153. Jover R, Payá A. Microsatellite instability in colorectal cancer: concept, detection methods and clinical utility. *Gastroenterol Hepatol.* 2003 Dec;26(10):656-63.
154. Kakar S, Deng G, Sahai V, et al. Clinicopathologic characteristics, CpG island methylator phenotype, and BRAF mutations in microsatellite- stable colorectal cancers without chromosomal instability. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(6): 958-64.

155. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 Aug; 10(4):231-43.
156. Kambara T, Matsubara N, Nakagawa H, et al. High frequency of low-level microsatellite instability in early colorectal cancer. *Cancer Res*. 2001; 61: 7743-7746
157. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997;57(5):808–811.
158. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2015; 181:832-45.
159. Karahan B, Argon A, Yildirim M, Vardar E1. Relationship between MLH-1, MSH-2, PMS-2, MSH-6 expression and clinicopathological features in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Apr 1;8(4):4044-53.
160. Kastrinos F, Steyerberg EW, Balmaña J, Mercado R, Gallinger S, Haile R, et al. Comparison of the clinical prediction model PREMM1,2,6 and molecular testing for the systematic identification of Lynch syndrome in colorectal cancer. *Gut*. 2013 Feb; 62 (2): 27.
161. Kastrinos F, Stoffel EM. History, genetics, and strategies for cancer prevention in Lynch syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12:715-27; quiz e41-3.
162. Kirzin S, Marisa L, Guimbaud R, De Reynies A, Legrain M, Laurent-Puig P, et al. Sporadic early-onset colorectal cancer is a specific sub-type of cancer: a morphological, molecular and genetics study. *PLoS One*. 2014 Aug 1;9(8):e103159.
163. Klarskov L, Holck S, Bernstein I, Nilbert M. Hereditary colorectal cancer diagnostics: morphological features of familial colorectal cancer type X versus Lynch syndrome. *Clin Pathol*. **2012** April; 65(4): 352-6.
164. Kocarnik JM, Shiovitz S, Phipps AI. Molecular phenotypes of colorectal cancer and potential clinical applications. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2015 Nov; 3(4): 269–276.
165. Konopke R, Roth J, Volk A, Pistorius S, Folprecht G, Zöphel K, Schuetze C, et al. Colorectal liver metastases: an update on palliative treatment options. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2012 Mar; 21(1): 83-91.
166. Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A, Peltomäki P. Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatelliteunstable colorectal cancers. *Am J Pathol*. 2000 May; 156(5):1773-9.

167. Kuppermann M, Wang G, Wong S, Blanco A, Conrad P, Nakagawa S, et al. Preferences for outcomes associated with decisions to undergo or forego genetic testing for Lynch syndrome. *Cancer*. 2013 Jan 1;119 (1):215-25.
168. Lacy AM, Delgado S, Castells A, Prins HA, Arroyo V, Ibarzabal A, et al. The longterm results of a randomized clinical trial of laparoscopy-assisted versus open surgery for colon cancer. *Ann Surg*. 2008 Jul; 248(1):1-7.
169. Ladabaum U, Ford JM, Martel M, et al. American Gastroenterological Association Technical Review on the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Gastroenterology*. 2015; 149:783e20-813.
170. Lam AK, Chan SS, Leung M. Synchronous colorectal cancer: clinical, pathological and molecular implications. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 14;20(22):6815-20.
171. Langner C, Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, et al. Mucinous differentiation in colorectal cancer--indicator of poor prognosis?. *Histopathology*. 2012 Jun;60(7):1060-72.
172. Lanza G, Gafa R, Maestri I, Santini A, Matteuzzi M, Cavazzini L. Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Mod Pathol* 2002; 15: 741-749.
173. Laurent S, Franchimont D, Coppens JP, et al. Familial adenomatous polyposis: clinical presentation, detection and surveillance. *Acta Gastroenterol Belg*. 2011 Sep;74(3):415- 20.
174. Lee GH, Malietzis G, Askari A, et al. Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? A systematic review. *Eur J Surg Oncol*. 2015; 41:300-8.
175. Lee JE, Chan AT. Fruit, vegetables, and folate: cultivating the evidence for cancer prevention. *Gastroenterology*. 2011;141:16.
176. Lee MS, McGuffey EJ, Morris JS, et al. Association of CpG island methylator phenotype and EREG/AREG methylation and expression in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016;114(12):1352–1361.
177. Leenders M, Siersema PD, Overvad K, et al. Subtypes of fruit and vegetables, variety in consumption and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2015; 137:2705-14.
178. Leroy J, Arenas M, Marescaux J. Total mesorectal excision by laparoscopy for rectal cancer. *Rev Gastroenterol Mex*. 2004 Aug; 69 Suppl 1:73-83.

179. Leroy J, Jamali F, Forbes L, Smith M, Rubino F, Mutter D, et al. Laparoscopic total mesorectal excision (TME) for rectal cancer surgery: long-term outcomes. *Surg Endosc.* 2004 Feb;18(2):281-9.
180. Li FY, Lai MD. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009 Mar; 10 (3) 219-29.
181. Li X, Yao X, Wang Y, Hu F, Wang F, Jiang L, et al. MLH1 Promoter Methylation Frequency in Colorectal Cancer Patients and Related Clinicopathological and Molecular Features. *PLoS One.* 2013;8(3):e59064.
182. Liang JT, Huang KC, Cheng AL, et al. Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *Br J Surg.* 2003; 90:205-14.
183. Liang J.; Kalady MF.; Church J. Young age of onset colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis* (2015) 30:1653–1657.
184. Limburg PJ, Harmsen WS, Chen HH, Gallinger S, Haile RW, Baron JA, et al. Prevalence of alterations in DNA mismatch repair genes in patients with young-onset colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011 Jun; 9 (6): 497-502.
185. Lin JT, Wang WS, Yen CC, Liu JH, Yang MH, Chao TC et al. Outcome of colorrectal carcinoma in patients under 40 years of age. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20: 900-905.
186. Lindberg LJ, Ladelund S, Frederiksen BL, et al. Outcome of 24 years national surveillance in different hereditary colorectal cancer subgroups leading to more individualised surveillance. *J Med Genet.* 2016.
187. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1043-1048.
188. Lindor, N.M., Rabe, K., Petersen, G.M, et al. Lower cancer incident in Amsterdam- I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *Jama.* 2005; 293:1979-1985.
189. Liu L, Zhuang W, Wang R-Q, et al. Is dietary fat associated with the risk of colorectal cancer? A meta-analysis of 13 prospective cohort studies. *Eur J Nutr.* 2011; 50:173-84.
190. Lledó, S. Guía clínica de Cirugía Colorrectal. Arán Ediciones S.A., 2000.

191. Loomans-Kropp HA.; Umar A. Increasing Incidence of Colorectal Cancer in Young Adults *Journal of Cancer Epidemiology*, vol. 2019, Article ID 9841295,9 pages,2019.
192. López-Abente G, Ardanaz E, Torrella-Ramos A, et al. Changes in colorectal cáncer incidente and mortality trends in Spain. *Annals of Oncology*. 2010; 21 Supl 3.
193. Losi L, Di Gregorio C, Pedroni M, Ponti G, Roncucci L, Scarselli A, et al. Molecular genetic alterations and clinical features in early-onset colorectal carcinomas and their role for the recognition of hereditary cancer syndromes. *Am J Gastroenterol*. 2005 Oct;100(10): 2280-7.
194. Lu F-I, Niekerk DW van, Owen D, et al. Longitudinal outcome study of sessile serrated adenomas of the colorectum: an increased risk for subsequent right-sided colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34:927-34.
195. Lumsdaine CT., Liu-Smith F., Li X., A Zell J., Lu1Y. Increased incidence of early onset colorectal adenocarcinoma is accompanied by an increased incidence of rectal neuroendocrine tumors. *Am J Cancer Res* 2020;10(6):1888-1899.
196. Luo S, Li J-Y, Zhao L-N, et al. Diabetes mellitus increases the risk of colorectal neoplasia: an updated meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2016; 40:110-23.
197. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348:919-32.
198. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, et al. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009; 76:1-18.
199. Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ, Marcus J, Smyrk T, Fitzgibbons RJ, et al. Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum* 1988; 31: 439-444.
200. 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.
201. Macedo LT, da Costa Lima AB, Sasse AD. Addition of bevacizumab to first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis, with emphasis on chemotherapy subgroups. *BMC Cancer*. 2012 Mar; 13:12:89.
202. Mahdavinia M, Bishehsari F, Ansari R, et al. Family history of colorectal cancer in Iran. *BMC Cancer*. 2005; 5: 112.

203. Makec M, Jr, Mercier B, Mackova A, Miller PW, Hamosh A, Ferec C, et al. Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the CFTR gene. *Hum Mutat* 1997; 9: 136-147.
204. Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JK. Focus on colon cancer.
205. Martínez ME, Baron J a, Lieberman D a, et al. A Pooled Analysis of Advanced Colorectal Neoplasia Diagnoses After Colonoscopic Polypectomy. *Gastroenterology*. 2009;136:832-41.
206. Maul JS, Warner NR, Kuwada SK, Burt RW, Cannon-Allbright LA. Extracolonic cancers associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the Utah Population Database. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1591-6.
207. Mauri G., Sartore-Bianchi A; Russo A, Marsoni S., Bardelli A.; Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol*. 2019 Feb;13(2):109-131.
208. Mayrhofer M, Kultima HG, Birgisson H, Sundström M, Mathot L, Edlund K, et al. 1p36 deletion is a marker for tumour dissemination in microsatellite stable stage II-III colon cancer. *BMC Cancer*. 2014 Nov 24;14:872
209. McCashland TM, Brand R, Lyden E, de Garmo P, y CORI Research Project. Gender differences in colorectal polyps and tumors. *Am J Gastroenterol*. 2001 Mar; 96(3): 882- 6.
210. Mekenkamp LJ, Heesterbeek KJ, Koopman M, Tol J, Teerenstra S, Venderbosch S, et al. Mucinous adenocarcinomas: poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2012 Mar;48(4):501-9.
211. Melisa M, Ahmedin Jemal, Robert A. Smith, Elizabeth Ward. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009;59:366-378.
212. Menéndez P, Villarejo P, Padilla D, Menéndez JM, Rodríguez Montes JA. Epigenetics and colorectal cancer. *Cir Esp*. 2012 May; 90(5): 277-83.
213. Meredith KL, Hoffe SE, Shibata D. The Multidisciplinary management of rectal cancer. *Surg Clin North Am*. 2009 Feb;89(1) : 177-215.
214. Mino P, Baker K, Goswami R, et al. Extensive DNA methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis. *Gut*. 2006: 55:1467.
215. Mitry E, Benhamiche AM, Jouve J-L, Clinard F, Finn-Faivre C, Faivre J. Colorectal adenocarcinoma in patients under 45 years of age: comparison with older patients in a well-defined French population. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 380-387.

216. Molinari C, Ballardini M, Teodorani N, Giannini M, Zoli W, Emiliani E, et al. Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study. *Radiat Oncol*. 2011 Nov 18;6:161-18):382-7
217. Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*. 2010 Mar 15;2(3):151-8.
218. Moreira L, Balaguer F, Lindor N, et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA*. 2012;308:1555-65.
219. Mouradov D, Domingo E, Gibbs P, Jorissen RN, Li S, Soo PY, et al. Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations. *Am J Gastroenterol*. 2013 Nov;108(11):1785-93. *Nature reviews Cancer* 2002;2:65-70.
220. Mourra N, Zeitoun G, Buecher B, Finetti P, Lagarde A, Adelaide J, et al. High frequency of chromosome 14 deletion in early-onset colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007 Nov;50(11):1881-6.
221. Muller A, Giuffre G, Edmonston TB, Mathiak M, Roggendorf B, Heinmoller E, et al. Challenges and Pitfalls in HNPCC Screening by Microsatellite Analysis and Immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2004; 6 : 308-31.
222. Muller W, Burgart LJ, Krause-Paulus R, Thibodeau SN, Almeida M, Edmonston TB, 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* 200; 1: 87-92.
223. Muzny DM, Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **2012** Jul 18; 487(7407) : 330-7.
224. Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, Cullings HM, Takeda M, Kimura K, et al. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol*. 2004 Nov 15; 22(22): 4584-94.
225. Navarro M, Piulats JM. Seguimiento del cáncer colorrectal. *Cir Esp* 2003;73: 58-62.
226. Nawa T, Kato J, Kawamoto H, Okada H, Yamamoto H, Kohno H, Endo H, Shiratori Y. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient

- characteristics, cancer morphology and histology. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Mar; 23(3): 418-23.
227. Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdai HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2013 Summer;6(3):120-8.
228. Nielsen M, Morreau H, Vasen HFA, et al. MUTYH-associated polyposis (MAP). *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;79:1-16.
229. Nieminen TT, Abdel-Rahman WM, Ristimäki A, et al. BMPR1A mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency. *Gastroenterology*. 2011; 141:e23-6.
230. Nieminen TT, O'Donohue M-F, Wu Y, et al. Germline mutation of RPS20, encoding a ribosomal protein, causes predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma without DNA mismatch repair deficiency. *Gastroenterology*. 2014;147:595-8.e5.
231. Niessen RC, Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Hollema H, Ligtenberg MJ, et al. Identification of mismatch repair gene mutations in young patients with colorectal cancer and in patients with multiple tumours associated with hereditary non-polyposis colorectal. *Gut*. 2006 Dec; 55(12): 1781-8.
232. Nieuwenhuis MH, Mathus-Vliegen LM, Slors FJ, Griffioen G, Nagengast FM, Schouten WR, et al. Genotype-phenotype correlations as a guide in the management of familial adenomatous polyposis. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2007 Mar; (5)3: 374-8.
233. NIH consensus, conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990;264:1440-1450.
234. Norat T, Scoccianti C, Boutron-Ruault MC, Anderson A, Berrino F, Cecchini M, et al. European Code against Cancer 4th edition: Diet and cancer. *Cancer Epidemiol*. 2015 Jul 8. pii: S1877-7821(15)00070-3.
235. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(14): e128.
236. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96:1420.

237. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, et al. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 1990;98:371.
238. Ogino S and Goel, A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2008;10:13-27.
239. Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Weisenberger DJ, et al. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut* 2006; 55(7): 1000-1006.
240. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M, Fuchs CS. Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn* 2007;9: 305–14.
241. Oleg K. Glebov, Luz M. Rodriguez, Kenneth Nakahara, et al. Distinguishing Right from Left Colon by the Pattern of Gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 755-762.
242. Oliveira F, Napoli CC, Rossi BM, Toshiiko W, Aguilar S Jr, Monteiro EM, et al. Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) in Brazilian families: An analysis by Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. *Fam Cancer* 2004; 3: 41- 47.
243. Orsetti B, Selves J, Bascoul-Mollevis C, Lasorsa L, Gordien K, Bibeau F, et al. Impact of chromosomal instability on colorectal cancer progression and outcome. *BMC Cancer*. 2014 Feb 22;14:121.
244. Osorio I, Rueda D, Rodríguez Y, García JL, de la Cruz Vigo F, et al. Early-onset colorectal cancer: A separate subset of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 14; 20(46): 17288–17296.
245. Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, et al. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med*. 2009;11:42-65.
246. Parromore JB, Wei JP, Yeh KA. Colorectal cancer in patients under forty: presentation and outcome. *Am Surg* 1998; 64: 563-567.
247. Patel SS, Floyd A, Doorly MG, Ortega AE, Ault GT, Kaiser AM, et al. Current controversies in the management of colon cancer. *Curr Probl Surg* 2012 Jul;49(7):398-460.

248. Patel, S.G.; Ahnen, D.J. Colorectal Cancer in the Young. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2018, 20, 15.
249. Peltomaki, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1174-79.
250. Perea J, Alvaro E, Rodríguez Y, Grávalos C, Sánchez- Tomé E, Rivera B et al. Approach to early- onset colorectal cancer: clinicopathological, familial, molecular and immunohistochemical characteristics. *World Gastroenterol* 2010 August 7;16(29): 3697-3703.
251. Perea J., Arribas J, Cañete A, García JL., Álvaro E., et al. Association of Polyps with Early-Onset Colorectal Cancer and Throughout Surveillance: Novel Clinica and Molecular Implications. *Cancers (Basel)*. 2019 Nov 29;11(12):1900.
252. Perea J, Justo I, Alvaro E, et al. Surgical management of hereditary colorectal cancer: surgery based on molecular analysis and family history. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009 Aug;101(8): 536-40.
253. Perea J, Rodríguez Y, Rueda D, Marín JC, Díaz-Tasende J, Álvaro E, et al. Early-onset colorectal cancer is an easy and effective tool to identify retrospectively Lynch syndrome. *Ann Surg Oncol.* 2011 Nov;18(12):3285-91.
254. Perea J, Rueda D, Canal A, Rodríguez Y, Alvaro E, Osorio I, et al. Age at onset should be a major criterion for subclassification of colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2014 Jan;16(1):116-26.
255. Pérez-Carbonell L, Ruiz-Ponte C, Guarinos C, Alenda C, Payá A, Brea A, et al. Comparison between universal molecular screening for Lynch syndrome and revised Bethesda guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer. *Gut.* 2012 Jun; 61(6): 865-72.
256. Pharoah P, Caldas C. Molecular genetics and the assessment of human cancers. *Expert reviews in molecular medicine.* 1999 March;11:1-19.
257. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology.* 2015 Jan;148(1):77-87.
258. Pickhardt PJ, Hassan C, Halligan S, et al. Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection: systematic review and meta-analysis. *Radiology.* 2011;259:393-405.

259. Pilarski R, Burt R, Kohlman W, et al. Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: systematic review and revised diagnostic criteria. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105:1607-16.
260. Pilozzi E., Lorenzon L., Lo Baido S., Ferri M., Duranti E., et al. Left-sided early onset colorectal carcinomas: A sporadic neoplasm with aggressive behavior *Am J Surg* . 2017 Sep;214(3):421-427.
261. Pilozzi E., Carmen Maresca C., Duranti E., Giustiniani MC., Catalanotto C, et al. Left-Sided Early-Onset vs Late-Onset Colorectal Carcinoma Histologic, Clinical, and Molecular Differences. *Am J Clin Pathol.* 2015 Mar;143(3):374-84
262. Pinheiro M, Pinto C, Peixoto A, Veiga I, Lopes P, Henrique R, et al. Target gene mutational pattern in Lynch syndrome colorectal carcinomas according to tumour location and germline mutation. *Br J Cancer.* 2015 Aug 11;113(4):686-92.
263. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):207-11.
264. Pino MS, Chung DC, et al. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138:2059-72.
265. Pinol V, Andreu M, Castells A, Paya A, Bessa X, Rodrigo J. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicentre, prospective, nationwide study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16: 39- 4.
266. Piso P, Dahlke MH, Mirena P, Schmidt U, Aselmann H, Schlitt HJ, et al. Total mesorectal excision for middle and lower rectal cancer: a single institution experience with 337 consecutive patients. *J Surg Oncol.* 2004 Jun 1; 86(3):115-21.
267. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 20; 23 (3): 609-18.
268. Pucciarelli S, Agostini M, Viel A, Bertorelle R, Russo V, Toppan P, et al. Early-age-onset colorectal cancer and microsatellite instability as markers of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2003 Mar; 46 (3): 305-12.
269. Qi Y, Stoddard D, Monson J R.T. Indications and Techniques of Transanal Endoscopic Microsurgery (TEMS). *J Gastrointest Surg.* 2011;15:1306-1308.
270. Raut CP, Pawlik TM, Rodríguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorrectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res.* 2004 Dec; 21(568)(2):275- 282.

271. Renehan AG, Tyson M, Egger M, et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008; 371:569.
272. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, et al. Serrated lesions of the colorectum: Review and recommendations from an expert panel. *The American journal of gastroenterology*. 2012 Sep; 107(9):1315-29.
273. Rhodes M, Bradburn DM. Overview of screening and management of familial adenomatous polyposis. *Gut*. 1992;33:125-31.
274. Rodríguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1758-62.
275. Rodríguez-Moranta F, Castells A, Andreu M, et al. Clinical performance of original and revised Bethesda guidelines for the identification of MSH2/MLH1 gene carriers in patients with newly diagnosed colorectal cancer: proposal of a new and simpler set of recommendations. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:1104-11.
276. Rodríguez-Soler M, Pérez-Carbonell L, Guarinos C, et al. Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation. *Gastroenterology*. 2013;144:926-32.e1; quiz e13-4.
277. Roig JV, Solama A, Alós R. Tratamiento quirúrgico y resultados del cáncer de colon. *Cir Esp*. 2003;73: 20-24.
278. Rosato V, Bosetti C, Levi F, Polesel J, Zucchetto A, Negri E, La Vecchia C. Risk factors for young-onset colorectal cancer. *Cancer Causes Control*. 2013 Feb; 24(2): 335-41.
279. Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med*. 1994;331:1694-702.
280. Sacchi M, Picozzi P, Di Legge P, Capuano L, Greco L, De Stefano M, et al. Virtual ileostomy following rectal cancer surgery: a good tool to avoid unusefull stomas? *Hepatogastroenterology*. 2011 Sep-Oct; 58(110-111): 1479-81.
281. Sacchi M, Picozzi P, Di Legge P, Capuano L, Greco L, De Stefano M, et al. Virtual ileostomy following rectal cancer surgery: a good tool to avoid unusefull stomas? *Hepatogastroenterology*. 2011 Sep-Oct; 58(110-111): 1479-81.
282. Saini SD, Kim HM, Schoenfeld P. Incidence of advanced adenomas at surveillance colonoscopy in patients with a personal history of colon adenomas: a meta-analysis and systematic review. *Gastrointest Endosc*. 2006;64:614-26.

283. Salahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A. Microsatellite Instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* 2001; 81: 535-541.
284. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Stud Group. *N Engl J Med*. 2000 Sep 28; 343(13): 905-14.
285. Samowitz W, Albertsen H, Herrick J, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype (CIMP) in colon cancer. *Gastroenterology*. 2005;121:837-45.
286. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M, et al. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology*. 2001 Oct;121(4): 830-8.
287. Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, et al. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981–2012. *Annals of Oncology*. 2010; 21 Supl 3.
288. Savas N, Dagli U, Akbulut S, et al. Colorectal cancer localization in young patients: should we expand the screening program? *Dig Dis Sci*. 2007; 52: 798-802.
289. Sawada T, Muto T. Role of upper gastrointestinal surveillance in patients with familial adenomatous polyposis. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 1997;7:99-111.
290. Scheer A, Auer RA. Surveillance after curative resection of colorectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009 Nov; 22(4):242-50.
291. Schneider NI, Langner C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. *Cancer Manag Res*. 2014 Jul 2;6:291-300.
292. Schoen RE. The case for population-based screening for colorectal cancer.
293. Schulz E, Klampfl P, Holzapfel S, et al. Germline variants in the SEMA4A gene predispose to familial colorectal cancer type X. *Nat Commun*. 2014;5:5191.
294. Segura PP, Fombella JP, Lorenzo BP, Martín MR, Lopez PG; Spanish Society for Medical Oncology. SEOM guide to primary and secondary prevention of cancer: 2014. *Clin Transl Oncol*. 2014 Dec;16(12):1072-8.
295. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:18654–9.
296. Shiovitz S, Copeland WK, Passarelli MN, Burnett-Hartman AN, Grady WM, Potter JD, et al. Characterisation of familial colorectal cancer Type X, Lynch

- syndrome, and non-familial colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014 Jul 29;111(3):598-602.
297. Shiovitz S, Copeland WK, Passarelli MN, Burnett-Hartman AN, Grady WM, Potter JD, et al. Characterisation of familial colorectal cancer Type X, Lynch syndrome, and non-familial colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014 Jul 29;111(3):598-602.
298. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 64:104-17.
299. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011;61:212-36.
300. Siegel RL, Jermal A and Ward EM. Increase in incidence of colorectal cancer among young men and women in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(6):1695-8.
301. Siegel R., Torre LA., Soerjomataram S., Hayes R.; Bray F.; Weber T., Jemal A. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. *Gut*. 2019 Dec;68(12):2179-2185.
302. Silver A, Sengupta N, Propper D, Wilson P, Hagemann T, Patel A, et al. A distinct DNA methylation profile associated with microsatellite and chromosomal stable sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer*. 2012; 130:1082-1092.
303. Smith RA, von Eschenbach AC, Wender R, et al. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. Also: update 2001--testing for early lung cancer detection. *CA: a cancer journal for clinicians* 2001;51:38-75; quiz 7-80.
304. Snaebjornsson P, Jonasson L, Jonsson T, Möller PH, Theodors A, Jonasson JG. Colon cancer in Iceland- a nationwide comparative study on various pathology parameters with respect to right and left tumor location and patients' *J Cancer* 2010; 127: 2645-53.
305. Snover DC, Ahnen DJ, Burt RW, et al. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis. En: Bosman ST, Carneiro F, Hruban RH TN (eds.). *WHO Classification of tumours of the digestive system*. Lyon: IARC; 2010. p. 160-5
306. Snover DC. Update on serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2011 Jan;42(1):1-10.

307. Song YK, Park YS, Seon CS, Lim HJ, Son BK, Ahn SB, et al. Alcohol drinking increased the risk of advanced colorectal adenomas. *Intest Res.* 2015 Jan;13(1):74-9.
308. Steinhagen E, Shia J, Markowitz AJ, Stadler ZK, Salo-Mullen EE, Zheng J, et al. Systematic immunohistochemistry screening for Lynch syndrome in early age-of-onset colorectal cancer patients undergoing surgical resection. *J Am Coll Surg.* 2012 Jan; 214(1): 61.
309. Stevenson A., Solomon MJ, Lumley JW., Hewett P., Clouston AD., Gebiski VJ., Davies L., Wilson. K, Hague W., Simes J., et al. Effect of laparoscopic- assisted resection versus open resection on pathological outcomes in rectal cancer. The ALaCaRT randomized clinical trial. *JAMA.* 2015 Oct 6; 314(13): 1356-1363.
310. Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Diodoro M, Casini B, Sperduti I, et al. Early-onset colorectal cancer patients without family history are “at very low risk” for lynch syndrome. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014 Jan 2;33:1.
311. Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Anti M. Early-onset colorectal cancer: a sporadic or inherited disease? *World J Gastroenterol.* 2014 Sep 21;20(35):12420-30.
312. Stone JG, Robertson D, Houlston RS. Immunohistochemistry for MSH2 and MHL1: a method for identifying mismatch repair deficient colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2001; 54: 484-487.
313. Strum W; Boland R. Characterization and Identification of Colorectal Cancer in Persons Younger Than 50 Years. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2019; 17:2600–2602
314. Sutter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple-cancers. *Nat Genet* 2004; 36: 497-501.
315. Syngal S, Brand RE, Church JM, et al. ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol.* 2015;110:223- 62; quiz 263
316. Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet.* 2004 May;36(5):497-501.
317. Suzuki O.; Eguch H.; Chik N.; Sakimoto T., Ishibashi K., et al. Prevalence and clinicopathologic/molecular characteristics of mismatch repair-deficient colorectal cancer in the under-50-year-old Japanese population. *Surg Today* (2017) 47:1135–1146

318. Tamas, K.; Walenkamp, A.M.; de Vries, E.G.; van Vugt, M.A.; Beets-Tan, R.G.; van Etten, B.; de Groot, D.J.; Hospers, G.A. Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treat. Rev.* 2015, 41, 671–679
319. Tang R, Changchien CR, Wu MC, Fan CW, Liu KW, Chen JS, et al. Colorectal cáncer without high microsatellite instability and chromosomal instability- an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2004;25:81-6.
320. Targarona EM, Ortiz H. El final del principio: cirugía laparoscópica del cáncer de colon. *Cir Esp.* 2004;76 (4): 201-2.
321. Tattini L, D'Aurizio R, Magi A. Detection of Genomic Structural Variants from Next-Generation Sequencing Data. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015 Jun 25;3:92.
322. Tejpar S, Odze ,RD. Accomplishments in 2008 in Biologic Markers for Gastrointestinal Cancers-Focus on Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2009 Sep-Oct; 3(5 Suppl 2): S73–S78.
323. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Evaluation of consumption of red meat and processed meat. *IARC Monographs.* 2015;114.
324. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Forman D, Bray F, Brewster DH, et al. (eds.). *Cancer Incidence in Five Continents Vol. X.* IARC Scientific Publications. 2014;164.
325. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993 May 7;260(5109):816-9.
326. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Feb 18;96(4):261-8.
327. Valle, L., Perea, J., Carbonell, P., et al. Clinicopathologic and Pedigree differences in Amsterdam I- Positive Hereditary Nompolyposis Colorectal Cancer Familias According to Tumor Microsatellite Instability Status. *J Clin Oncol.* 2007; 25:781-786.
328. Van Cutsem E., Cervantes A, Nordlinger B., Arnold D. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Gastro. Cancers.* Volume 25, Supplement 3, III1-III9, 2014.
329. Van Rinjsoever M, Grieu F, Eisaleh H et al. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation al multiple CpG islands. *Gut.* 2002;51: 797-802.

330. van Roon EH, van Puijenbroek M, Middeldorp A, van Eijk R, de Meijer EJ, Erasmus D, et al. Early onset MSI-H colon cancer with MLH1 promoter methylation, ¿is there a genetic predisposition? *BMC Cancer*. 2010 May 5;10: 180.
331. Vasen HF, Möslein G, Alonso A, et al. Guidelines for the clinical management of Familial Adenomatous Polyposis (FAP). *Gut*. 2008;57:704-13.
332. Vasen HF, Nagengast FM, Khan PM. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet (London)*. 1995;345:1183-4.
333. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1453-6.
334. Vasen, HF et al. One to 2-year surveillance intervals reduce risk of colorectal cancer in families with Lynch syndrome. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(7):2300-6.
335. Vasen, HF. Review article: The Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Dec; 26 Suppl 2:113-26.
336. Vieira AR, Abar L, Chan DSM, et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann Oncol*. 2017;28:1788-802.
337. Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G, Loda M, Garber J, Syngal S, 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: 3485-349.
338. Wang H, Haiman CA, Burnett T, Fortini BK, Kolonel LN, Henderson BE, et al. Fine-mapping of genome-wide association study-identified risk loci for colorectal cancer in African Americans. *Hum Mol Genet*. 2013 Dec 15;22(24):5048-55.
339. Wang R, Wang MJ, Ping J. Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Colorectal Cancer in Young Versus Elderly: A Population-Based Cohort Study of SEER 9 Registries Data (1988-2011). *Medicine (Baltimore)*. 2015 Sep;94(35):e1402.
340. Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J Cancer* 2003;103: 636-641.
341. Watson P, Vasen HFA, Mecklin J-P, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer*. 2008; 123:444-9.
342. Wei C, Peng B, Han Y, et al. Mutations of HNRNPA0 and WIF1 predispose members of a large family to multiple cancers. *Fam Cancer*. 2015; 14:297-306.

343. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer *Nat Genet* 2006; 38(7): 787-93.
344. Wijnen J, Khan PM, Vasen H, Menko F, van der Klift H, van den Broek M, et al. Majority of hMLH1 mutations responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer cluster at the exonic region 15-16. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 300-307.
345. Wijnen J, Vasen H, Khan PM, Menko FH, van der Klift H, van Leeuwen C, et al. Seven new mutations in hMSH2, an HNPCC gene, identified by denaturing gradient gel electrophoresis. *Am Hum Genet* 1995; 56: 1060-1066.
346. 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.
347. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gouttlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):1977-81.
348. Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimarães DP. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 14;20(10):2634-40.
349. Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, Nishihara R, et al. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut*. 2012 Jun;61(6):847-54.
350. Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK, Rennert H, Pirog EC, Banner BF, Chen YT. Clinical, pathologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2009 Apr; 33(4): 572-82.
351. Yang S., Cho M & Kim N. Difference between right-sided and left-sided colorectal cancers: from embryology to molecular subtype. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018 Apr;18(4):351-358.
352. Yeo H., Betel D, Abelson J., Zheng X., Yantiss R., Shah M. Early-onset Colorectal Cancer is Distinct from Traditional Colorectal Cancer *Clinical Colorectal Cancer*, Vol. 16, No. 4, 293-9^a 2017.
353. Yeo SA, Chew MH, Koh PK, Tang CL. Young colorectal carcinoma patients do not have a poorer prognosis: a comparative review of 2,426 cases. *Tech Coloproctol*. 2013 Mar 5.

354. Yi JM, Kim TO. Epigenetic alterations in inflammatory bowel disease and cancer. *Intest Res.* 2015 Apr;13(2):112-21.
355. Yiu R, Qui H, Lee SH et al. Mechanisms of microsatellite instability in colorectal cancer patients in diferente age group. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 2061-2069.
356. You YN, Dozois EJ, Boardman LA, Aakre J, Huebner M, Larson DW. Young-onset rectal cancer: presentation, pattern of care and long-term oncologic outcomes compared to a matched older-onset cohort. *Ann Surg Oncol.* 2011 Sep; 18(9): 2469-76.
357. Young JP, Win AK, Rosty C, Flight I, Roder D, Young GP, et al. Rising incidence of early-onset colorectal cancer in Australia over two decades: report and review. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015 Jan;30(1):6-13.
358. Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2014 Sep 18;513(7518):382-7.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

Finalidad y descripción del proceso

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

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

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

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

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

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

Carácter altruista de la donación

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

Protección de datos y confidencialidad

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

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

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

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

Información sobre resultados del estudio

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

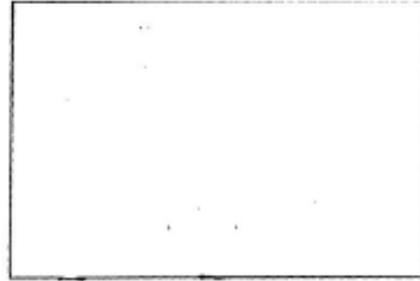
Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser tanto clínica como genéticamente relevantes para Ud e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así Ud lo estima oportuno. Un facultativo del Hospital 12 de Octubre se compromete a ofrecerle consejo genético, una vez obtenidos y evaluados los resultados del estudio. Asimismo, podría obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a Ud decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de esta hoja.

La muestra

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

Le Agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento del cáncer.

DATOS DEL PACIENTE	
<i>Apellidos</i>	
<i>Nombre</i>	
<i>Dirección</i>	
DNI	<i>Nº historia clínica</i>
<i>Autoriza la comunicación de la información relevante derivada de la investigación</i>	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
<i>Firma</i>	<i>Fecha</i>
<i>Manifiesto que he recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas</i>	



CONSENTIMIENTO INFORMADO

D.N.I. del paciente: _____

Fecha: ____/____/____

Nombre del Médico que informa: _____

Nº Colegiado: _____

UNIDAD DE CÁNCER FAMILIAR. ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS PREDISONENTES A CÁNCER DE COLON NO ASOCIADO A POLIPOSIS (CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO POLIPÓSICO)

En la mayoría de las ocasiones el cáncer de colon se presenta con carácter esporádico. Existen algunas familias en las que se observa que el número de casos es superior a lo que cabría esperar en la población general, sin que ello se acompañe de poliposis intestinal y acompañados de una elevada incidencia de tumores como el de estómago, vías biliares, endometrio u ovario entre otros. Estudios recientes han puesto de manifiesto que algunas de estas familias presentan mutaciones en alguno de sus genes que son los responsables de este hecho.

Estas mutaciones se transmiten de padres a hijos, igual que se transmiten otros caracteres físicos (como, por ejemplo, el color del pelo) y su presencia supone un aumento del riesgo de desarrollar a lo largo de la vida un cáncer de colon, recto, endometrio y en menor medida de otros tumores como los mencionados anteriormente.

La presencia de una de las mutaciones citadas en una persona no significa que se tenga la certeza absoluta de que este individuo vaya a desarrollar este tipo de tumor, únicamente indica que existe un riesgo mayor al de la población general.

Por el contrario, la ausencia de dicha mutación no puede garantizar la no aparición del cáncer, puesto que es posible que existan otras mutaciones hoy en día desconocidas y que por lo tanto no pueden ser estudiadas o simplemente que no hayan sido detectadas y por otro lado siempre persiste el riesgo de desarrollar un cáncer de forma esporádica (no hereditario).

Su caso ha sido valorado por una Unidad de Consejo Genético en Cáncer Familiar que, a la vista de sus antecedentes familiares, ha considerado la posibilidad de proceder a un estudio molecular con el fin de determinar si posee alguna alteración genética de las que hoy en día conocemos como responsables del "Síndrome de Cáncer de Colon Hereditario no Polipósico".

El análisis se realiza sobre una muestra de sangre extraída a tal efecto una vez otorgado el consentimiento, valorándose de forma exclusiva factores genéticos relacionados con este síndrome sin que pueda ser utilizada para otros fines ni para estudiar otros aspectos que no sean los relacionados con este tipo de tumores. En ocasiones y previo al estudio de mutaciones en sangre debe procederse a un estudio del tejido tumoral para lo cual puede ser preciso solicitar muestras de tejido al servicio de Anatomía patológica correspondiente.

La información sobre los resultados es estrictamente confidencial y únicamente será facilitada a la persona estudiada y a quienes ella nos autorice por escrito. Estos datos quedarán bajo la custodia de la Unidad de Consejo Genético que le atiende, sin que consten en su historial clínico y no podrán ser cedidos a ninguna entidad o persona sin su autorización expresa. Los datos podrán ser utilizados con el fin de realizar estudios epidemiológicos, garantizando en todo momento el anonimato. Si, no obstante lo anteriormente expuesto, en algún momento usted decide que esta información sea destruida, podrá solicitarlo por escrito a la persona responsable de la Unidad que le ha estudiado.

Si su análisis genético es negativo, es decir, no se encuentra ningún tipo de mutación que suponga especial predisposición al cáncer, se le indicarán cuáles son las medidas de prevención a tomar y que dependerán de la existencia o no de casos de portadores de la mutación conocidos en su familia.

Si su análisis genético es positivo se le informará sobre el riesgo existente, así como de las alternativas de prevención disponibles en la actualidad.

En ocasiones se puede obtener un resultado que denominamos no informativo. Este tipo de resultados implica que no se conoce en la actualidad las repercusiones que ciertas alteraciones detectadas puede tener sobre el riesgo de padecer cáncer de colon.

Continúa al dorso

04 554

Cuando la existencia de la mutación en la familia ha sido confirmada, debe saber que otros miembros de su familia pueden haberla heredado: de usted (en caso de sus descendientes) o de sus antepasados (en caso de otros familiares como tíos o primos). La Unidad de Consejo Genético en ningún caso contactará con ellos por propia iniciativa para advertirles de esta circunstancia, ya que esta información es estrictamente confidencial. Es decisión personal suya informar a dichos familiares con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cuál es su riesgo individual con respecto a estos tumores.

De igual manera debe conocer que este tipo de pruebas pueden repercutir en su estado emocional y/o psicológico, tanto positiva como negativamente.

Si usted decide que no desea realizarse un estudio genético, sepa que su decisión será respetada en todo momento y recibirá el asesoramiento genético apropiado a su caso. De igual manera debe saber que existen modelos teóricos que permiten conocer de manera aproximada su riesgo de padecer determinados tipos de cáncer, los cuales podrían aplicársele si no desea realizarse este tipo de test.

Comentarios del médico que informa: _____

AUTORIZACIÓN

Yo, _____, he sido informado oralmente y por escrito sobre las características, beneficios y problemas que plantea el estudio genético en el cáncer.

He comprendido esta información y cualquier duda surgida me ha sido aclarada por el médico.

Por lo anterior **OTORGO MI CONSENTIMIENTO** para que se proceda al estudio de factores genéticos predisponentes al cáncer sobre una muestra de sangre que me será extraída a tal efecto y análisis de tejido tumoral si ello fuera necesario.

Firma
Fecha:

Firma tutor (caso de menor o incapacitado legalmente)
Fecha:

Firma Médico
Fecha:

Autorizo para que las personas abajo indicadas puedan ser informadas sobre los resultados del estudio realizado.

Nombre _____ TF _____
Nombre _____ TF _____
Nombre _____ TF _____
Nombre _____ TF _____

Fdo.: D. /D^a

Fecha:

REVOCACIÓN

En ejercicio del derecho que tengo de anular el consentimiento prestado manifiesto mi voluntad de revocarlo y solicito se proceda a la destrucción de las muestras sanguíneas extraídas y de la información de ellas obtenida.

ANEXO 2

Información adicional referente al estudio molecular de los genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6)

ANEXO 2A. Cebadores y condiciones de desnaturalización para el gen MLH1			
Exón <i>MLH1</i>	Cebadores	Tamaño (Bp)	Gradiente desnaturalizante
1	(M13) 5'- AGACGTTTCCTTGGCTCTTC - 3' (Pinza CG) 5'- CCGTTAAGTCGTAGCCCTTA - 3'	257	50-70%
2	(Pinza CG) 5'- TTTTCTGTTTGATTGCCAG - 3' (M13) 5'- CGCACAAACATCCTGCTACT - 3'	210	30-50%
3	(Pinza CG) 5'- TGGAAAAATGAGTAACATGATT - 3' (M13) 5'- CAACAGGAGGATATTTTACACA - 3'	255	30-50%
4	(Pinza CG) 5'- TTCCTTTTTCTTTCAGTCTATTT - 3' (M13) 5'- TGAATATATATGAGTAAAAGAAGTCAG - 3'	207	30-50%
5	(Pinza CG) 5'- TCTCTCTACTGGATATTAATTTGT - 3' (M13) 5'- AAGCTTCAACAATTTACTCTCC - 3'	214	30-50%
6	(M13) 5'- CAAGAAAAATCAATCTTCTGTT - 3' (Pinza CG) 5'- ATGACAAATCTCAGAGACCC - 3'	223	30-50%
7	(M13) 5'- TCTAGTGTGTGTTTTTGGCA - 3' (Pinza CG) 5'- AACAAAACCATCCCCATAA - 3'	194	30-50%
8	(M13) 5'- AATCCTTGTGTCTTCTGCTG - 3' (Pinza CG) 5'- AAAGATTTTTTATATAGGTTATCG - 3'	217	30-50%
9	(M13) 5'- CAAAAGCTTCAGAATCTCTTT - 3' (Pinza CG) 5'- TTTCCCATGTGGTTCTTTTT - 3'	233	30-50%
10	(M13) 5'- GGACAGTTTTGAACTGAGTTG - 3' (Pinza CG) 5'- GTCTTGGTTGAGGAGTTTGG - 3'	227	30-50%
11	(M13) 5'- AAGGTAATTGTCTCTTATTTT - 3' (Pinza CG) 5'- CACAAGTAGCTGGATGAGAA - 3'	280	30-50%
12	(Pinza CG) 5'- TAATACAGACTTTGCTACCAGGA - 3' (M13) 5'- GGTAGGCTGTACTTTTCCCA - 3'	473	30-50%
13	(Pinza CG) 5'- CTGCACTTCCTTTTCTTCAT - 3' (M13) 5'- CCCTATGCATCCAGGCA - 3'	270	30-50%
14	(Pinza CG) 5'- TGTTTTTTGGTTTTATTTTTTG - 3' (M13) 5'- TCTGCTTGTTTACACACTCA - 3'	232	30-50%
15	(Pinza CG) 5'- AATTCAGCTTTTCCTTAAAGTC - 3' (M13) 5'- AAATTCAGAAGTGAAAAGGA - 3'	200	30-50%
16	(M13) 5'- CTCCTTCATGTTCTTGCTTC - 3' (Pinza CG) 5'- AGAAGTATAAGAATGGCTGTCA - 3'	280	30-50%
17	(Pinza CG) 5'- TTCCCTTGTCTTTTTCCTG - 3' (M13) 5'- CATGTACCGAATGCTTAGTA - 3'	222	30-50%
18	(Pinza CG) 5'- TAAATTCGTACCTATTTTGAGG - 3' (M13) 5'- CCTGGGGTGCCAGTGTGCAT - 3'	251	15-30%
19	(M13) 5'- GGAGGCTTATGACATCTAATG - 3' (Pinza CG) 5'- AAGAACACATCCCACAGTGC - 3'	300	30-50%

ANEXO 2A.

Cebadores y condiciones de desnaturalización empleadas en la amplificación e identificación del estado mutacional del gen *MLH1* (modificado de Wijnen *et al.* 1995 y Wijnen *et al.* 1996).

La "Pinza CG" (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCC-3') se une en el extremo 5' de un cebador y estabiliza el ADN. La secuencia M13 (5'-GCCAGTCGACGTTGTAAAACGACG-3') se une al otro cebador y ejerce de molde para la secuenciación de aquellos fragmentos con patrones anómalos de migración. Bp= pares de bases

ANEXO 2B. Cebadores y condiciones de desnaturalización para el gen MSH2

Exón <i>MSH2</i>	Cebadores	Tamaño (Bp)	Gradiente desnaturalización
1	(M13) 5'- TCGCGCATTTTCTTCAACC - 3' (Pinza CG) 5'- GTCCCTCCCCAGCACGC - 3'	277	50-70%
2	(Pinza CG) 5'- TTGAACATGTAATATCTCAAATCTGT - 3' (M13) 5'- AAAGGAAGATAATTACCTTATATGC - 3'	283	15-50%
3	(M13) 5'- TCAAGAGTTTGTAAATTTTTAAAA - 3' (Pinza CG) 5'- CTAGGCCTGGAATCTCCTCT - 3'	421	30-50%
4	(Pinza CG) 5'- TTCCTTTTCTCATAGTAGTTTAAAC - 3' (M13) 5'- TTGTAATTCACATTTATAATCCATG - 3'	280	15-50%
5	(M13) 5'- CCAGATGGTATAGAAATCTTCG - 3' (Pinza CG) 5'- CCATTC AACATTTTTAACCCCTT - 3'	308	15-30%
6	(M13) 5'- GCTTGCCATTCTTTCTATTTTATT - 3' (Pinza CG) 5'- GCAGGTTACATAAAACTAACGAAAG - 3'	277	30-50%
7	(M13) 5'- CATTAATTCAAGTTAATTTATTC A - 3' (Pinza CG) 5'- AAAACAAAATCACTTGTACCTTCA - 3'	309	30-50%
8	(M13) 5'- TGAGATCTTTTTATTTGTTTGT - 3' (Pinza CG) 5'- TTTGCTTTTTAAAAATAACTACTGC - 3'	263	15-50%
9	(M13) 5'- GGATTTTGTCACTTGTCTGTT - 3' (Pinza CG) 5'- TCCAACCTCCAATGACCCAT - 3'	241	30-50%
10	(M13) 5'- TGGAATACTTTTCTTTTCTTCTT - 3' (Pinza CG) 5'- GCATTTAGGGAATTAATAAAGGG - 3'	298	30-40%
11	(Pinza CG) 5'- ATAAAAGTGTATTTTCGATTTGCA - 3' (M13) 5'- CCAGGTGACATTCAGAACATT - 3'	227	30-50%
12	(Pinza CG) 5'- TTATTATTCAGTATTCCTGTGTACA - 3' (M13) 5'- CCCACAAGCCCCAAAACC - 3'	388	30-50%
13	(Pinza CG) 5'- ATAATTTGTTTTGTAGGCCCC - 3' (M13) 5'- TTTCTATCTTCAAGGGACTAGGAG - 3'	318	30-50%
14	(Pinza CG) 5'- CCACATTTTATGTGATGGGAA - 3' (M13) 5'- CCAATAGTACATACCTTTCTTCACC - 3'	370	30-50%
15	(M13) 5'- GTCCCCTCACGCTTCCC - 3' (Pinza CG) 5'- AA ACTATGAAAACAACTGACAAAC - 3	295	30-50%
16	(M13) 5'- AATGGGACATTCACATGTGTT - 3' (Pinza CG) 5'- CCATGGGCACTGACAGTTAA - 3'	369	15-30%

ANEXO 2B.

Cebadores y condiciones de desnaturalización empleadas en la amplificación e identificación del estado mutacional del gen *MSH2* (modificado de Wijnen *et al.* 1995 y Wijnen *et al.* 1996).

La "Pinza CG" (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCC-3') se une en el extremo 5' de un cebador y estabiliza el ADN.

La secuencia M13 (5'-GCCAGTCGACGTTGTAAAACGACG-3') se une al otro cebador y ejerce de molde para la secuenciación de aquellos fragmentos con patrones anómalos de migración.

Bp= pares de bases.

ANEXO 2C. Sondas para la detección de grandes reordenamientos en los genes <i>MLH1</i> Y <i>MSH2</i>				
Longitud (nucleótidos)	Sonda MLPA	Localización cromosómica		
		Control	MLH1	MSH2
94	Sonda control sintética	2q14		
130	Sonda control 0797-L0463	5q31		
136	Sonda control 0981-L0566	10p11		
142	Sonda <i>MLH1</i> 0886-L0474		Exón1	
148	Sonda <i>MSH2</i> 1027-L0599			Exón 1
154	Sonda <i>MLH1</i> 1008-L0577		Exón 2	
160	Sonda <i>MSH2</i> 0906-L0494			Exón 2
166	Sonda <i>MLH1</i> 0888-L0476		Exón 3	
172	Sonda <i>MSH2</i> 1029-L0601			Exón 3
178	Sonda <i>MLH1</i> 0889-L0477		Exón 4	
184	Sonda <i>MSH2</i> 0908-L0496			Exón 4
193	Sonda control 0976-L0563	11p13		
210	Sonda <i>MLH1</i> 0890-L0478		Exón 5	
211	Sonda <i>MSH2</i> 0909-L0497			Exón 5
220	Sonda <i>MLH1</i> 0891-L0479		Exón 6	
229	Sonda <i>MSH2</i> 0910-L0498			Exón 6
238	Sonda <i>MLH1</i> 0892-L0480		Exón 7	
247	Sonda <i>MSH2</i> 0911-L0499			Exón 7
256	Sonda <i>MLH1</i> 0893-L0481		Exón 8	
265	Sonda <i>MSH2</i> 0912-L0582			Exón 8
274	Sonda <i>MLH1</i> 0894-L0482		Exón 9	
283	Sonda control 0438-L0003	17q21		
292	Sonda <i>MSH2</i> 0913-L0583			Exón 9
301	Sonda <i>MLH1</i> 0895-L0483		Exón 10	
310	Sonda <i>MSH2</i> 0914-L0584			Exón 10
319	Sonda <i>MLH1</i> 0896-L0484		Exón 11	
328	Sonda <i>MSH2</i> 0915-L0503			Exón 11
337	Sonda <i>MLH1</i> 0897-L0485		Exón 12	
346	Sonda <i>MSH2</i> 0916-L0504			Exón 12
355	Sonda <i>MLH1</i> 0898-L0486		Exón 13	
364	Sonda <i>MSH2</i> 1013-L0575			Exón 13
373	Sonda control 0681-L0154	4q25		
382	Sonda <i>MLH1</i> 0899-L0586		Exón 14	
391	Sonda <i>MSH2</i> 0918-L0506			Exón 14
400	Sonda <i>MLH1</i> 0900-0488		Exón 15	
409	Sonda <i>MSH2</i> 0919-L0585			Exón 15
418	Sonda <i>MLH1</i> 1009-L0576		Exón 16	
427	Sonda <i>MSH2</i> 1053-L0627			Exón 16
436	Sonda <i>MLH1</i> 1030-L0602		Exón 17	
445	Sonda <i>MLH1</i> 1031-L0603		Exón 18	
454	Sonda <i>MLH1</i> 0904-L0492		Exón 19	
463	Sonda control 0979-L0568	10p14		
472	Sonda control 0980-L0567	11p12		

ANEXO 2C.

Sondas que componen el reactivo comercial *Salsa MLPA Kit P003-B1 MLH1/MSH2* (MRC-Holland, Ámsterdam, Holanda) para la detección de grandes reordenamientos en los genes *MLH1* y *MSH2*.

ANEXO 2D. Cebadores y condiciones de desnaturalización para el gen MSH6					
Exón / Fragmento	Cebadores	Tamaño	Tiempos	T ^a PCR °C	T ^a dHPLC °C
1A	5'-TCCGTCCGACAGAACGGTTG-3' 5'-TTCGCGTGAGGCCCTGGCCGA-3'	129	Largo	55.0	66.0
1B	5'-CGCTGAGTGATGCCAACAAAG-3' 5'-CAACCCCCTGTGCGAGCCTC-3'	300	Largo	48.0	67.1
2	5'-AACTAAGTTATGTATTTCTC-3' 5'-CCTGTCTGTCTGTTTCTCTC-3'	300	Intermedio	55.0	59.4
3A	5'-GAACTGCTGGGATTACAGGC-3' 5'-GTATTTTCAGGCTTTGCACTG-3'	130	Corto	63.0	59.1
3B	5'-CCCAGAAGGGAGGTCATTTT-3' 5'-CCCCATCACCCCTAACATAAA-3'	200	Largo	55.0	58.6
4A	5'-CCAAATTTTGATTTGTTTTT-3' 5'-CCACATCAGAGCCACCAATG-3'	207	Largo	55.0	58.3
4B	5'-CGAAGGGTCATATCAGATTC-3' 5'-ATACCAAACAGTAGGGCGAC-3'	357	Largo	55.0	59.0
4C	5'-CGTTAGTGGAGGTGGTGATG-3' 5'-ATGAATACCAGCCCCGATTC-3'	303	Corto	55.0	58.4
4D	5'-CTGTACCACATGGATGCTCT-3' 5'-CTTCCTCTTTTCTTTGAGG-3'	304	Corto	48.0	58.5
4E	5'-CCTCTGAGAACTACAGTAAG-3' 5'-CCAAAACCTGGGAGCCGGGTA-3'	293	Corto	50.00	57.1
4F	5'-CTGTTCTCTTCAGGAAGGTC-3' 5'-AGCCATTGATAAAAAGCTCCT-3'	271	Corto	55.0	58.5
4G	5'-CCTCAAAAAATGCCTTATTG-3' 5'-AGCCATTGCTTTAGGAGCCG-3'	304	Corto	55.0	56.7
4H	5'-ACTTGCCATACTCCTTTTGG-3' 5'-TCCAGAGCAGAAAGAAAATC-3'	299	Corto	48.0	57.7
4I	5'-CTACATACAGCAAGAAGAAG-3' 5'-CCTGCTTTGGGAGTAATAAG-3'	253	Largo	55.0	56.0
4J	5'-GAAAAGGCTCGAAAGACTGG-3' 5'-TCGTTTACAGCCCTTCTGG-3'	230	Corto	45.0	59.1
4K	5'-GAAGAATACGACTTGAAATC-3' 5'-GCACTACTTATCAAAGCCTG-3'	244	Corto	46.0	57.6
5A	5'-AAAACCCCCAAACGATGAAG-3' 5'-GTCTTCGTAATGCAAGGATG-3'	220	Corto	60.0	59.2
5B	5'-CTTAGAGCTTAAAGGATCAC-3' 5'-CTTTCTGATAACAAAACCTT-3'	208	Largo	54.0	57.1
6	5'-CTTTATGAAACTGTTACTACC-3' 5'-GCAAATATCTTTTATCATAT-3'	237	Corto	50.0	56.6
7	5'-GAGTATTCATTTGTGATTTT-3' 5'-AAATGTTTTTAAGATAGTAGTCTTC-3'	171	Corto	50.0	53.7
8	5'-CCTTTTTTGTTTTAATTCCT-3' 5'-CAAGAGAAGTGCCCTCTCAA-3'	268	Corto	50.0	56.4
9	5'-TTTTGAGAGGGCACTTCTCT-3' 5'-CCCCTTTTACTGTTTCTTTG-3'	266	Corto	50.0	57.0
10	5'-ATTTTAAGGGAAGTTTGCC-3' 5'-GTTTATTAGATCATAATGTT-3'	165	Largo	50.0	57.4

ANEXO 2D.

Condiciones de PCR y temperaturas de desnaturalización empleadas para el análisis del estado mutacional del gen *MSH6*. Bp: pares de bases.

ANEXO 3

3A. Listado de las regiones cromosómicas recurrentemente alteradas (frecuencia de aparición superior o igual al 30%).

ANEXO 3. Regiones recurrentemente alteradas en población joven.							
Cromosoma	Inicio	Final	Región	% de tumores con el cambio	Tipo	Tamaño (Bp)	Tamaño (Mb)
Cr 1	37196	782738	p36.33-p36.33	61	Pérdida	745483	0,745483
Cr 1	1069258	13881396	p36.33-p36.21	37	Ganancia	12812079	12,812079
Cr 1	15108352	16661919	p36.21-p36.13	32	Ganancia	1553508	1,553508
Cr 1	16817704	16963439	p36.13-p36.13	32	Pérdida	145676	0,145676
Cr 1	17114814	17747165	p36.13-p36.13	32	Ganancia	632292	0,632292
Cr 1	18607784	29892192	p36.13-p35.3	40	Ganancia	11284349	11,284349
Cr 1	30990226	33667623	p35.2-p35.1	43	Ganancia	2677338	2,677338
Cr 1	33771675	34904712	p35.1-p34.3	45	Pérdida	1132978	1,132978
Cr 1	35048650	36838461	p34.3-p34.3	40	Ganancia	1789752	1,789752
Cr 1	37588531	38530532	p34.3-p34.3	37	Ganancia	941942	0,941942
Cr 1	38913069	46814154	p34.3-p33	33	Ganancia	7901026	7,901026
Cr 1	52436165	53470974	p32.3-p32.3	30	Ganancia	1034750	1,034750
Cr 1	53953959	54994847	p32.3-p32.3	30	Ganancia	1040829	1,040829
Cr 1	116942100	116995821	p13.1-p13.1	38	Pérdida	53662	0,053662
Cr 1	120374173	143940269	p12-q21.1	53	Pérdida	23566037	23,566037
Cr 1	120374173	144851227	p12-q21.1	53	Pérdida	24476995	24,476995
Cr 1	145938612	148063174	q21.1-q21.2	48	Pérdida	2124503	2,124503
Cr 1	148268162	149731681	q21.2-q21.2	32	Ganancia	1463460	1,463460
Cr 2	204242050	204362806	q32.1-q32.1	42	Pérdida	120697	0,120697

ANEXO 3 (Continuación)							
Cr 2	25548556	26169381	p23.3-p23.3	30	Ganancia	620766	0,620766
Cr 2	86992179	87880563	p11.2-p11.2	42	Pérdida	888325	0,888325
Cr 2	89097237	95026803	p11.2-q11.1	45	Pérdida	5929507	5,929507
Cr 2	95442924	96141467	q11.1-q11.1	38	Pérdida	698484	0,698484
Cr 2	96597568	96655261	q11.1-q11.1	31	Ganancia	57634	0,057634
Cr 2	97268528	97318329	q11.2-q11.2	30	Pérdida	49742	0,049742
Cr 2	109907480	111059561	q12.3-q13	38	Pérdida	1152022	1,152022
Cr 2	111673819	112349426	q13-q13	35	Pérdida	675548	0,675548
Cr 2	241124790	242593318	q37.3-q37.3	33	Ganancia	1468469	1,468469
Cr 2	242675900	242706350	q37.3-q37.3	30	Pérdida	30391	0,030391
Cr 3	46988350	53360302	p21.31-p21.1	43	Ganancia	6371893	6,371893
Cr 3	184208450	187278286	q27.1-q27.3	32	Ganancia	3069777	3,069777
Cr 3	195462986	195910873	q29-q29	30	Ganancia	447828	0,447828
Cr 3	196423015	199247786	q29-q29	33	Ganancia	2824712	2,824712
Cr 4	516875	2549964	p16.3-p16.3	30	Ganancia	2033030	2,033030
Cr 4	21974254	22047060	p14.3-p14.3	43	Pérdida	72747	0,072747
Cr 4	190717003	190873748	q35.2-q35.2	35	Pérdida	156686	0,156686
Cr 4	144953677	145283514	q31.21-q31.21	33	Pérdida	329778	0,329778
Cr 5	68788914	70779564	q13.2-q13.2	57	Pérdida	1990591	1,990591
Cr 5	108265110	108288190	q21.3-q21.3	30	Pérdida	23021	0,023021
Cr 5	113532250	115664852	q22.3-q23.1	30	Pérdida	2132543	2,132543
Cr 5	116282780	116305293	q23.1-q23.1	30	Pérdida	22454	0,022454
Cr 5	137638577	138153712	q31.2-q31.2	30	Ganancia	515076	0,515076
Cr 6	27321652	37954608	p22.1-p21.2	40	Ganancia	10632897	10,632897
Cr 6	41895635	42026044	p21.1-p21.1	30	Ganancia	130350	0,130350
Cr 6	42445767	44022710	p21.1-p21.1	30	Ganancia	1576884	1,576884
Cr 6	57375635	58809497	p11.2-p11.1	38	Pérdida	1433803	1,433803

ANEXO 3 (Continuación)							
Cr 7	130978	6815930	p22.3-p22.1	38	Ganancia	6684893	6,684893
Cr 7	56364350	64990998	p11.2-q11.21	30	Pérdida	8626589	8,626589
Cr 7	72022321	72363297	q11.22-q11.23	37	Pérdida	340917	0,340917
Cr 7	72382850	73733199	q11.23-q11.23	47	Ganancia	1350290	1,350290
Cr 7	73803410	74873342	q11.23-q11.23	35	Pérdida	1069873	1,069873
Cr 7	75016404	75943550	q11.23-q11.23	35	Ganancia	927087	0,927087
Cr 7	75945288	76692001	q11.23-q11.23	35	Pérdida	746654	0,746654
Cr 7	97306690	101857360	q21.3-q22.1	43	Ganancia	4550611	4,550611
Cr 7	101904918	102096550	q22.1-q22.1	40	Pérdida	191573	0,191573
Cr 7	127604630	130918866	q32.1-q32.3	35	Ganancia	3314177	3,314177
Cr 7	142942378	143801725	q34-q35	33	Pérdida	859288	0,859288
Cr 7	147991984	149090779	q36.1-q36.1	32	Ganancia	1098736	1,098736
Cr 7	150202817	150202876	q36.1-q36.1	32	Ganancia	0000000	0,000000
Cr 7	156716717	158816093	q36.3-q36.3	30	Ganancia	2099317	2,099317
Cr 8	16975	837507	p23.3-p23.3	33	Pérdida	820473	0,820473
Cr 8	6837435	7884993	p23.1-p23.1	41	Pérdida	1047499	1,047499
Cr 9	140794039	146264291	q24.3-q24.3	33	Ganancia	5470193	5,470193
Cr 9	36013399	38129130	p13.3-p13.2	30	Ganancia	2115672	2,115672
Cr 9	38869064	70202759	p13.1-q21.12	57	Pérdida	31333636	31,333636
Cr 9	117005092	122121162	q32-q33.1	35	Pérdida	5116011	5,116011
Cr 9	125621381	140209730	q33.2-q34.3	45	Ganancia	14588290	14,588290
Cr 9	140215147	140224149	q34.3-q34.3	35	Pérdida	8943	0,008943
Cr 10	37490461	37524172	p11.21-p11.21	47	Pérdida	33652	0,033652
Cr 10	44870523	52371353	q11.21-q11.23	42	Pérdida	7500771	7,500771
Cr 10	69469183	72433577	q21.3-q22.1	32	Ganancia	2964335	2,964335
Cr 10	73255752	76512210	q22.1-q22.2	32	Ganancia	3256399	3,256399
Cr 10	81419039	81612999	q22.3-q22.3	38	Pérdida	193901	0,193901
Cr 10	87691576	87941088	q23.1-q23.2	30	Pérdida	249453	0,249453
Cr 10	88920768	89249049	q23.2-q23.2	47	Pérdida	328222	0,328222

ANEXO 3 (Continuación)							
Cr 10	97862154	99150609	q24.1-q24.1	30	Ganancia	1288396	1,288396
Cr 10	101069145	105153511	q24.2-q24.33	33	Ganancia	4084307	4,084307
Cr 10	106792729	111531117	q25.1-q25.1	30	Pérdida	4738329	4,738329
Cr 11	4889498	5479112	p15.4-p15.4	30	Pérdida	589555	0,589555
Cr 11	11025191	14020935	p15.3-p15.2	30	Pérdida	2995685	2,995685
Cr 11	15016874	16396710	p15.2-p15.1	30	Pérdida	1379777	1,379777
Cr 11	20255097	20289613	p15.1-p15.1	43	Ganancia	34457	0,034457
Cr 11	20606485	32139158	p15.1-p13	37	Pérdida	11532614	11,532614
Cr 11	34559616	43212369	p13-p12	35	Pérdida	8652694	8,652694
Cr 11	44328581	44975021	p11.2-p11.2	30	Pérdida	646381	0,646381
Cr 11	45374300	45680149	p11.2-p11.2	32	Pérdida	305790	0,305790
Cr 11	45923615	48190140	p11.2-p11.2	35	Ganancia	2266466	2,266466
Cr 11	48975862	56505878	p11.12-q12.1	50	Pérdida	7529957	7,529957
Cr 11	56825292	57066954	q12.1-q12.1	30	Ganancia	241603	0,241603
Cr 11	60234326	71843375	q12.2-q13.4	42	Ganancia	11608990	11,608990
Cr 11	78296740	110910724	q14.1-q23.1	38	Pérdida	32613925	32,613925
Cr 11	111628123	115782456	q23.1-q23.3	32	Pérdida	4154274	4,154274
Cr 11	130067267	134092303	q24.3-q25	37	Pérdida	4024977	4,024977
Cr 12	47265824	56577370	q13.11-q13.2	43	Ganancia	9311487	9,311487
Cr 12	118766927	124260571	q24.23-q24.31	37	Ganancia	5493585	5,493585
Cr 13	109607314	114085670	q33.3-q34	37	Ganancia	4478297	4,478297
Cr 14	18407780	19359996	q11.1-q11.2	61	Pérdida	952157	0,952157
Cr 14	19552691	22675218	q11.2-q11.2	33	Ganancia	3122468	3,122468
Cr 14	26499374	26566421	q12-q12	30	Pérdida	66988	0,066988
Cr 14	72507629	74886354	q24.2-q24.3	37	Ganancia	2378666	2,378666
Cr 14	77477595	87856580	q24.3-q31.3	37	Pérdida	10378926	10,378926
Cr 14	96281242	98380658	q32.13-q32.2	37	Pérdida	2099357	2,099357
Cr 14	101425950	106342135	q32.31-q32.33	37	Ganancia	4916126	4,916126
Cr 15	18422770	26864659	p11.1-q12	32	Pérdida	8441830	8,441830

ANEXO 3 (Continuación)							
Cr 15	28248482	28452314	q13.1-q13.1	30	Pérdida	203773	0,203773
Cr 15	80528336	80982568	q25.1-q25.1	35	Pérdida	454173	0,454173
Cr 15	85100885	86724461	q25.2-q25.3	32	Pérdida	1623517	1,623517
Cr 15	91474962	93825906	q26.1-q26.1	30	Pérdida	2350885	2,350885
Cr 16	95546	14738282	p13.3-p13.12	37	Ganancia	14642677	14,642677
Cr 16	14778511	15353119	p13.11-p13.11	40	Pérdida	574549	0,574549
Cr 16	15464751	16213400	p13.11-p13.11	38	Ganancia	748590	0,748590
Cr 16	16245207	16447913	p13.11-p13.11	35	Pérdida	202647	0,202647
Cr 16	16512254	18010721	p13.11-p12.3	35	Ganancia	1498408	1,498408
Cr 16	18038778	18594572	p12.3-p12.3	38	Pérdida	555735	0,555735
Cr 16	18618876	23121774	p12.3-p12.2	30	Ganancia	4502839	4,502839
Cr 16	29473201	31711863	p11.2-p11.2	40	Ganancia	2238603	2,238603
Cr 16	31888699	33366648	p11.2-p11.2	37	Pérdida	1477890	1,477890
Cr 16	62913343	64047048	q21-q21	32	Pérdida	1133646	1,133646
Cr 16	64900356	69242742	q21-q22.1	47	Ganancia	4342327	4,342327
Cr 16	69532118	69758867	q22.1-q22.1	35	Pérdida	226690	0,226690
Cr 16	87940391	88704662	q24.2-q24.3	33	Ganancia	764212	0,764212
Cr 17	78259	10283354	p13.3-p13.1	35	Ganancia	10205036	10,205036
Cr 17	16954652	18257724	p11.2-p11.2	30	Ganancia	1303013	1,303013
Cr 17	18287891	19075717	p11.2-p11.2	32	Pérdida	787767	0,787767
Cr 17	19091256	20143868	p11.2-p11.2	42	Ganancia	1052553	1,052553
Cr 17	20167115	20738119	p11.2-p11.2	37	Pérdida	570945	0,570945
Cr 17	21247123	22372531	p11.2-p11.1	30	Pérdida	1125349	1,125349
Cr 17	23317186	27975206	p11.1-q11.2	33	Ganancia	4657961	4,657961
Cr 17	28515224	30166846	q11.2-q11.2	32	Pérdida	1651563	1,651563
Cr 17	31076344	46694286	q11.2-q21.32	45	Ganancia	15617883	15,617883
Cr 17	52236804	65373911	q22-q24.2	40	Ganancia	13137048	13,137048
Cr 17	68013563	78637182	q24.3-q25.3	50	Ganancia	10623560	10,623560
Cr 18	15636	112438	p11.32-p11.32	33	Pérdida	96743	0,096743

ANEXO 3 (Continuación)

Cr 18	14397827	15014176	p11.21-p11.21	33	Pérdida	616290	0,616290
Cr 18	20890532	41740141	q11.2-q12.3	33	Pérdida	20849550	20,849550
Cr 18	43154947	43433426	q12.3-q12.3	30	Pérdida	278420	0,278420
Cr 18	47671711	52930061	q21.1-q21.2	32	Pérdida	5258291	5,258291
Cr 18	59338887	72045213	q21.33-q22.3	32	Pérdida	12706267	12,706267
Cr 19	45911	21758732	p13.3-p12	57	Ganancia	21712762	21,712762
Cr 19	37674877	63782948	q13.12-q13.43	52	Ganancia	26108012	26,108012
Cr 20	166419	464538	p13-p13	30	Ganancia	298060	0,298060
Cr 20	2241691	4949560	p13-p13	30	Ganancia	2707810	2,707810
Cr 20	25120777	37143320	p11.21-q11.23	48	Ganancia	12022484	12,022484
Cr 20	41019694	62364287	q12-q13.33	38	Ganancia	21344534	21,344534
Cr 21	13469523	14424968	q11.1-q11.2	47	Pérdida	955386	0,955386
Cr 21	42406592	46809657	q22.2-q22.3	38	Ganancia	4403006	4,403006
Cr 22	14763133	49565997	q11.1-q22.33	42	Ganancia	34802805	34,802805

3B. Regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas en función de la localización en el colon

Right colon				Left colon				Rectum			
Chromosome	region		%	Chromosome	region		%	Chromosome	region		%
chr1	p36.23	p34.2	54	chr1	p36.23	p36.22	46	chr1	q21.1	q21.1	42
chr1	q12	q21.2	69	chr1	p36.22	p35.3	50	chr5	q13.2	q13.2	42
chr1	q21.1	q21.2	62	chr1	p36.11	p36.11	46	chr6	p21.31	p21.2	47
chr5	q13.2	q13.2	69	chr1	p35.3	p35.1	46	chr8	p23.1	p23.1	47
chr7	p22.3	p22.2	62	chr1	q21.1	q21.1	61	chr9	p13.1	p13.1	42
chr7	p22.2	p22.1	54	chr5	q13.2	q13.2	64	chr9	p12	p12	42
chr7	q11.23	q11.23	62	chr6	p21.31	p21.2	46	chr9	p12	q21.11	47
chr7	q11.23	q11.23	62	chr7	p22.3	p22.3	46	chr9	q21.11	q21.11	42
chr7	q21.3	q22.1	54	chr7	q11.23	q11.23	46	chr10	q11.22	q11.22	47
chr7	q22.1	q22.1	69	chr7	q22.1	q22.1	46	chr11	q14.1	q14.1	42
chr9	p13.1	p13.1	69	chr9	p12	p11.2	57	chr11	q24.3	q25	42
chr9	p12	q13	77	chr9	q13	q13	57	chr11	q25	q25	47
chr9	p12	p11.2	85	chr9	q21.11	q21.11	57	chr12	q13.11	q13.2	47
chr9	q13	q21.11	69	chr9	q33.3	q34.3	46	chr14	q11.1	q11.2	53
chr9	q33.3	q34.3	62	chr10	q11.21	q11.22	57	chr17	q12	q21.32	47
chr10	q11.22	q11.22	77	chr11	p11.12	p11.12	61	chr17	q21.31	q21.32	53
chr10	q21.3	q22.1	54	chr11	q12.3	q13.3	46	chr17	q22	q25.3	47
chr11	p11.12	p11.12	62	chr11	q13.1	q13.2	50	chr18	q12.3	q12.3	42
chr11	q13.1	q13.2	54	chr11	q14.2	q14.3	57	chr19	p13.3	q13.43	58
chr12	q13.13	q13.2	54	chr13	q33.3	q34	46	chr20	p11.1	q13.2	47
chr14	q24.2	q24.3	54	chr14	q32.31	q32.32	46	chr22	q11.1	q11.1	53
chr16	p13.3	p13.3	54	chr16	p13.3	p13.3	46	chr22	q11.1	p22.33	47
chr16	p13.12	p12.3	69	chr16	q21	q22.1	54				
chr16	p13.11	p13.11	62	chr17	q21.1	q21.31	46				
chr17	p11.2	p11.2	54	chr17	q22	q25.3	46				
chr17	q21.31	q21.32	62	chr17	q24.3	q25.3	50				
chr17	q24.3	q25.3	62	chr19	p13.3	p13.11	54				
chr19	p13.3	q13.42	69	chr19	p13.11	p13.11	57				
chr19	q13.2	q13.2	54	chr19	q13.33	q13.43	46				
chr19	q13.42	q13.43	62	chr20	q11.1	q13.33	50				
chr21	q22.3	q11.1	62	chr20	q11.21	q11.23	54				
chr21	q22.3	q22.3	69	chr20	q11.21	q11.22	57				
chr22	q12.1	q13.31	54	chr20	q12	q13.12	54				
				chr20	q13.2	q13.2	46				
				chr22	q11.1	q11.1	50				
				chr22	q11.1	q11.21	46				

