

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Análisis comparativo de las vías de carcinogénesis colorrectal
entre dos grupos de edades diferenciados**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Fernando Jiménez Escovar

Directores

José Perea García
Antonio José Torres García
Carlos Cerdán Santacruz

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS VÍAS DE CARCINOGENESIS
COLORRECTAL ENTRE DOS GRUPOS DE EDADES DIFERENCIADOS**

FERNANDO JIMÉNEZ ESCOVAR

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS VÍAS DE CARCINOGENESIS
COLORRECTAL ENTRE DOS GRUPOS DE EDADES DIFERENCIADOS**

DOCTORANDO:

FERNANDO JIMÉNEZ ESCOVAR

Directores:

**José Perea García
Antonio José Torres García
Carlos Cerdán Santacruz**

MADRID, 2015



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Fernando Jiménez Escovar
Título de la Tesis	"Análisis comparativo de las vías de carcinogénesis Colorrectal entre dos grupos de edades diferenciados"
Facultad o Centro	Facultad de Medicina. UC. Madrid

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Carlos Cerdán Santacruz
Centro al que pertenece y dirección	Fellow de Coloproctología Hospital Universitario La Fe. Valencia Dirección: Av. de El Ferrol 35-3º. 28029-Madrid
D.N.I/Pasaporte	51450104R
e-mail	carloscerdansantacruz@hotmail.com

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

Evidentemente, si he sido uno de los Directores de esta Tesis Doctoral, debo estar satisfecho. El tema desarrollado es difícil y sumamente complejo para un cirujano, a pesar de lo cual el doctorando lo ha realizado con precisión, meticulosidad y alto nivel de exigencia. Pero considero que estos aspectos científicos deben ser valorados por el tribunal correspondiente. Lo que creo me corresponde resaltar es la actitud del Doctorando: Entrega, ilusión, sacrificio, capacidad de aceptación de las recomendaciones que se le han efectuado, espíritu crítico en todo momento con todos los aspectos de su trabajo, ambición en la valoración de la literatura existente sobre el tema desarrollado, meticulosidad en su exposición, rigor en el análisis de los resultados...

Considero, por tanto, que el trabajo que se presenta reúne todos los condicionamientos para optar al Grado de Doctor por parte de Fernando Jiménez Escovar.

Madrid, a 20 de Septiembre de 2015

Fdo.: Dr. Carlos Cerdán Santacruz

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	FERNANDO JIMÉNEZ ESCOVAR
Título de la Tesis	"Análisis comparativo de las vías de carcinogénesis colorrectal entre dos grupos de edades diferenciados"
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	JOSE PEREA GARCÍA
Centro al que pertenece y dirección	HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE. AVENIDA DE CÓRDOBA S/N. 28041 MADRID. Facultad de Medicina.
D.N.I./Pasaporte	33522141D
e-mail	josepereag@hotmail.com

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El presente estudio reúne todos los requisitos para ser defendido como Tesis Doctoral. Desde el punto de vista metodológico, los objetivos e hipótesis propuestos son respondidos adecuadamente en los resultados, y resumidos de manera correcta en las Conclusiones.

El material y métodos está claramente descritos al detalle.

La introducción es una muy actualizada puesta al día del tema que trata, siendo la Discusión desarrollada correctamente.

En resumen una importante aportación en el campo de la investigación sobre el Cáncer colorrectal, con resultados prometedores y llamativos.

Madrid, a 28 de Septiembre de 2015

Fdo.:

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Fernando Jimenez Escovar
Título de la Tesis	"Análisis comparativo de las vías de carcinogénesis colorrectal entre dos grupos de edades diferenciados"
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	ANTONIO JOSE TORRES GARCIA
Centro al que pertenece y dirección	FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE CIRUGIA. UCM
D.N.I./Pasaporte	24.836.041-C
e-mail	ajtorres@ucm.es ajtorresgarcia@gmail.com

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El presente estudio reúne todos los requisitos para ser defendido como Tesis Doctoral. Tanto las Conclusiones como los Resultados se ajustan a los Objetivos planteados y al Material y Método empleados.

Asimismo, supone una importante aportación en la futura atención de los pacientes afectos de Cáncer Colorrectal

Madrid, a 14 DE SEPTIEMBRE DE 2015

Fdo.: Antonio J. Torres García

AGRADECIMIENTOS	1
ABREVIATURAS	2
RELACIÓN DE TABLAS	3
RELACIÓN DE FIGURAS	6
RESUMEN	8
SUMMARY	15
I. INTRODUCCIÓN.	21
1. EL CÁNCER, UNA ENFERMEDAD GENÉTICA.	21
2. EL CÁNCER COLORRECTAL. GENERALIDADES.	25
2.1. EPIDEMIOLOGÍA.	25
2.2. FACTORES DE RIESGO. EDAD E HISTORIA FAMILIAR.	26
2.3. DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER COLORRECTAL.	27
2.4. BASES MOLECULARES Y PATOGÉNESIS DEL CÁNCER COLORRECTAL.	29
2.4.1. Secuencia adenoma-carcinoma.	31
2.4.2. Vía de los pólipos serrados.	32
2.4.3. Vías moleculares de carcinogénesis colorrectal.	34
2.4.4. Clasificación molecular del CCR.	36
3. EL CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO Y FAMILIAR.	37
3.1. SÍNDROME DE LYNCH – CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO.	37
3.1.1. Concepto y variantes.	37
3.1.2. Características clínicas.	38
3.1.3. Criterios clínicos diagnósticos.	40
3.1.4. Bases genéticas.	42
3.1.5. Diagnóstico molecular.	45
3.1.6. Cribado del SL.	47
3.1.7. Tratamiento quirúrgico.	47
3.2. POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR Y OTRAS POLIPOSIS.	48
3.2.1. Poliposis adenomatosa familiar.	48
3.2.2. PAF atenuada.	50
3.2.3. Poliposis asociada a MYH.	51
4. EL CÁNCER COLORRECTAL EN EL ADULTO JOVEN.	52
4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.	53
4.2 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES.	56
4.3. TRATAMIENTO.	57
II. HIPÓTESIS	59

III. OBJETIVOS.	61
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.	63
1. SUJETO DE ESTUDIO.	63
1.1. PROCEDENCIA.	63
1.2 INFORMACIÓN RECOGIDA.	63
1.2.1. Información clínica.	63
1.2.2. Información familiar.	64
2. MUESTRAS.	66
2.1. LÍQUIDOS BIOLÓGICOS. SANGRE PERIFÉRICA.	66
2.2. TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA.	69
2.2.1. Tinción hematoxilina-eosina.	69
2.2.2. Extracción de ADN.	70
3. VALORACIÓN DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN.	72
4. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TEJIDO NORMAL	74
5. ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES DE REPARACIÓN DE LOS ERRORES DE EMPAREJAMIENTO DEL ADN (<i>MLH1</i>, <i>MSH2</i> Y <i>MSH6</i>).	78
5.1. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN <i>MLH1</i> Y <i>MSH2</i> .	78
5.2. ANÁLISIS DE GRANDES DELECCIONES GENÓMICAS.	82
5.2.1. <i>MSH6</i> .	87
5.3. ESTUDIO DE HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN <i>MLH1</i> .	95
5.3.1. Controles.	95
5.3.2. Modificación con bisulfito sódico.	95
5.3.3. PCR específicas de presencia y ausencia de metilación.	98
5.3.4. PCR independiente del estado de metilación.	99
6. INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS DEL SISTEMA DE REPARACIÓN: <i>MLH1</i>, <i>MSH2</i>, <i>MSH6</i>.	104
7. DETERMINACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL <i>BRAF</i>.	106
8. ANÁLISIS DEL FENOTIPO METILADOR DE ISLOTES CpG.	107
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.	108
V. RESULTADOS.	110
1. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-CLÍNICAS.	110
2. CARACTERÍSTICAS FAMILIARES.	115
3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES.	116
3.1. COMPARACIÓN DE LOS GRUPOS SEGÚN LA IMS.	116
3.1.1. Análisis comparativo dentro del grupo de jóvenes.	116
3.1.2. Análisis comparativo dentro del grupo de mayores.	121
3.1.3. Comparación entre tumores IMS en jóvenes y tumores IMS en mayores de 69 años.	126
3.1.4. Comparación entre tumores EMS en jóvenes y tumores EMS en mayores de 69 años.	133
3.2. FENOTIPO METILADOR (ISLAS CpG).	136
3.2.1. Características del fenotipo metilador en menores de 45 años.	136

3.2.2. Características del fenotipo metilador en mayores de 69 años.	142
3.2.3. Comparación fenotipo metilador entre menores de 45 años y mayores de 69 años.	146
3.3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CCR.	151
VI. DISCUSIÓN.	172
1. LA EDAD, UN FACTOR DETERMINANTE EN EL CÁNCER COLORRECTAL.	172
2. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER COLORRECTAL SEGÚN LA EDAD DE APARICIÓN.	173
2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANATOMO-PATOLÓGICAS.	173
2.2. CARACTERÍSTICAS FAMILIARES.	176
2.3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES.	177
2.3.1. Inestabilidad de microsatélites.	177
2.3.2. Fenotipo metilador.	180
3. CARACTERÍSTICAS DE LA PRESENTACIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL SEGÚN LA VÍA DE CARCINOGENÉISIS: INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES Y FENOTIPO METILADOR.	183
3.1. VÍA DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES.	183
3.1.1. Características clínicas y anatomo-patológicas.	183
3.1.2. Características familiares.	184
3.1.3. Características moleculares.	185
3.2. VÍA DEL FENOTIPO METILADOR.	185
4. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL EN DOS GRUPOS DE EDADES DIFERENCIADOS.	186
VII. CONCLUSIONES.	192
VIII. BIBLIOGRAFÍA	195
ANEXO	216

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis y en especial al Doctor José Perea García, Profesor Asociado de Cirugía, Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y cirujano Adjunto del Servicio de Cirugía y del Aparato Digestivo “B” del Hospital Universitario 12 de Octubre, por su ayuda permanente, paciencia y amistad.

Al Doctor Javier Cerdán Miguel por su apoyo incondicional, cariño y dedicación por convertirme en un mejor profesional.

Al Servicio de Anatomía Patológica y la Comisión de Tumores del Hospital Universitario 12 de Octubre (Dra. Yolanda Rodríguez) por su aportación en las preparaciones histológicas y en el proceso de recogida de datos.

Al servicio de Biología molecular del Hospital Universitario 12 de octubre (Dr. Daniel Rueda) y Hospital Universitario de Salamanca (Dr. Rogelio González), por su colaboración en la realización del estudio genético.

A mis compañeros de la Unidad de Cirugía Colorrectal del Servicio de Cirugía General y de Aparato Digestivo del Hospital Galdakao Usansolo, así como a los de la Clínica IMQ Zorrotzaurre por su preocupación y colaboración que permitieron concretar este trabajo.

A mi familia por ser la razón principal para culminar este proyecto.

ABREVIATURAS

- CCHNP Cáncer colorrectal hereditario no polipósico
- CCR Cáncer colorrectal
- CIMP Fenotipo metilador de islotes CpG
- CU Colitis ulcerosa
- FM Fenotipo metilador
- IC Inestabilidad cromosómica
- IHQ Inmunohistoquímica
- IMS Inestabilidad de microsatélites
- M Metástasis
- MMR Enzimas reparadoras del ADN
- N Ganglio
- PAF Poliposis adenomatosa familiar
- PAFA Poliposis adenomatosa familiar atenuada
- PAM Poliposis asociada a MYH
- SEER Surveillance, Epidemiology and End Results
- SL Síndrome de Lynch
- SG Supervivencia global
- SLE Supervivencia libre de enfermedad
- T Tumor
- WHO Organización Mundial de la Salud

RELACIÓN DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIONES POR ESTADIOS PARA EL CCR (TOMADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE: WWW.CAMCER.GOV).
.....29

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DIFERENCIADORAS ENTRE LOS CCR QUE PRESENTAN INESTABILIDAD CROMOSÓMICA,
INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES Y FENOTIPO METILADOR. MODIFICADO DE LA CHAPELLE 2003⁴. 34

TABLA 3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE SL.....41

TABLA 4. TAMAÑO DE LOS PRODUCTOS DE PCR Y FLUOROCROMOS EMPLEADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA IMS MEDIANTE EL
“PANEL DE BETHESDA” (HNPCC MICROSATELLITE INSTABILITY TEST, ROCHE).....75

TABLA 5. ESTUDIO DE MUTACIONES DEL GEN MLH1. CEBADORES EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES Y
REGIONES INTRÓNICAS ADYACENTES, TAMAÑOS DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS EN PARES DE BASES Y
CONDICIONES DESNATURALIZANTES DE LOS GELES.....79

TABLA 6. ESTUDIO DE MUTACIONES DEL GEN MSH2. CEBADORES EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES Y
REGIONES INTRÓNICAS ADYACENTES, TAMAÑOS DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS EN PARES DE BASES Y
CONDICIONES DESNATURALIZANTES DE LOS GELES.....80

TABLA 7. SONDAS UTILIZADAS EN EL PRODUCTO COMERCIAL DE MLPA, SALSA P003 MLH1/MSH2, PARA LA DETECCIÓN DE
GRANDES REORDENAMIENTOS DE LOS GENES MLH1 Y MSH2. SE INDICA LA LONGITUD DE CADA SONDA Y EL EXÓN DEL
GEN EN EL QUE SE LOCALIZA, ASÍ COMO LAS SONDAS.83

TABLA 8. CEBADORES, TAMAÑOS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS, CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN Y TEMPERATURAS DE
DESNATURALIZACIÓN PARA LA CROMATOGRAFÍA DE ALTO RENDIMIENTO, DE CADA UNO DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN
MSH6.90

TABLA 9. ANTICUERPOS UTILIZADOS, CASAS COMERCIALES, CLONES Y DILUCIONES UTILIZADAS PARA REALIZAR LA TÉCNICA DE
INMUNOHISTOQUÍMICA EN CORTES DE TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA.105

TABLA 10. EDAD MEDIA AL DIAGNÓSTICO DE CCR Y DISTRIBUCIÓN POR SEXO SEGÚN LA EDAD DE APARICIÓN DEL TUMOR. .111

TABLA 11. LOCALIZACIÓN DEL CCR SEGÚN LA EDAD DE APARICIÓN DEL TUMOR.112

TABLA 12. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DEL CCR SEGÚN LA EDAD DE APARICIÓN DEL TUMOR.113

TABLA 13. ESTADIFICACIÓN TUMORAL SEGÚN LA EDAD DE APARICIÓN DEL TUMOR.113

TABLA 14. PÓLIPOS ASOCIADOS Y PRESENCIA DE NEOPLASIA PRIMARIA MÚLTIPLE, CCR SINCRÓNICO O METACRÓNICO SEGÚN
LA EDAD DE APARICIÓN DEL TUMOR.114

TABLA 15. CARACTERÍSTICAS FAMILIARES DEL CCR SEGÚN LA EDAD DE APARICIÓN DEL TUMOR.....115

TABLA 16. EDAD MEDIA AL DIAGNÓSTICO DE CCR Y DISTRIBUCIÓN POR SEXO SEGÚN IMS EN PACIENTES JÓVENES.....117

TABLA 17. LOCALIZACIÓN DEL TUMOR SEGÚN IMS EN PACIENTES JÓVENES.....118

TABLA 18. ESTADIO DEL TUMOR SEGÚN IMS EN PACIENTES JÓVENES.118

TABLA 19. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES Y DE LOS PÓLIPOS ASOCIADOS SEGÚN IMS EN
PACIENTES JÓVENES.....119

TABLA 20. CARACTERÍSTICAS FAMILIARES SEGÚN LA PRESENCIA DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN PACIENTES JÓVENES.
.....121

TABLA 21. EDAD MEDIA AL DIAGNÓSTICO DE CCR Y DISTRIBUCIÓN POR SEXO SEGÚN IMS EN PACIENTES MAYORES.122

TABLA 22. LOCALIZACIÓN DEL TUMOR SEGÚN IMS EN PACIENTES MAYORES.123

TABLA 23. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES Y DE LOS PÓLIPOS ASOCIADOS SEGÚN IMS EN
PACIENTES MAYORES.123

TABLA 24. ESTADIO DEL TUMOR SEGÚN IMS EN PACIENTES MAYORES.124

RELACIÓN DE TABLAS

TABLA 25. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES Y DE LOS PÓLIPOS ASOCIADOS SEGÚN IMS EN PACIENTES MAYORES.	125
TABLA 26. CARACTERÍSTICAS FAMILIARES SEGÚN LA PRESENCIA DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN PACIENTES MAYORES.	126
TABLA 27. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS TUMORES IMS SEGÚN LA EDAD.	127
TABLA 28. LOCALIZACIÓN DE LOS TUMORES IMS SEGÚN LA EDAD.	128
TABLA 29. CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES IMS SEGÚN LA EDAD.	128
TABLA 30. NEOPLASIAS ASOCIADAS A LOS TUMORES IMS SEGÚN LA EDAD.	129
TABLA 31. ESTADIO DE LOS TUMORES IMS SEGÚN LA EDAD.	129
TABLA 32. PÓLIPOS ASOCIADOS A LOS TUMORES IMS SEGÚN LA EDAD.	130
TABLA 33. AGREGACIÓN FAMILIAR EN TUMORES IMS SEGÚN LA EDAD.	131
TABLA 34. ALTERACIONES GENÉTICAS EN TUMORES IMS SEGÚN LA EDAD.	132
TABLA 35. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS TUMORES EMS SEGÚN LA EDAD.	133
TABLA 36. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES EMS SEGÚN LA EDAD.	134
TABLA 37. ESTADIO Y LESIONES ASOCIADAS A LOS TUMORES EMS SEGÚN LA EDAD.	135
TABLA 38. CARACTERÍSTICAS FAMILIARES DE LOS TUMORES EMS SEGÚN LA EDAD.	135
TABLA 39. CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES SEGÚN EL GRADO DE CIMP EN LOS PACIENTES JÓVENES.	137
TABLA 40. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LOS TUMORES CIMP EN JÓVENES.	138
TABLA 41. PÓLIPOS ASOCIADOS A LOS TUMORES DE PACIENTES JÓVENES SEGÚN CIMP.	139
TABLA 42. NEOPLASIAS ASOCIADAS A LOS TUMORES DE PACIENTES JÓVENES SEGÚN CIMP.	140
TABLA 43. ESTADIO SEGÚN CIMP EN PACIENTES JÓVENES.	140
TABLA 44. AGREGACIÓN FAMILIAR EN EL GRUPO DE APARICIÓN TEMPRANA SEGÚN EL GRADO DE CIMP.	141
TABLA 45. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES EN EL GRUPO DE CCR DE APARICIÓN TARDÍA SEGÚN EL GRADO DE CIMP.	142
TABLA 46. CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES EN EL GRUPO DE APARICIÓN TARDÍA SEGÚN EL GRADO DE CIMP.	143
TABLA 47. NEOPLASIAS ASOCIADAS AL CCR EN EL GRUPO DE APARICIÓN TARDÍA SEGÚN EL GRADO DE CIMP.	144
TABLA 48. ESTADIO SEGÚN CIMP EN PACIENTES MAYORES.	145
TABLA 49. AGREGACIÓN FAMILIAR EN EL GRUPO DE APARICIÓN TEMPRANA SEGÚN EL GRADO DE CIMP.	145
TABLA 50. COMPARACIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN EL MOMENTO DE APARICIÓN DEL CCR Y EL GRADO CIMP.	146
TABLA 51. LOCALIZACIÓN DEL TUMOR DE ACUERDO A CIMP Y A EDAD.	147
TABLA 52. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES SEGÚN CIMP Y DE ACUERDO A EDAD DE APARICIÓN.	148
TABLA 53. ESTADIO TUMORAL SEGÚN CIMP Y DE ACUERDO A EDAD DE APARICIÓN.	149
TABLA 54. LESIONES ASOCIADAS A CCR SEGÚN CIMP Y DE ACUERDO A EDAD DE APARICIÓN.	149
TABLA 55. COMPARACIÓN DE LA AGREGACIÓN FAMILIAR DE CADA GRUPO CIMP SEGÚN EDAD DE APARICIÓN.	150
TABLA 56. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE ACUERDO A LAS DIFERENTES CATEGORÍAS MOLECULARES EN CCR DE APARICIÓN TEMPRANA Y SEGÚN EL ESTADO IMS Y CIMP.	151
TABLA 57. LOCALIZACIÓN Y ESTADIO DE ACUERDO A LAS DIFERENTES CATEGORÍAS MOLECULARES EN CCR DE APARICIÓN TEMPRANA Y SEGÚN EL ESTADO IMS Y CIMP.	152
TABLA 58. LESIONES ASOCIADAS Y AGREGACIÓN FAMILIAR DE ACUERDO A LAS DIFERENTES CATEGORÍAS MOLECULARES EN CCR DE APARICIÓN TEMPRANA Y SEGÚN EL ESTADO IMS Y CIMP.	153
TABLA 59. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE ACUERDO A LAS DIFERENTES CATEGORÍAS MOLECULARES EN CCR DE APARICIÓN TARDÍA Y SEGÚN EL ESTADO IMS Y CIMP.	154

RELACIÓN DE TABLAS

TABLA 60. LOCALIZACIÓN Y ESTADIO DE ACUERDO A LAS DIFERENTES CATEGORÍAS MOLECULARES EN CCR DE APARICIÓN TARDÍA Y SEGÚN EL ESTADO IMS Y CIMP.	155
TABLA 61. CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS DE ACUERDO A LAS DIFERENTES CATEGORÍAS MOLECULARES EN CCR DE APARICIÓN TARDÍA Y SEGÚN EL ESTADO IMS Y CIMP.	156
TABLA 62. LESIONES ASOCIADAS Y AGREGACIÓN FAMILIAR DE ACUERDO A LAS DIFERENTES CATEGORÍAS MOLECULARES EN CCR DE APARICIÓN TARDÍA Y SEGÚN EL ESTADO IMS Y CIMP.	157
TABLA 63. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE ACUERDO A LAS DIFERENTES CATEGORÍAS MOLECULARES EN CCR DE APARICIÓN TEMPRANA Y SEGÚN EL ESTADO IMS Y CIMP.	158
TABLA 64. CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS DE ACUERDO A LAS DIFERENTES CATEGORÍAS MOLECULARES EN CCR DE APARICIÓN TEMPRANA Y SEGÚN EL ESTADO IMS Y CIMP.	159
TABLA 65. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS TUMORES MSS/CIMP ALTO DE ACUERDO A LA EDAD DE APARICIÓN.	161
TABLA 66. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES MSS/CIMP ALTO DE ACUERDO A LA EDAD DE APARICIÓN.	162
TABLA 67. ESTADIO DE LOS TUMORES MSS/CIMP ALTO DE ACUERDO A LA EDAD DE APARICIÓN.	163
TABLA 68. LESIONES ASOCIADAS A LOS TUMORES MSS/CIMP ALTO DE ACUERDO A LA EDAD DE APARICIÓN.	164
TABLA 69. AGREGACIÓN FAMILIAR EN LOS TUMORES MSS/CIMP ALTO DE ACUERDO A LA EDAD DE APARICIÓN.	165
TABLA 70. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS TUMORES MSS/CIMP BAJO O 0 DE ACUERDO A LA EDAD DE APARICIÓN. ...	166
TABLA 71. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES MSS/CIMP BAJO O 0 DE ACUERDO A LA EDAD DE APARICIÓN.	167
TABLA 72. ESTADIO DE LOS TUMORES MSS/CIMP BAJO O 0 DE ACUERDO A LA EDAD DE APARICIÓN.	168
TABLA 73. LESIONES ASOCIADAS A LOS TUMORES MSS/CIMP BAJO O 0 DE ACUERDO A LA EDAD DE APARICIÓN.	169
TABLA 74. AGREGACIÓN FAMILIAR EN LOS TUMORES MSS/CIMP BAJO O 0 DE ACUERDO A LA EDAD DE APARICIÓN.	170

RELACIÓN DE FIGURAS

FIGURA 1. SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA. PRINCIPALES PROCESOS MOLECULARES QUE INTERVIENEN EN LA CARCINOGENÉISIS⁹.23

FIGURA 2. REPRESENTACIÓN DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE CCR SEGÚN LAS DISTINTAS VÍAS DE CARCINOGENÉISIS ASÍ COMO LOS CORRESPONDIENTES SOLAPAMIENTOS³.24

FIGURA 3. PORCENTAJE DE NUEVOS CASOS DE CCR POR GRUPOS DE EDAD. TOMADO DE SEER 2008-2012.25

FIGURA 4. CÁNCERES MÁS FRECUENTES EN EUROPA, 2008^{12,13}.26

FIG 5. VÍA DE LOS PÓLIPOS SERRADOS²⁸.33

FIGURA 6. GRUPOS DE CCR DE ACUERDO A IMS Y A CIMP⁴⁷.37

FIGURA 7. RESULTADO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL ADN NORMAL (A) Y DE UN TUMOR (B) QUE MUESTRA IMS EN TODOS LOS MARCADORES MICROSATÉLITES ANALIZADOS.77

FIGURA 8. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE UNA COLUMNA DEL SISTEMA WAVE.92

FIGURA 9. VISUALIZACIÓN MEDIANTE GENE SCAN 3.5 DE GRANDES REORDENAMIENTOS ESTUDIADOS MEDIANTE MLPA.93

FIGURA 10. VISUALIZACIÓN EN GEL DE AGAROSA DE LA TÉCNICA COMBINADA DE MODIFICACIÓN CON BISULFITO Y DIGESTIÓN CON LA ENZIMA BSTUI.103

FIGURA 11. RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN DE UN CASO QUE PRESENTA UN ALELO DEL GEN MLH1 CON HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR.104

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en los países desarrollados y ocupa el primer lugar como causa de muerte por tumor. Su prevalencia en España supera los 26.500 casos al año. El cáncer de colon representa dos tercios de todos los CCR. El 97% de los CCR son adenocarcinomas.

El CCR tiene formas de presentación variables. La mayoría de los cánceres son esporádicos. Sin embargo, entre un 5 y 10% tiene un componente hereditario y el restante 20 a 25% presenta agregación familiar.

Las alteraciones en el genoma que dan origen al cáncer son genéticas (cambios en la secuencia del ADN) y epigenéticas (afectan la expresión genética sin afectación estructural del gen).

La descripción de carcinogénesis original de Fearon y Vogelstein ha servido de base para comprender el desarrollo tumoral. Posteriormente se han identificado tres grandes vías de carcinogénesis: la vía supresora o de la inestabilidad cromosómica (IC), la mutadora o de la inestabilidad de microsatélites (IMS) y la vía metiladora o del fenotipo metilador (FM) también llamada vía serrada. Estas tres vías no son mutuamente excluyentes.

Por este motivo, el CCR no se comporta de manera uniforme y aunque exista una vía preferente, la acumulación de cambios mutacionales y el solapamiento de las vías de carcinogénesis hacen que el fenotipo tumoral sea variable.

La IC se asocia al CCR esporádico en un 80 a 85% de los casos. También pertenecen a esta vía formas hereditarias como son la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF), la poliposis asociada a MYH (PAM) y la poliposis juvenil, entre otras. Los tumores con IC también se denominan tumores con estabilidad de microsatélites (EMS). Los tumores con IMS representan el 10 al 15% de todos los CCR y están presentes tanto en formas hereditarias como esporádicas. En las formas hereditarias, como es el caso

del síndrome de Lynch (SL), la IMS se produce por mutaciones germinales en los genes de reparación del ADN (MMR), y en los casos esporádicos, la IMS es consecuencia epigenética de hipermetilación del promotor *MLH1*. Los tumores con IMS preferentemente se localizan en colon derecho, producen mucina, presentan células en anillo de sello y bajo grado de diferenciación celular. El FM se presenta en el 35% de los CCR y se caracteriza porque los tumores típicamente se localizan en el colon derecho, son pobremente diferenciados y se asocian a mutaciones, principalmente del gen *BRAF*.

Ante las múltiples variables moleculares posibles, se ha descrito una clasificación molecular que permite asociar y correlacionar diferentes vías de carcinogénesis. Se resume en cuatro subtipos o categorías dentro de los cuales se encuentran representadas la IC, la IMS y el FM: IMS/CIMP alto, IMS/CIMP bajo-0, EMS/CIMP alto y por último EMS/CIMP bajo-0.

La edad habitual de presentación del CCR se encuentra entre la séptima y la octava décadas de la vida. Sólo un 2 a 10% de los CCR se diagnostican en menores de 40 o 50 años. El CCR en el adulto joven constituye un grupo específico pero a su vez heterogéneo. Por un lado presenta una mayor frecuencia de agregación familiar junto con algunas manifestaciones características clínicas y anatómo-patológicas como son la afectación del colon derecho y del sexo masculino, la presencia de bajo grado de diferenciación, producción de mucina, presencia de lesiones sincrónicas/metacrónicas y detección en estadios avanzados.

Sin embargo, la aparición temprana del CCR no siempre está asociada a componentes hereditarios. Algunos tumores de este subgrupo de jóvenes exhiben EMS y al igual que en los casos esporádicos, presentan alteración del *APC*, la β -catenina y el *p53*. De estos, ciertos tumores presentan aneuploidía, característica propia de la IC, y otros diploidía, característica de IMS. Sin embargo, ni las vías genéticas ni el comportamiento clínico están claramente establecidos. Por estos motivos, el adulto joven con CCR representa un interés particular.

El objetivo de este trabajo fue comparar a dos grupos de pacientes con CCR y de edades claramente diferenciadas, analizando los hallazgos clínicos, anatómo-patológicos, familiares y moleculares. Un grupo representaba al CCR de aparición temprana y en él se incluyeron pacientes hasta 45 años de edad. El otro grupo se componía de pacientes con edad igual o superior a 70 años. 88 pacientes consecutivos fueron incluidos en el grupo de jóvenes de los cuales 6 fueron excluidos por tratarse de casos de poliposis adenomatosa familiar (PAF). 97 fueron analizados en el grupo de los mayores en el mismo período. Se realizó un análisis descriptivo y retrospectivo. Todos los pacientes o un familiar de primer grado en caso de fallecimiento del paciente, fueron entrevistados y firmaron un consentimiento. El trabajo fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Se obtuvo información de las tres generaciones previas de cada paciente. Se obtuvieron muestras de tejido en parafina del tumor en cada caso. Se revisaron los diagnósticos de cáncer en las historias clínicas y de los informes de anatomía patológica. Un patólogo revisó todos los casos. Se recogieron las diferentes variables que representaban datos clínicos, anatómo-patológicos y familiares de cada individuo. Para determinar la vía de carcinogénesis se determinó la IMS, las mutaciones en BRAF y se analizó el estado de metilación. La presencia de IMS se determinó mediante el panel de Bethesda así como inmunohistoquímica (IHQ). En los casos en que se detectó IMS, se estudiaron las mutaciones en los genes de reparación de errores de emparejamiento del ADN (MMR) más frecuentes. El FM se clasificó en tres estadios de metilación: CIMP alto, CIMP bajo y CIMP 0. Se utilizó la clasificación molecular para realizar el análisis comparativo.

La edad media en el grupo de CCR de aparición temprana fue de 39,5 años y de 77,9 en el de aparición tardía. En los jóvenes predominaron tumores de localización izquierda y en el recto, con mayor proporción de producción de mucina (32%) y de células en anillo de sello (7%). Predominaron los estadios tempranos al diagnóstico según la clasificación de Dukes y apareció una proporción importante de pólipos

durante el seguimiento (56%) habitualmente adenomatosos (48%). La distribución en los mayores fue diferente siendo el colon izquierdo el menos frecuente, con menor proporción de las características anatómo-patológicas descritas en los jóvenes y menor detección del cáncer en estadios iniciales.

En los jóvenes hubo una mayor agregación familiar mientras que la proporción de CCR esporádico en los mayores fue del 80,4%. En los pacientes con CCR de aparición temprana se cumplieron criterios de Ámsterdam en un 20%, existió agregación familiar para neoplasias relacionadas con SL en un 26% y agregación familiar para neoplasias no relacionadas con SL en un 15,9%. Llamativamente los jóvenes presentaron cerca de un 40% de CCR esporádico.

15% de los tumores de pacientes jóvenes presentaron IMS correspondiendo en un 83% a SL. Se detectó la presencia de mutación en MMR en el 83%. Comparado con los casos de EMS en este grupo de pacientes, los IMS presentaron, como era de esperar, características de SL: edad de aparición más temprana (34 Vs 40 años), mayor afectación de colon derecho (50% Vs 20%), diagnóstico en estadios más tempranos (82% Vs 57% para estadios A y B) y más antecedentes familiares de cáncer. En los mayores, 9% de los tumores presentaron IMS cuyo origen fueron las mutaciones en el gen *BRAF* y con mayor frecuencia en mujeres. Los tumores con EMS en jóvenes, comparados con los de los mayores con EMS, se encontraron en estadios más tempranos, tuvieron diferente localización, menor proporción de neoplasia primaria múltiple y mayor agregación familiar.

EL FM se analizó en 68 pacientes jóvenes. El 19% presentó tumores con CIMP alto asociados con mayor frecuencia a agregación familiar (cumplían criterios de Ámsterdam y presentaban tumores asociados relacionados con SL) y a compromiso del colon derecho. En los mayores, la mayoría de los pacientes presentó CIMP 0 (49%). En el grupo de CCR de aparición tardía, los tumores CIMP alto con IMS se asociaron a mutaciones en *BRAF* y a ausencia de expresión de la proteína *MLH1* por hipermetilación. Cuando se compararon las dos poblaciones de edad de acuerdo a la categoría CIMP, se observó que CIMP alto en jóvenes se asociaba mutaciones en MMR

y a mayor proporción de tumores mucinosos con importante agregación familiar. Sin embargo, los tumores CIMP alto de los pacientes mayores se asociaron predominantemente a casos esporádicos con IMS. Los tumores CIMP bajo de pacientes jóvenes se localizaron más frecuentemente en el colon izquierdo mientras que con el mismo fenotipo metilador, los mayores presentaron tendencia a desarrollar otras neoplasias primarias. Por último, la mayor parte de los tumores CIMP 0 de los jóvenes se localizaron preferentemente en colon izquierdo y recto, se diagnosticaron en estadios tempranos y tuvieron un importante componente familiar.

Utilizando la clasificación molecular se encontró que la mayoría de los tumores exhibían EMS/CIMP bajo o 0. En jóvenes, la edad de diagnóstico de los tumores IMS/CIMP alto fue menor, de 29 años. También en el grupo de CCR de aparición temprana, independientemente de la IMS, los tumores con CIMP/alto mostraron tendencia a localizarse en colon derecho; por último, EMS/CIMP bajo o 0 se asoció a diagnóstico en estadio avanzado en este grupo.

Mientras que todos los tumores con IMS/CIMP alto de los jóvenes cumplían criterios clínicos de SL, en mayores correspondieron a casos esporádicos con mutaciones en *BRAF*. Se encontraron diferencias en tumores IMS/CIMP bajo o 0 de acuerdo al grupo de edad: mayor afectación de hombres en jóvenes, mayor de mujeres en mayores, mayor componente familiar en jóvenes al contrario de predominio de casos esporádicos en mayores. El SL se presentó en el 50% de los casos de ambos grupos etarios con IMS/CIMP bajo o 0, sin mutaciones en *BRAF*.

En cuanto a los tumores con EMS, se encontró que jóvenes con EMS/CIMP alto se localizaban más en el colon derecho y en estadios más tempranos además de importante agregación familiar. Este subgrupo molecular en pacientes mayores se asoció a casos esporádicos en su mayoría. Cuando se compararon las dos poblaciones del subgrupo molecular EMS/CIMP bajo o 0, se encontró que los jóvenes tenían predominio por el colon y el recto, se distribuían homogéneamente por todos los sexos y exhibían mayor componente familiar. Además los mayores con EMS/CIMP bajo o 0

presentaron tumores primordialmente derechos, en estadios intermedios, asociados a neoplasias primarias múltiples y eran esporádicos en 79%.

El análisis de las vías de carcinogénesis es complejo y aún insuficiente para comprender todas las características del CCR. Sin embargo, los hallazgos encontrados de acuerdo a la IMS y al estado CIMP permitieron realizar un análisis más detallado y describir las diferencias entre las dos poblaciones. Se pudo determinar que la edad también constituye un factor diferenciador, en cuanto a las características clínicas y familiares de los pacientes, cuando se clasifica el CCR de acuerdo a sus bases moleculares.

SUMMARY

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is the second most common malignancy in developed countries and the first cause of death by tumor. In Spain, its prevalence is estimated around 26,500 cases per year. Colon cancer represents two thirds of all CRC. 97% of CRC are adenocarcinomas.

About 75% of patients with CRC have sporadic disease. However, between 5 and 10% have a hereditary component and the remaining 20-25% have a familial history of CRC.

Genome alterations that give rise to cancer are genetic (changes in DNA sequence) and epigenetic (gene expression is altered but there is not a structural involvement of the gene).

The genetic model for colorectal tumorigenesis proposed by Fearon and Vogelstein constituted a basis for understanding cancer development. Over time, three main carcinogenetic pathways have been identified: the suppressor pathway or chromosomal instability (CIN), the mutator phenotype or microsatellite instability pathway (MSI) and the CpG island methylator phenotype (CIMP) also called serrated pathway. These pathways are not mutually exclusive.

Therefore, CRC is heterogeneous and although a preferred pathway may exist, the accumulation of mutational changes and the overlapping between carcinogenetic pathways make every tumor phenotype unique.

CIN is associated with sporadic CRC in 80 to 85% of cases. CIN is also associated with hereditary diseases such as Familial Adenomatous Polyposis (FAP), MYH-associated polyposis (MAP) and juvenile polyposis, among others. CIN tumors are also called microsatellite-stable tumors (MSS). MSI tumors represent 10 to 15% of all CCR and are present in both hereditary and sporadic cases. In hereditary cases, as in Lynch syndrome (LS), MSI is due to germline mutations in mismatch repair (MMR)

genes, whose role is to correct errors in base-pair matching during replication of DNA. In sporadic cases, MSI is due to epigenetic silencing of *MLH1*. MSI tumors are more frequently located in the right colon, have a tendency to produce mucin, to show signet ring cells and to exhibit poor differentiation. CIMP occurs in 35% of CCR and have a distinct clinical, pathologic and molecular profile such as an association with proximal location in the colon, female sex, poor differentiation, MSI and *BRAF* mutations.

Given the multiple molecular variables, a molecular classification has been gaining strength, based on the three global cellular events (CIN, MSI and CIMP). It is summarized in four subtypes or categories: MSI/ CIMP high, MSI/CIMP low-0, MSS/ CIMP high and finally, MSS/CIMP low-0.

Usually, the age of onset of the CRC is among the seventh and eighth decades of life. Only 2-10% are diagnosed in people under 40 or 50 years. Early-onset CRC is a specific group but still heterogeneous. On the one hand, early-onset CRC has a higher frequency of familial aggregation along with specific clinical manifestations and anatomic-pathological features such as the involvement of the right colon and male sex, poor differentiation, mucin production, presence of synchronous/metachronous lesions and diagnosis in advanced stages.

However, early-onset CRC is not always associated with hereditary patterns. Some tumors of this subgroup exhibit MSS as in sporadic CRC, and these tumors have altered APC, β -catenin and p53. Others have aneuploidy as in CIN and others have diploid as in MSI. However, neither the genetic pathways nor the clinical behavior are clearly established. For these reasons, early-onset CCR represents a particular interest.

The aim of this study was to compare two groups of patients with CRC and distinct ages by the analysis of clinical and familiar features, and anatomic-pathological and molecular findings. Early-onset CRC included 45 years old patients or younger. The comparison group consisted of elderly patients aged 70 years or above. 88 consecutive patients were included in the early-onset CRC group 6 of which were excluded because of FAP diagnosis. 97 patients were analyzed in the other group of elderly patients during the same period. A descriptive and retrospective analysis was

performed. All the patients or a first-degree relative in the case of death of the index case provided written consent. This work was approved by the ethics committee of 12 de Octubre University Hospital.

A full three-generation family cancer history and colorectal paraffin-embedded tumor tissue sample were obtained from each proband. Cancer diagnoses were verified by reviewing medical and pathological reports. A pathologist reviewed all cases. Personal, familiar and clinicopathologic information was obtained. To clarify the carcinogenetic pathway MSI was determined as well as *BRAF* mutations and methylation status. MSI analysis was performed using Bethesda panel and immunohistochemistry (IHC). When MSI was detected, mutations in MMR were studied. CIMP was classified into three stages of methylation: CIMP high, CIMP low and CIMP 0. Molecular classification was used for comparative analysis.

The mean age in the early-onset CRC group was 39.5 years and 77.9 in the late-onset CRC group. In early-onset CRC, tumors were more frequently located in the left colon and in the rectum and were associated with mucin production (32%) and signet ring cells (7%). Early stages were also more frequent, according to Dukes classification, and a significant proportion of polyps during follow-up (56%) were present, usually adenomatous (48%). In the late-onset CRC group, features were different being left colon location less frequent, and exhibiting a lower proportion of anatomical and pathological features described in the early-onset CRC; elderly tumors were also diagnosed in more advanced stages.

Early-onset CRC was associated with more family history of cancer than the elderly. Late-onset CRC was sporadic in 80,4%. 20% of early-onset CRC fulfilled Amsterdam II criteria, 26% exhibited familial aggregation for LS-related neoplasms and 15,9% for LS unrelated neoplasms. Interestingly, younger patients showed sporadic CRC in 40%.

15% of early-onset tumors were MSI from which 83% corresponded to LS. MMR mutation was detected in 83%. Compared with MSS cases, in this group of younger patients, MSI tumors showed, as expected, LS features: earlier age of onset (34

vs. 40 years), more right colon location (50% vs. 20%), earlier stage at diagnosis (82% vs. 57% for stages A and B) and more family history of cancer. In elderly, 9% of tumors were MSI produced by *BRAF* mutations and these CRC were more frequent in women. Early-onset MSS tumors, compared with the late-onset, were found in earlier stages and had different location, lower proportion of multiple primary neoplasm and greater familial aggregation.

CIMP was analyzed on 68 young patients. 19% had CIMP high tumors that were more often associated with familial aggregation (Amsterdam II criteria fulfilled and LS-related neoplasms) and right colon location. In the elderly, most patients had CIMP 0 (49%). In the group of late-onset CCR, CIMP high/MSI tumors were associated with *BRAF* mutations and absence of Mlh1 protein expression due to hypermethylation. CIMP category comparison showed that CIMP high was associated with MMR mutations, more mucinous tumors and family history of cancer in younger. However, CIMP high in elderly was predominantly associated with sporadic MSI cases. CIMP low tumors low in younger patients were most frequently located in the left colon while the same methylator phenotype in elderly showed higher tendency to develop multiple primary neoplasms. Finally, most of the CIMP 0 early-onset CRC were located in the left colon and rectum, diagnosed at earlier stages and had an important family history of cancer.

Molecular classification showed that most of the tumors exhibited MSS / CIMP low or 0. In younger, age at diagnosis of MSI / high CIMP tumors was lower, 29 years old. Also in this early-onset CRC group, regardless of the MSI, CIMP high tumors located more frequently in the right colon; finally, MSS / CIMP low or 0 was associated with advanced-stage at diagnosis in this group.

Although early-onset MSI / CIMP high tumors were LS cases, all of them fulfilling Amsterdam II criteria, in the elderly group these tumors were associated with *BRAF* mutations, all of which were sporadic. Differences between both MSI / CIMP low or 0 groups were observed regarding sex (early-onset cases were mostly male whereas elderly cases were all female) and the familial cancer component (early-onset

SUMMARY

CRC showed an important familial component related with LS whereas all the elderly cases were sporadic). LS cases accounted for 50% in both early- and elderly-onset MSI / CIMP low or 0 groups and no *BRAF* mutations were found.

Comparisons in the MSS groups were performed. Early-onset MSS / CIMP high tumors showed early stages at diagnosis and were mainly right sided. Familial cancer history was still important in this group, mainly aggregation for LS-related neoplasms. Elderly cases were mainly sporadic (93%). Finally comparison of MSS / CIMP low or 0 tumors in both populations showed differential features: early-onset tumors were mainly located in the left colon and rectum, were homogeneously distributed among all stages and exhibited a more important familial component. On the other hand, elderly MSS/CIMP low or 0 tumors were more frequently right sided, were intermediate stages, were frequently associated with multiple primary neoplasms and were mainly sporadic (79%).

The analysis of carcinogenetic pathways is complex and do not to explain all the features of CRC. However, the findings according to MSI and CIMP status showed differences between early-onset and late-onset CRC. Age constitutes an important criteria that differentiate clinical and familiar characteristics when the CRC is classified according to molecular bases.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

1. EL CÁNCER, UNA ENFERMEDAD GENÉTICA.

El cáncer es una enfermedad frecuente y constituye la segunda causa de muerte en los países desarrollados. El número de casos sigue en aumento debido al crecimiento de la población y a su envejecimiento así como a cambios en el estilo de vida que constituyen factores de riesgo tales como el sedentarismo, la dieta rica en grasas o el tabaco.

El cáncer se caracteriza por una proliferación excesiva y descontrolada de un grupo de células causado por la acumulación de alteraciones a nivel de su genoma. El tumor o neoplasia inicial adquiere capacidad de invasión y posteriormente de migración hasta otros tejidos y órganos, proceso conocido como metástasis.

La formación de un tumor o carcinogénesis es un proceso complejo y heterogéneo en el cual diversas alteraciones moleculares producen la transformación de una célula normal en una maligna, con la consiguiente variabilidad morfológica y pronóstica que presentan los tumores ^{1,2}.

Las alteraciones en el genoma que dan origen a la proliferación celular son de dos tipos fundamentalmente: genéticas (cambios en la secuencia del ADN) y epigenéticas. Entre las primeras se encuentran las deleciones de regiones cromosómicas, con la posible pérdida de secuencias de genes implicados en la regulación celular, las mutaciones génicas que pueden activar o inactivar distintas proteínas, las amplificaciones génicas responsables de la sobreexpresión de genes específicos y las pérdidas o ganancias de cromosomas completos. Las alteraciones epigenéticas, sin embargo, no afectan estructuralmente a los genes sino a la expresión de los mismos. El silenciamiento de genes debido a la hipermetilación de las islas CpG localizadas en sus promotores, como en casos del gen *MLH1* o el gen *BRCA1*, son ejemplos de estas alteraciones epigenéticas ³.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los cánceres son esporádicos y consecuencia de mutaciones a nivel somático. Sin embargo, entre un 5 y un 10% de todos los cánceres tiene un componente hereditario cuyo origen son mutaciones germinales que contribuyen al inicio de la carcinogénesis ⁴.

Existen dos tipos diferentes de genes implicados en el desarrollo del cáncer: los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los primeros son variantes alteradas de genes principalmente implicados en el crecimiento y la proliferación celular, lo que contribuye a la conversión de una célula normal en cancerosa. Los genes supresores de tumores se clasifican a su vez en “porteros” (*gatekeepers*) y “guardianes” (*caretakers*). Los “porteros” inhiben el crecimiento celular o promueven la apoptosis. Los “guardianes”, sin embargo, cuando se encuentran inactivos no intervienen directamente en el crecimiento celular sino que dan lugar a la inestabilidad genómica y, por lo tanto, a un aumento general de la velocidad de mutación y al desarrollo del cáncer ⁵.

En el caso particular del cáncer colorrectal (CCR), desde la formulación del modelo de carcinogénesis por Fearon y Vogelstein en 1990 ⁶ se han identificado tres grandes vías de carcinogénesis: la vía supresora o de la inestabilidad cromosómica (IC), la vía mutadora o de la inestabilidad de microsatélites (IMS) y la vía metiladora o del fenotipo metilador (FM) de islas CpG. Estas tres vías no son mutuamente excluyentes. El CCR no se comporta de una manera única y aunque haya una secuencia preferente, lo importante es la acumulación de cambios mutacionales que serán la causa del fenotipo definitivo ⁷. En lo referente a los síndromes de CCR hereditario, los genes responsables de las mutaciones son en su mayoría supresores “porteros” ⁸. Tienen una penetrancia y un modo de transmisión variables, por lo que se requiere la evaluación individual del riesgo para cada miembro de una familia afectada.

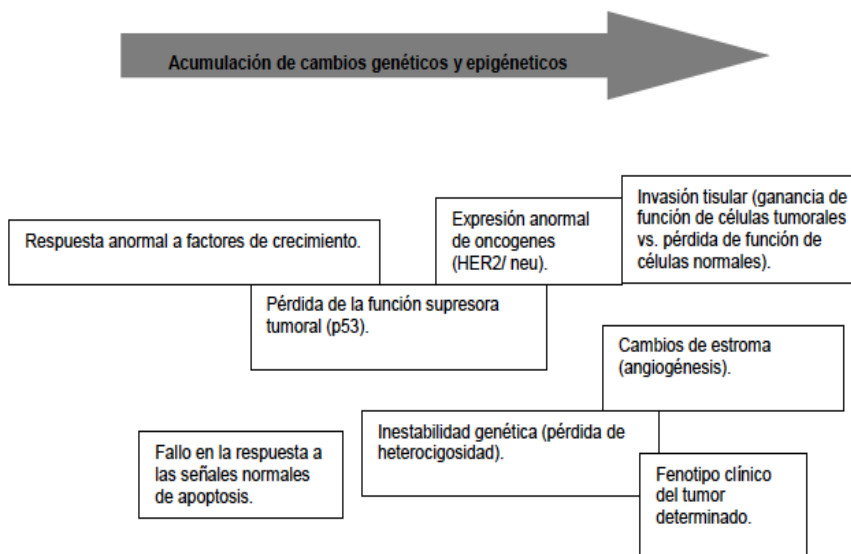
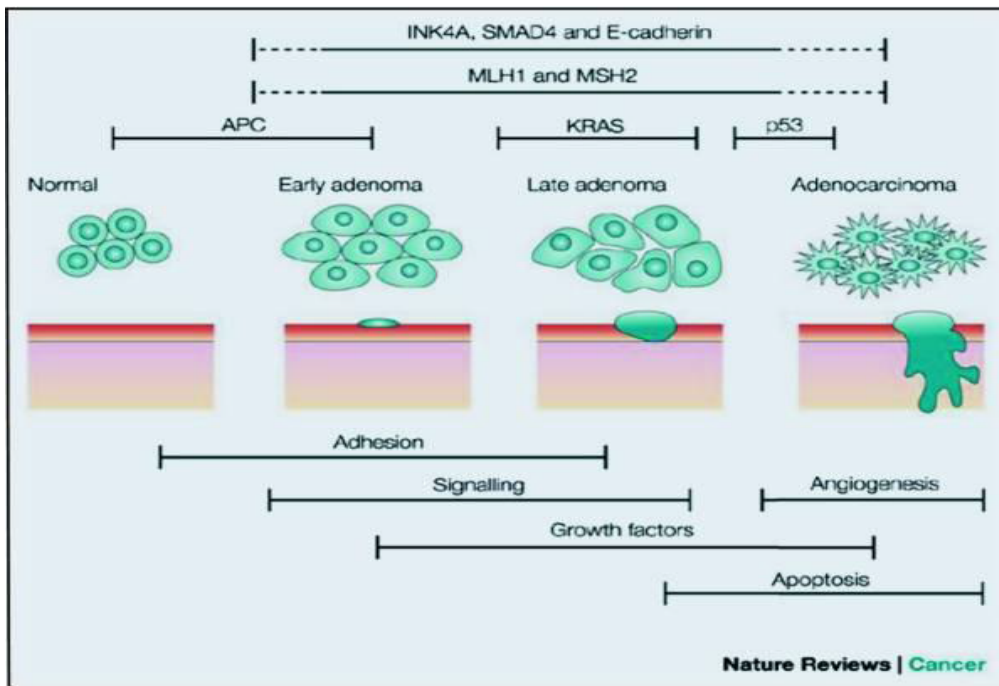


Figura 1. Secuencia adenoma-carcinoma. Principales procesos moleculares que intervienen en la carcinogénesis⁹.

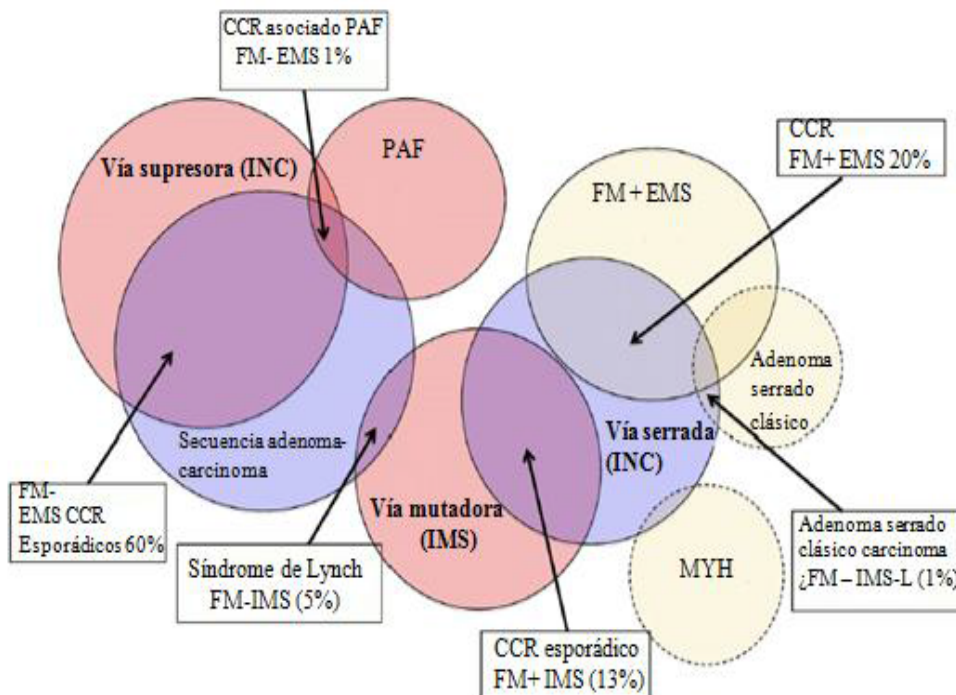


Figura 2. Representación de los diferentes grupos de CCR según las distintas vías de carcinogénesis así como los correspondientes solapamientos³.

Las formas hereditarias del cáncer suelen presentar características típicas que las diferencian de la forma esporádica. Estas características son una edad de aparición temprana, multifocalidad de los tumores o bilateralidad en caso de órganos pares, aparición de varios tumores primarios en el mismo individuo, antecedentes familiares de la misma neoplasia, alta incidencia de cáncer dentro de la familia y asociación con sobrecrecimiento corporal general generalizado o asimétrico, dismorfias, malformaciones congénitas o retraso mental.

2. EL CÁNCER COLORRECTAL. GENERALIDADES.

2.1. Epidemiología.

A nivel mundial se diagnostican unos 12.7 millones de casos nuevos de cáncer al año de los cuales el 56% aparece en los países desarrollados. El CCR constituye el tercer cáncer más diagnosticado en los varones y el segundo en las mujeres. En 2008 se estimaron 1.2 millones de nuevos casos y 608.700 muertes por CCR ¹⁰.

El CCR afecta a hombres y a mujeres de manera similar. El riesgo aumenta progresivamente con la edad, principalmente a partir de los 40 años. El riesgo acumulado de desarrollarlo es de un 2-6% en la población general. Este riesgo es mayor en personas con historia familiar de cáncer colorrectal y sobretodo en miembros de familias con algún síndrome de CCR hereditario ¹¹.

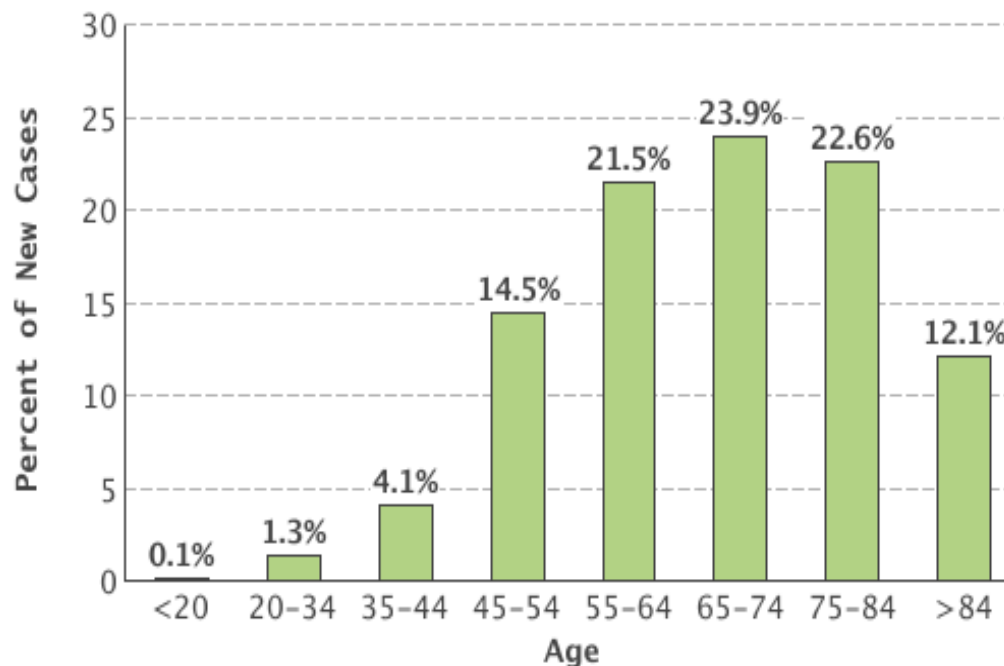


Figura 3. Porcentaje de nuevos casos de CCR por grupos de edad. Tomado de SEER 2008-2012.

En Europa, el CCR es la tercera neoplasia más común en varones, por detrás del cáncer de próstata y de pulmón. En mujeres es el segundo tipo de cáncer por detrás del de mama ¹². En España constituye la segunda causa de muerte por cáncer, por detrás del de pulmón en varones y del de mama en mujeres (datos obtenidos del Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de la Salud Carlos III, año 2007).

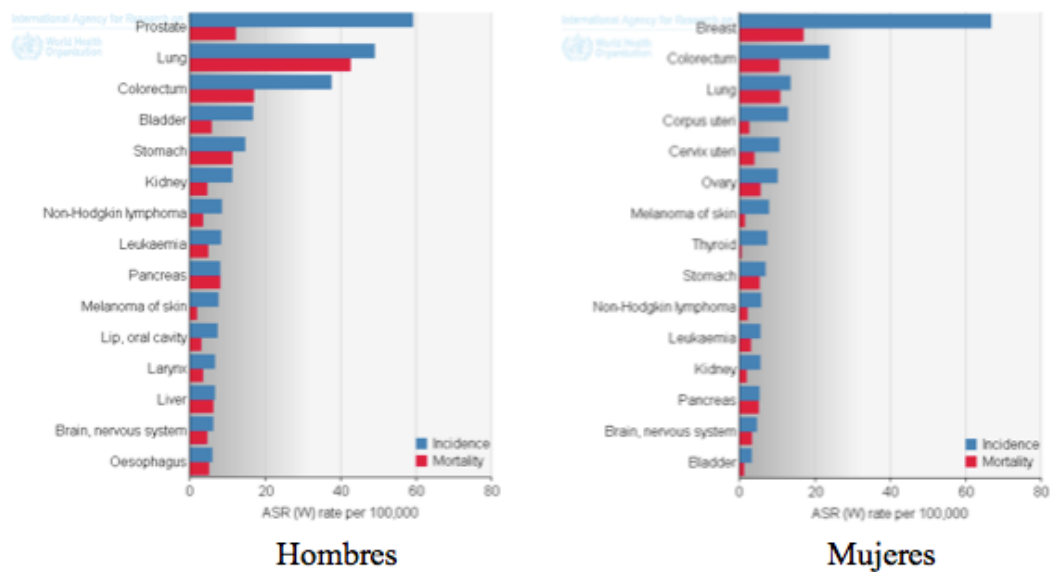


Figura 4. Cánceres más frecuentes en Europa, 2008 ^{12,13}.

2.2. Factores de riesgo. Edad e historia familiar.

Aunque la susceptibilidad hereditaria resulta en un aumento llamativo del riesgo de desarrollarlo, la mayoría de los CCR son esporádicos y no familiares. Los factores de riesgo más importantes en el desarrollo del CCR son la edad, los factores genéticos y diversos factores ambientales tales como el estilo de vida, la alimentación y el consumo de tabaco y alcohol ¹⁴.

La edad es un factor de riesgo de CCR esporádico. Es poco frecuente antes de los 40 años momento desde el cual su incidencia aumenta progresivamente ¹⁵. El riesgo de desarrollarlo es del 5 por ciento a lo largo de toda la vida y en el 90 por ciento de los casos se diagnostica después de los 50 años.

Las personas con historia personal o familiar de CCR tienen mayor riesgo que la población general. La poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP) son los síndromes hereditarios más comunes aunque sólo suponen un 5% de los casos de CCR. Además existen otros síndromes hereditarios como el síndrome de Gardner, el síndrome de Turcot, la poliposis adenomatosa familiar atenuada (PAFA) y la poliposis asociada a MYH (PAM). Este tema se desarrollará más adelante.

Los pacientes con antecedentes personales o familiares de CCR así como de pólipos adenomatosos también presentan un riesgo aumentado de desarrollar CCR. El 1,5 a 3% de los individuos sometidos a resección por CCR desarrollará lesiones metacrónicas en los primeros cinco años después de la intervención. Y la presencia de un familiar de primer grado con CCR duplica el riesgo frente a la población general. Este riesgo aumenta si son dos los familiares de primer grado afectados o si el diagnóstico en el caso índice se hace por debajo de los 50 o 60 años.

2.3. Diagnóstico del cáncer colorrectal.

Los síntomas del CCR se deben generalmente al crecimiento del tumor en la luz intestinal, al sangrado, a la afectación de estructuras cercanas o a la extensión a distancia. Así, la presencia de sintomatología asociada es a menudo una manifestación de CCR avanzado.

La mayoría de los signos/síntomas asociados a CCR son hematoquecia o melena, dolor abdominal, anemia de tipo crónico por déficit de hierro, debilidad,

pérdida de peso y/o un cambio en los hábitos intestinales. La frecuencia de estos síntomas se presentan de la siguiente manera. Síntomas menos comunes son distensión abdominal, náuseas y vómitos que hacen sospechar obstrucción. Otras presentaciones poco frecuentes son la invasión local o perforación hacia órganos vecinos tales como vejiga, vagina o intestino delgado.

La enfermedad metastásica está presente en el 20% de los pacientes con CCR en el momento del diagnóstico inicial ¹⁶. El CCR puede diseminarse por vía linfática y hematológica así como por contigüidad y por vía peritoneal. Los sitios más frecuentes son los ganglios linfáticos regionales, el hígado, los pulmones y el peritoneo. Los pacientes pueden presentar signos o síntomas relacionados con la afectación de cualquiera de estas áreas.

Existen diferentes herramientas para detectar el CCR: la detección de sangre oculta en heces, la visualización endoscópica del colon distal mediante sigmoidoscopia (sensibilidad del 60%), la colonoscopia completa (sensibilidad del 90%) o la visualización del colon mediante radiografías tras un enema opaco con bario ¹⁷⁻¹⁹. Otros métodos complementarios son la tomografía axial computarizada, la colonoscopia virtual mediante tomografía o resonancia magnética, útiles en casos específicos. La RM pélvica tiene, además, particular utilidad en la estadificación del cáncer de recto (CR).

La clasificación de los CCR por estadios se determina según la profundidad a nivel de la pared del colon, el grado de diseminación locorregional y ganglionar y la afectación de otros órganos a distancia. Esta clasificación constituye el factor pronóstico más importante y determina el tratamiento a seguir (tabla 1).

Tabla 1. Clasificaciones por estadios para el CCR (tomado de National Cancer Institute: www.cancer.gov).

Estadio	T	N	M	Dukes	MAC ^a
0	Tis	N0	M0	--	--
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1–T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3–T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2–T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1–T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3–T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1–N2	M0	C	C3
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a	--	--
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b	--	--

a. MAC: Clasificación modificada de Astler y Coller.

2.4. Bases moleculares y patogénesis del cáncer colorrectal.

El CCR sigue tres patrones de presentación que se asocian a un diferente riesgo de desarrollarlo: esporádico, hereditario y familiar.

El esporádico representa aproximadamente el 70% de todos los CCR. Es más común a partir de los 50 años y en su desarrollo se han implicado factores dietéticos y ambientales.

El patrón hereditario es el menos frecuente. Menos del 5% de los pacientes con CCR tienen una verdadera predisposición hereditaria. Este grupo se subdivide de acuerdo a si los pólipos del colon son o no, una de las principales manifestaciones de la enfermedad. Las poliposis incluyen la PAF, la PAM y los síndromes de poliposis hamartomatosos como el síndrome de Peutz-Jeghers o la poliposis juvenil ²⁰ entre otros. El CCR hereditario no polipósico incluye el SL y posiblemente el denominado CCR familiar tipo X ²¹. Estas condiciones están asociadas con un riesgo alto de desarrollar CCR y en muchos casos es posible identificar la mutación genética causante.

El tercer patrón y menos conocido es el llamado “CCR familiar” que representa hasta un 25% de todos los casos. Los pacientes afectados tienen antecedentes familiares de CCR pero el patrón no coincide con los síndromes hereditarios descritos anteriormente. Los individuos de estas familias tienen un mayor riesgo de desarrollar CCR aunque inferior al de los síndromes hereditarios. Tener un único familiar afectado en primer grado aumenta el riesgo de desarrollar CCR 1,7 veces en comparación con la población en general. El riesgo aumenta si son dos los familiares de primer grado afectados o si el caso índice se diagnostica antes de los 55 años. Las anomalías genéticas subyacentes al CCR familiar aún no se comprenden. Se ha postulado que estas familias representan una variante del CCHNP ²² y, de hecho, se han identificado anomalías en los genes de reparación del ADN en un porcentaje importante de estos pacientes ^{23,24}. Sin embargo, los resultados de los estudios de asociación genómica sugieren que puede haber un gran número de loci de susceptibilidad, algunos de los cuales son comunes y cada uno ejerce una pequeña influencia sobre el riesgo de desarrollar CCR ²⁵.

2.4.1. Secuencia adenoma-carcinoma.

Se asume que la transformación del epitelio del colon normal a cáncer invasor es producido por cambios genéticos específicos. Las mutaciones genéticas pueden ser heredadas o adquiridas.

La mayoría de los CCR surgen a partir de adenomas (o pólipos adenomatosos) sobre los que aparecen displasias. Los pólipos se forman en el colon cuando los mecanismos de regulación de la renovación epitelial se interrumpen. Por lo general, la proliferación se produce exclusivamente en la base de la cripta.

La hipótesis de que el CCR invasivo se desarrolla a partir de precursores precancerosos tiene apoyo patológico, epidemiológico y se deduce de la observación clínica.

- Carcinomas en fase temprana se ven con frecuencia dentro los pólipos adenomatosos de gran tamaño y las áreas de cambio adenomatoso a menudo se encuentran alrededor de CCR.
- Los adenomas y carcinomas se encuentran en localizaciones similares en el intestino grueso y los adenomas se observan típicamente 10 a 15 años antes de la aparición de CCR tanto en los casos esporádicos como en los familiares.
- En los modelos animales, los adenomas se desarrollan antes de los carcinomas y los carcinomas se desarrollan exclusivamente en el tejido adenomatoso.
- La capacidad de reducir la incidencia del CCR a través de la extirpación endoscópica de pólipos se ha demostrado en ensayos controlados en seres humanos²⁶.

En 1990, Fearon y Vogelstein describen las bases moleculares del CCR como un proceso de varios pasos en los que cada evento genético acumulado confiere una ventaja selectiva de crecimiento de las células epiteliales del colon⁶. Las mutaciones del gen

APC, una característica común tanto en los CCR hereditarios como en los esporádicos, se producen al inicio del proceso mientras que las mutaciones en el gen supresor p53 generalmente ocurren de forma tardía.

Además de las mutaciones puntuales, existen otros cambios genéticos que están implicados en la carcinogénesis tales como la metilación del ADN alterado y los reordenamientos genéticos, las ampliaciones, la sobreexpresión y las eliminaciones.

2.4.2. Vía de los pólipos serrados.

Recientemente se ha descrito una vía alternativa de desarrollo de CCR a partir de pólipos serrados^{27,28}. Los pólipos serrados son los pólipos más frecuentes en el colon después de los adenomas²⁹. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), se dividen en tres grupos de acuerdo a su morfología que incluyen pólipo/adenoma serrado sésil, adenoma serrado tradicional y pólipo hiperplásico. Las dos primeras formas están principalmente implicadas en el desarrollo de CCR.

La vía genética y epigenética para el desarrollo de carcinoma incluye mutaciones en *BRAF*, fenotipo metilador y la posibilidad de inestabilidad de microsatélites en el caso de los pólipos serrados sésiles, y se asocia a mutaciones en *KRAS* y al silenciamiento de genes reparadores de DNA en el caso de los adenomas serrados tradicionales.

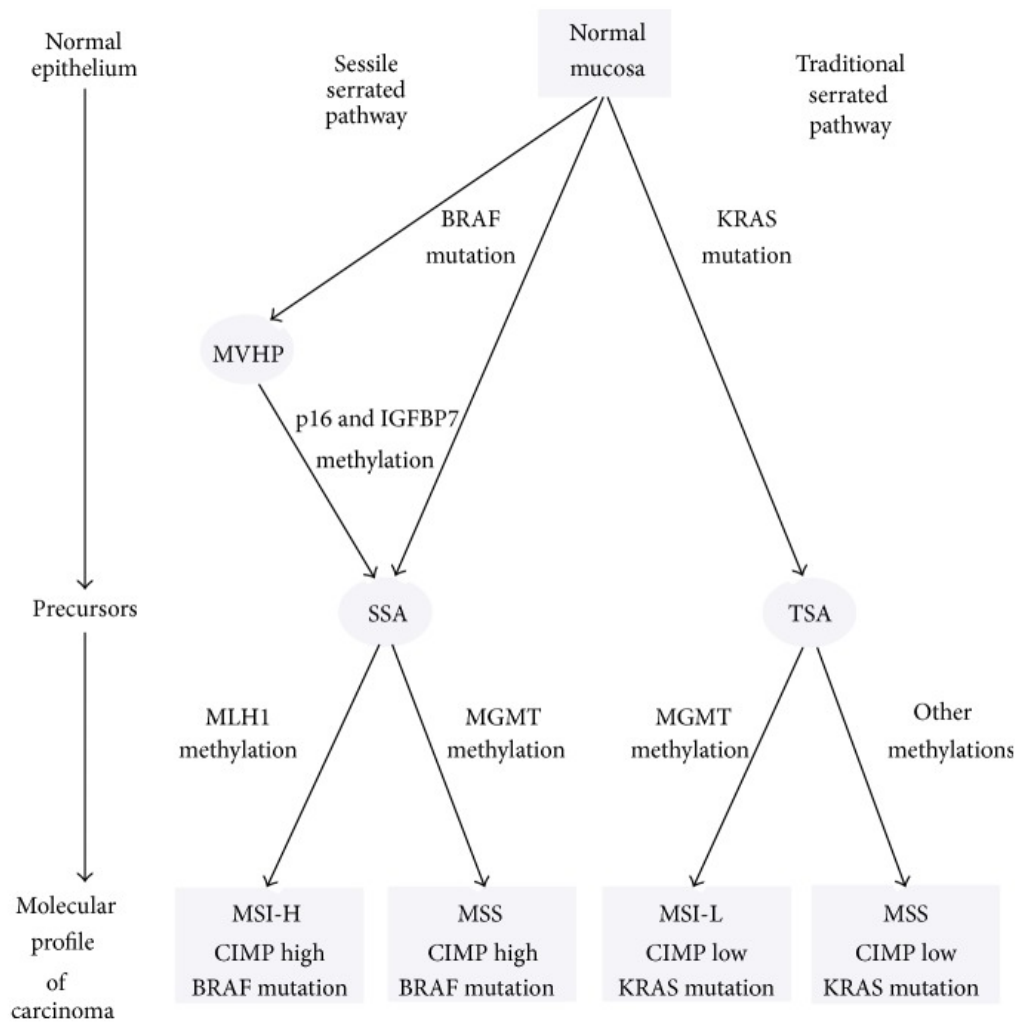


Fig 5. Vía de los pólipos serrados ²⁸.

El síndrome de poliposis serrada es una condición específica que puede ser heredada y que se asocia a un riesgo de CCR en un 25-40% ³⁰ (figura en inglés).

2.4.3. Vías moleculares de carcinogénesis colorrectal.

Existen al menos tres vías moleculares que conducen a la carcinogénesis colorrectal (Tabla 2): la inestabilidad cromosómica que es típica de la PAF y de la mayoría de las formas esporádicas, la vía de los errores en la reparación del ADN que está implicada en el SL así como en algunos CCR esporádicos, y la vía de la hipermetilación o fenotipo metilador (FM) que se caracteriza por una alta frecuencia de metilación de islotes *CpG* (fenotipo metilador de islotes *CpG* (CIMP)³¹. Estas tres vías no son excluyentes por lo que varias pueden estar implicadas en la formación de un mismo CCR.

Tabla 2. Características diferenciadoras entre los CCR que presentan inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites y fenotipo metilador. Modificado de la Chapelle 2003⁴.

<i>INESTABILIDAD CROMOSÓMICA</i>	<i>INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES</i>	<i>FENOTIPO METILADOR</i>
Pérdida de heterocigosidad generalizada	Inestabilidad de microsatélites generalizada	Metilación de islas CpG promotoras de genes
Aneuploidía o poliploidía	Diploidía	Alteraciones epigenéticas
Localización preferentemente izquierda	Localización preferentemente derecha	Localización preferentemente derecha
Características histológicas: bien diferenciados	Características histológicas: pobremente diferenciados	Características histológicas: pobremente diferenciados
No infiltración linfocítica	Infiltración linfocítica	
Raramente mucinosos	Frecuentemente mucinosos	
Peor pronóstico	Mejor pronóstico	

- *Inestabilidad cromosómica* (IC): Es la alteración más frecuente y se encuentra presente en el 75-80% de los CCR. Es el resultado de mutaciones que pueden ser producidas por la activación de proto-oncogenes como *K-RAS* y *MIC* o por la inactivación de genes supresores como *APC*, *p53*, *DCC*, *SMAD2* y *4*³²⁻³⁴. Estos tumores pueden ser heredados (como en la PAF) aunque es un hallazgo más típico

de los esporádicos y se caracterizan por graves anomalías cromosómicas que incluyen deleciones, inserciones y pérdidas de heterocigosidad.

- *Errores en la reparación del ADN.* Esta vía está implicada en CCR hereditarios como el SL. La clave de esta vía es la disfunción de las enzimas reparadoras del ADN (MMR) como resultado de la mutación de genes cuya función es la de corregir los errores durante la replicación del ADN o de iniciar la apoptosis cuando el daño en el ADN es irreversible. Los genes más frecuentemente implicados son *MLH1* o *MSH2*.

Las células con deficiente capacidad de reparación del ADN acumulan errores en secuencias cortas de bases de nucleótidos que se repiten decenas a cientos de veces en el genoma llamados microsatélites. La característica de los tumores con defectos en MMR es la IMS.

Además de ser el sello biológico del SL, la IMS también se encuentra en el 15% de los CCR esporádicos. Sin embargo, en la mayoría de estos casos, el silenciamiento de los genes no se debe a una mutación MMR específica sino a un fenómeno epigenético, la hipermetilación de los genes promotores de enzimas de MMR (*MLH1* por lo general), que conlleva al silenciamiento transcripcional de la expresión génica³⁵.

- *Fenotipo metilador.* Se produce por alteraciones epigenéticas como la hipometilación del ADN y la pérdida de la impronta, así como la hipermetilación del ADN con el consecuente silenciamiento de la expresión de ciertos genes incluyendo MMR^{35,36}. Los CCR que tienen una frecuencia particularmente alta de islotes *CpG* se conocen como tumores CIMP. El defecto puede dar lugar a la hipermetilación de la región promotora de las enzimas MMR como *Mlh1* y el silenciamiento de la expresión de genes³⁷.

Las mutaciones activadoras en el gen *BRAF* ocurren casi exclusivamente en CCR IMS y CIMP (+) (que no son portadores de mutaciones en *K-RAS*). Las mutaciones en *BRAF* son particularmente frecuentes en los fumadores con CCR esporádico ³⁸.

Casos esporádicos de CCR con un alto grado de IMS y una alta incidencia de la mutación *BRAF* constituyen un subgrupo clínicamente distinto que está claramente asociado con el desarrollo de pólipos serrados ³¹.

El fenotipo metilador se ha dividido en tres categorías de acuerdo al grado de metilación. CIMP alto, CIMP bajo y CIMP negativo o 0. Cada categoría se asocia a características específicas, clínicas, anatómo-patológicas y moleculares ⁴⁰.

2.4.4. Clasificación molecular del CCR.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se deduce la importancia de desarrollar una clasificación según el estado genético y epigenético que permita correlacionar el CCR con los eventos moleculares. Dichas correlaciones son relevantes pues pueden proveer respuestas de la patogénesis del CCR así como proponer o explicar la existencia de nuevos subtipos moleculares.

Por este motivo, se ha descrito una clasificación molecular que ha ganado relevancia y que se basa en los tres eventos celulares conocidos: IC, IMS y CIMP (este último igual a FM). Dado que la IC se asocia primordialmente a tumores EMS, el CCR se puede clasificar en cuatro subtipos moleculares: IMS y CIMP alto, IMS y CIMP bajo o 0, EMS y CIMP alto y por último EMS y CIMP bajo o 0 ^{41,42}. Cada subtipo tendría asociaciones moleculares específicas (*BRAF*, *KRAS*) y características patológicas propias.

	CIMP-H	CIMP-L	CIMP-0
MSI-H	Gr. 1 10%	Gr. 2 5%	
MSI-L	Gr. 3 5-10%	Gr. 4 5%	Gr. 6 40%
MSS		Gr. 5 30-35%	

Figura 6. Grupos de CCR de acuerdo a IMS y a CIMP ⁴⁷.

3. EL CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO Y FAMILIAR.

La asociación familiar constituye un evento frecuente en el CCR representando hasta en un 30% de todos los casos. Un 5% de éstos corresponden a formas hereditarias debidas a mutaciones germinales como son el SL y la PAF entre otros. El 25% restante corresponde a casos en los cuales existe agregación familiar pero no existe una alteración genética específicamente identificada ni un modelo de herencia definido. Dentro de este grupo se puede situar el síndrome de CCR familiar tipo X ^{21,43}.

3.1. Síndrome de Lynch – Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico.

3.1.1. Concepto y variantes.

El SL ⁴⁴ es la forma más común de CCR hereditario representando un 2 - 4% de todos los casos de CCR ^{45,46}.

La primera descripción de una familia con SL fue realizada en 1913 por Aldred Scott Warthin, patólogo de la universidad de Michigan ⁴⁷. Esta familia presentaba una incidencia inusualmente alta de CCR, gástrico y de endometrio a edades jóvenes. Sesenta años más tarde, Henry Lynch y Anne Krush identificaron a otras familias con características similares ⁴⁸. Es en el año 2000 cuando se identifica en estas familias una mutación del gen *MSH2*.

El SL es una enfermedad con herencia autosómica dominante causada por una mutación germinal en uno de los genes del sistema de reparación del ADN (MMR). La penetrancia de la mutación es incompleta, no superando el 80%. Se debe a una mutación en los genes de reparación de bases desapareadas (“mismatch repair genes” MMR) del ADN: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* y *PMS2* ⁴⁹. Más del 90% de las familias con CCHNP genéticamente caracterizado presentan mutaciones en los genes *MSH2* (38%) y *MLH1* (59%) ^{50,51}. El defecto de estos genes lleva a múltiples errores en las secuencias repetitivas del ADN (los microsatélites) en todo el genoma de los tumores. Esta forma de inestabilidad genómica se denomina IMS.

Una variante del SL es el síndrome de Muir-Torre en el que, además del CCR, aparecen tumores cutáneos tales como los adenomas sebáceos, los adenocarcinomas o lo queratoacantomas ⁵². El síndrome de Turcot es otra variante en la que aparecen tumores del sistema nervioso central, principalmente gliomas. El síndrome de Turcot se asocia a mutaciones en *MLH1*, *MSH2* y *PMS2* pero también en APC ^{53,54}.

3.1.2. Características clínicas.

Los pacientes con SL tienen un riesgo aumentado de presentar CCR así como en otras localizaciones endometrio, ovario, intestino delgado, epitelio hepatobiliar, epitelio urotelial, piel y cerebro ⁴⁴. El riesgo de cáncer en SL varía en función de factores geográficos/ambientales como por ejemplo el cáncer gástrico asociado a SL que es más

común en China y Corea así como en función del gen MMR mutado lo que condiciona la edad de aparición y los órganos afectados.

Los pacientes que presentan este síndrome desarrollan el CCR a una edad más temprana, con una edad media de 45 años, unos 20 años antes que en el caso de CCR esporádico. El riesgo de desarrollar CCR en el SL es de aproximadamente el 70%⁵⁵. De forma similar, la edad media de aparición de cáncer de endometrio es alrededor de los 50 años, 10 años antes que la población general con cáncer de endometrio esporádico. El cáncer de endometrio constituye la segunda neoplasia más común en el SL, con un riesgo de desarrollarlo a lo largo de la vida del 30-60%^{56,57}.

El CCR que aparece en el SL presenta, además, otras características destacables. Se asocia a una mayor incidencia de CCR sincrónico (7-10%) y/o metacrónicos (20-40%)^{58,59}.

El CCR en el SL se localiza con mayor frecuencia en el colon proximal. El tumor asociado al SL tiene una histología característica con células en “anillo de sello”, es mucinoso o pobremente diferenciado, con infiltración linfoide peri tumoral, diferenciación mucinosa, reacción linfocítica o patrón de infiltración *Crohn-like* o de crecimiento medular⁶⁰⁻⁶².

La frecuencia de pólipos en estos pacientes es baja. Sin embargo, cuando se presentan, tienen ciertos rasgos diferenciadores de aquellos de la población general: aparición en edades más tempranas, mayor tamaño, más frecuentemente vellosos, con características displásicas y una progresión a la malignización más rápida. Se sitúan preferentemente a nivel proximal.

A partir del Registro Holandés de CCHNP se ha podido determinar la historia natural de este síndrome⁶³: el primer adenoma se desarrollaría alrededor de los 43 años y el CCR a los 46. Esto denota una aceleración en la secuencia adenoma-carcinoma, diferente del lapso de 10 a 15 años en el CCR esporádico. De esta forma se puede

caracterizar el SL por el desarrollo de al menos un adenoma en el colon o recto, por el diagnóstico a edad temprana y por el aumento de probabilidad de que el adenoma degenera^{64,65}.

3.1.3. Criterios clínicos diagnósticos.

Hasta hace poco más de 20 años, el diagnóstico de SL sólo se podía hacer basándose en la historia personal y familiar de cáncer. En 1990, el grupo colaborador internacional de CCHNP propuso los denominados “criterios de Ámsterdam”, criterios uniformes mínimos que indicaban al grupo de pacientes en riesgo de padecer este síndrome y en quienes se debían estudiar los genes implicados⁶⁶. Posteriormente estos criterios fueron revisados por el mismo grupo con el fin de incluir la posibilidad de aparición de tumores extracolónicos, los criterios de Ámsterdam II⁶⁷.

En 1996 se propusieron los criterios de Bethesda^{68,69} por varios motivos entre los cuales destaca lo restrictivo que eran los criterios de Ámsterdam con lo cual se puede excluir el diagnóstico en familias con pocos miembros. Estos criterios de Bethesda incluyen casi todas las condiciones clínicas de sospecha del síndrome y además orientan acerca del tipo de tumor colorrectal que precisa un análisis específico tal y como el estudio de IMS o como el estudio inmunohistoquímico de las proteínas de reparación. Estos criterios tienen en cuenta las características de localización del tumor, el grado de diferenciación o la presencia de células en “anillo de sello”. En una revisión posterior de los criterios de Bethesda, se amplió el rango de edad para la selección de candidatos⁷⁰ (tabla 3).

Tabla 3. Criterios diagnósticos de SL.

<p>Ámsterdam I</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tres o más familiares con CCR confirmado histológicamente, uno de los cuales ha de ser familiar de primer grado de los otros dos, descartada la PAF. 2. Al menos han de estar afectadas dos generaciones consecutivas. 3. Uno o más casos de cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años.
<p>Ámsterdam II</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tres o más familiares con un cáncer asociado al CCHNP, confirmados histológicamente, (colorrectal, endometrio, intestino delgado, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro, tracto hepatobiliar, tumores sebáceos de piel), uno de los cuales es familiar de primer grado de los otros dos, descartada la PAF. 2. Los cánceres han de aparecer al menos en dos generaciones sucesivas. 3. Uno de los tumores ha de ser diagnosticado antes de los 50 años. 4. Se debe descartar la Poliposis adenomatosa familiar.
<p>Bethesda revisado</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. CCR diagnosticado en un paciente menor de 50 años. 2. CCR sincrónicos, metacrónicos, u otros tumores asociados al CCHNP, independientemente de la edad. 3. CCR con hallazgos histológicos de linfocitos infiltrantes, reacción linfocitaria tipo Crohn, diferenciación mucinosa/anillo de sello o patrón de crecimiento medular (histología IMS-H), diagnosticado antes de los 60 años. 4. Pacientes con CCR y un pariente de primer grado que presenta un tumor asociado al síndrome de Lynch, y con uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años. 5. Pacientes con CCR, con dos o más parientes de primer o segundo grado, con un tumor asociado al síndrome de Lynch, independientemente de la edad.

3.1.4. Bases genéticas.

a. Genes de reparación de los errores de emparejamiento del ADN.

El SL es debido a las mutaciones germinales en los genes MMR cuya función es la de corregir los errores de emparejamiento de las bases durante la replicación del ADN o de iniciar la apoptosis cuando el daño en el ADN no es reparable. La inmensa mayoría de los casos son debidos a mutaciones en los genes MMR *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* y *PMS2*. Mutaciones en otros genes MMR (*MLH3*, *MSH3*, *PMS1*) se han encontrado en familias con SL pero su significado clínico no se ha establecido. De los diferentes genes MMR, las mutaciones en *MSH2* o *MLH1* son responsables de un 90% de las mutaciones de la línea germinal en SL.

Recientemente, también se han identificado mutaciones epigenéticas transmisibles en el gen *EPCAM* (gen no MMR) como causa de SL. Se ha demostrado que las grandes deleciones en el extremo 3' del gen *EPCAM* (anteriormente llamado TACSTD1) puede provocar la inactivación del gen *MSH2* ⁷¹.

Los genes MMR son genes supresores: los pacientes con SL heredan una copia defectuosa de un pariente y la carcinogénesis se desencadena cuando un gen normal solitario en una célula muta o se pierde, de tal forma que los emparejamientos del DNA no pueden volver a ser reparados en dicha célula. El MMR defectuoso produce entonces una acumulación de mutaciones lo que conlleva a la formación del tumor.

b. Inestabilidad de microsatélites (IMS).

La característica de los tumores con MMR defectuosos es la IMS. Los microsatélites son regiones en donde una secuencia corta de ADN (de hasta 5 nucleótidos) se repite. Existe un amplio número de dichas secuencias en el genoma

humano aunque la mayoría no codifica ADN. Las alteraciones que ocurren en el emparejamiento de las bases durante la replicación del ADN son habitualmente reparadas por las proteínas MMR. En tumores con alteraciones de MMR, este mecanismo falla y los microsatélites mutan alterando el número de las repeticiones de las secuencias y por tanto el tamaño de estos microsatélites, lo que se denomina IMS. En este tipo de tumores, más de la mitad de los microsatélites exhiben esta característica.

Un 15% de los CCR esporádicos presentan IMS. La mayoría ocurren en personas mayores y son debidos a la inactivación de MMR por hipermetilación somática de *MLHI* lo que ocasiona su silenciamiento ^{72,73}. Este mecanismo no es hereditario. Sólo el 20-25% de los tumores con IMS pertenecen al síndrome de Lynch.

La IMS se utiliza como marcador de la deficiencia del sistema MMR, de tal manera que se recomienda el análisis de la misma en todos los CCR diagnosticados en pacientes que cumplen los criterios de Bethesda. Más del 90% de los CCR de las familias con criterios de Ámsterdam presentan IMS y aunque la sensibilidad de esta característica es alta, la especificidad es menor puesto que la mayoría de los CCR con IMS son esporádicos ⁷⁴.

Los dos grupos de CCR con IMS (esporádico y asociados a SL) se pueden diferenciar por la medición directa del estado de metilación de *MLHI* en el tumor, o más simplemente por el análisis genético del gen *BRAF*. Por razones que todavía no están claras, la activación de mutaciones en *BRAF* son casi universales en casos esporádicos con IMS, pero son poco frecuentes en los cánceres asociados al síndrome de Lynch. La identificación de una mutación *BRAF* en un CCR con IMS esencialmente descarta el SL ⁷⁵

En 1997 se planteó la utilización de un panel de cinco marcadores de microsatélites para la evaluación del ADN, denominado “panel de Bethesda”: *BAT25*; *BAT26*; *D2S123*; *D5S346* y *D17S250* ⁷⁶. Si dos de los cinco son inestables, el tumor se

describe como de alta IMS; si es sólo uno, se describe como de baja IMS; y si no presenta, se considera con estabilidad de microsatélites (EMS).

Los CCR con alta IMS muestran características diferenciadoras. Entre ellas cabe destacar: patrón de diferenciación histológica pobre, localización predominante proximal al ángulo esplénico, mayor invasión parietal y menor frecuencia de extensión ganglionar y hematogena. Además, estos tumores presentan un mejor pronóstico tras cirugía, una peor respuesta al fluorouracilo y frecuente asociación con tumores sincrónicos y/o metacrónicos ⁷⁷⁻⁸⁴.

c. Genotipo y fenotipo.

Aparentemente existen diferencias sustanciales en las características clínicas del SL dependiendo del gen mutado en MMR en la línea germinal.

El riesgo de desarrollar cualquier tipo de cáncer (80%) y el riesgo de CCR (50-70%) es similar, en el SL, en familias con mutaciones en *MLH1* y *MSH2*. Sin embargo, el riesgo de desarrollar cáncer endometrial y otros tumores extracolónicos parece estar aumentado en familias con mutación *MSH2* ⁸⁵⁻⁸⁷.

Familias con mutaciones *MSH6* y posiblemente *PMS2* parecen tener un fenotipo atenuado de cáncer (una edad más avanzada de diagnóstico de cáncer y una penetrancia más baja) en comparación con familias con mutaciones *MLH1* y *MSH2*. Se calcula que el riesgo de cáncer acumulado a los 70 años en pacientes con mutaciones en *PMS2* es de tan sólo 15 a 20% para CCR, un 15% para cáncer de endometrio y sólo de 25 a 32% para cualquier otro cáncer asociado a SL ⁸⁸ lo que sugiere un fenotipo muy atenuado para las mutaciones de este gen de reparación del ADN.

Como resultado de este tipo de diferencias, familias con *MSH6* y *PMS2* están adecuadamente representadas en los registros de alto riesgo que suelen basar su

determinación en la presencia de agregación familiar y la temprana edad de aparición del cáncer. Determinaciones poblacionales más recientes también han sugerido que las familias *MSH6* y *PMS2* pueden ser más comunes de lo previamente calculado y según algunas series, hasta un 20% de los pacientes con SL tienen mutaciones *MSH6* o *PMS2*⁸⁹.

d. Deficiencias bialélicas de MMR.

Otra prueba del fuerte potencial carcinogénico de la pérdida de reparación del ADN proviene de los raros casos de herencia de mutaciones bialélicas en los genes MMR. En una revisión se han descrito 50 casos de 30 familias que fueron reportados en la literatura publicada⁹⁰. En contraste con el SL, en el que los cánceres se producen en la quinta o sexta décadas de la vida, los portadores homocigotos o heterocigotos compuestos con mutaciones en *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2* a menudo desarrollan neoplasias malignas hematológicas y en el cerebro durante la infancia. La mayoría de estas personas, aunque no todas, tenía antecedentes familiares de SL en ambas líneas familiares (materna y paterna).

Además de los riesgos de cáncer en las dos primeras décadas de la vida, los individuos con deficiencia de MMR (la mayoría con mutaciones MMR homocigotas o heterocigotas compuestas) tienen riesgo de padecer neurofibromatosis tipo 1.

3.1.5. Diagnóstico molecular.

Actualmente se utilizan los criterios clínicos, el IMS y el estudio de expresión de las proteínas reparación de bases desapareadas mediante inmunohistoquímica (IHQ) (sensibilidad del 95%) para seleccionar las familias susceptibles de estudio de los genes del sistema MMR.

En caso de cumplir los criterios de Bethesda, el tumor debe ser analizado mediante IMS y/o IHQ. No obstante, éste último no ha de sustituir al primero mientras no se hayan esclarecido el papel de otros supuestos genes que intervendrían en el SL. Existen protocolos que de inicio recomiendan el estudio IMS, y si ésta es baja o alta, a continuación realizar la IHQ con objeto de orientar el análisis del gen cuya expresividad se halle alterado. En caso de cumplir los criterios de Ámsterdam, la realización de IHQ sería un opción previa al estudio de la mutación del gen afectado aunque no se puede olvidar la importancia de la IMS debido a su factor pronóstico, su influencia probable en el tratamiento así como su la relación con una nueva vía de carcinogénesis en aquellas familias Ámsterdam I con EMS^{43,91}.

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

La pérdida de inmunorreactividad *MSH2* o *MSH6* en un CCR es altamente específico para el SL pero, como se señaló anteriormente, *MLH1* también puede aparecer en casos de CCR esporádico por la hipermetilación del promotor *MLH1*.

La IHQ en el cáncer de endometrio ha demostrado su eficacia para la identificación del SL. La metilación de *MLH1* puede dar origen a tumores de endometrio pero las mutaciones de *BRAF V600E* no son comunes en los tumores de endometrio. Los estudios que utilizan IHQ de *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* y *PMS2* han demostrado que tiene un valor predictivo prácticamente equivalente a la de las pruebas de IMS. La IHQ tiene el valor añadido de detección de *PMS2* y *MSH6* (que podrían pasarse por alto las pruebas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para IMS), de fácil acceso, bajo costo y de identificación del gen afectado. Como resultado, la IHQ se ha desarrollado como herramienta de primera línea para identificar a pacientes con SL

3.1.6. Cribado del SL.

Está dirigido a identificar y resear los pólipos adenomatosos, así como la detección precoz de CCR ⁹² por medio de revisiones periódicas. Se considera para aquellos individuos portadores de mutaciones en los genes de reparación, o en los que, sin poseerla, sí tienen una evidencia familiar y clínica importante de SL ^{4,93}. 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 familiar afecto más joven, seleccionando la opción que antes se produzca.

Dentro de las familias con mutación identificada o con alta sospecha de SL, el riesgo de presentar una neoplasia extracolónica es mayor. Por este motivo, se recomienda el cribado sistemático del endometrio, neoplasia extracolónica más frecuente, a partir de los 25-30 años ⁹⁴ mediante ecografía transvaginal anual, aspirado endometrial y CA-125 (pruebas empleadas en el cribado de cáncer de ovario). En aquellas familias en las que existe una mayor agregación de otra neoplasia extracolónica, también se debe realizar cribado de la misma.

3.1.7. Tratamiento quirúrgico.

Debido al riesgo de CCR metacrónicos, la progresión más rápida de adenoma a carcinoma y la posibilidad de lesiones planas precursoras difíciles de tratar endoscópicamente, algunos grupos recomiendan la colectomía total o la proctocolectomía (en casos de afectación rectal) para el tratamiento del CCR en pacientes portadores de mutación ⁹⁴. La colectomía profiláctica en individuos de riesgo o portadores asintomáticos no se recomienda, y sólo podría considerarse en casos de posible incumplimiento del seguimiento endoscópico. En mujeres afectas de SL con carcinoma de endometrio se debe realizar histerectomía y doble anexectomía; de igual manera, en las portadoras sanas no existen datos a favor ni en contra de la cirugía previa de forma profiláctica.

La mitad de los pacientes sometidos a resección colónica segmentaria presentan un segundo CCR a los 10 años. Esto, junto con el riesgo de 12%, en seguimientos de 12 años, de desarrollar cáncer cuando se ha preservado un remanente rectal ⁶⁸ justifica la vigilancia endoscópica con una periodicidad de 1 a 3 años, dependiendo de la edad, la patología asociada y el tipo de resección realizada.

3.2. Poliposis adenomatosa familiar y otras poliposis.

Además de las presentaciones ya mencionadas, existen otras poliposis con aumento del riesgo de CCR como PAF, PAFA, PAM así como síndromes genéticos que se asocian con poliposis gastrointestinal. El riesgo de cáncer de colon en estas últimas es incierto y puede no estar aumentado. Los ejemplos de estos síndromes genéticos incluyen la enfermedad de Cowden, la ganglioneuromatosis intestinal, el síndrome de Ruvalcaba-Myhre-Smith, el síndrome de Devon y el síndrome de Cronkhite-Canadá.

3.2.1. Poliposis adenomatosa familiar.

La PAF es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones en el gen *APC* (poliposis adenomatosa coli) que se encuentra en el cromosoma 5q21-q22. PAF se presenta en aproximadamente 1 de cada 10.000 a 30.000 personas. El riesgo de desarrollar CCR es cercano al 100%.

Las pruebas genéticas de la PAF están habitualmente disponibles y son la base para el diagnóstico de la enfermedad en pacientes con poliposis y para un análisis genético de los familiares en riesgo.

En general se acepta que un diagnóstico clínico definitivo de PAF debe darse en cualquier individuo con más de 100 adenomas a lo largo de la vida, con la salvedad de que en la forma atenuada de la PAF existe una carga mucho menor de adenomas y de

que algunos pacientes con poliposis asociada a MYH (PAM) pueden existir más de 100 adenomas.

Con las pruebas de rutina, entre un 10 y un 30% de los pacientes que cumplen criterios para PAF no tienen una mutación detectable en *APC* y ni tampoco es detectable en un 90% de los pacientes con PAFA. Algunos de estos pacientes tienen una PAM. Cerca de un tercio de los pacientes con mutaciones en el gen *APC* no tienen antecedentes familiares de la enfermedad y probablemente representan nuevas mutaciones en la línea germinal *APC*.

El espectro de enfermedades causadas por mutaciones en el gen *APC* incluye la PAF clásica (más de 100 pólipos colorrectales adenomatosos), las formas atenuadas de la enfermedad y una mutación de *APC* que se presenta en cerca del 6% de la población judía asquenazí y que se asocia con un riesgo moderadamente aumentado de cáncer de colon (menos del doble) sin poliposis⁹⁵.

Además de adenocarcinoma de colon, los pacientes con PAF corren el riesgo de varias enfermedades malignas extracolónicas que incluye carcinoma ampular duodenal, carcinoma folicular o papilar de tiroides, hepatoblastoma en la infancia, carcinoma gástrico, tumores del sistema nervioso central, principalmente meduloblastomas y tumores desmoides.

Los pólipos son comunes en la parte superior del tracto gastrointestinal de los pacientes con poliposis adenomatosa familiar (30 a 100% según la serie)⁹⁶. Los pólipos de la glándula fúndica del estómago proximal se cree que tienen un riesgo muy bajo de progresión a cáncer. Los pólipos duodenales (presentes en el 45-90% de los pacientes) son por lo general adenomatosos y pueden progresar a cáncer. Los pacientes con PAF tienen alrededor de un 4-12% de riesgo de presentar cáncer de duodeno o papila de Vater.

Los adenomas de intestino delgado distal y en el estómago se producen en 20-40% de los pacientes con PAF pero tienen un riesgo de cáncer mucho menor que los adenomas duodenales. Con menor frecuencia aparecen adenomas en la vesícula biliar y el conducto biliar, apareciendo eventualmente adenocarcinomas en estas localizaciones.

El síndrome de Gardner se diferencia tradicionalmente de la PAF por la presencia de lesiones extraintestinales. Estos incluyen tumores desmoides, quistes epidermoides o sebáceos, lipomas, osteomas (especialmente de la mandíbula), dientes supernumerarios, pólipos gástricos y angiofibromas nasofaríngeos juveniles. El síndrome de Gardner y la PAF pueden tener origen en la misma mutación en el gen *APC*. Esto coincide con el hecho de que muchos pacientes con PAF tienen lesiones extraintestinales. Se puede considerar que el síndrome de Gardner es una variante clínica de la PAF y que la distinción entre los dos es en gran parte semántica.

El síndrome de Turcot es una rara variante de la PAF que se asocia con meduloblastoma.

3.2.2. PAF atenuada.

Clínicamente la PAF atenuada (PAFA) se diferencia de la PAF clásica por tener menos adenomas de colon (10 a 100), un riesgo de desarrollar CCR un poco menos elevado (hasta un 80%) y una edad más avanzada de diagnóstico tanto de pólipos en colon (un promedio de 40 a 45 años de edad) y como de CCR (un promedio de 50 a 60 años de edad)^{97,98}.

La realización de las pruebas genéticas para PAFA se recomienda en pacientes con más de 10 a 20 adenomas de colon. Sin embargo, no hay mutación *APC* detectable en más del 90% de los pacientes.

La PAFA también se caracteriza por una distribución más proximal de los adenomas con una participación más frecuente de la porción proximal del colon y menos en el recto. El riesgo acumulativo de CCR a los 80 años de edad se estima en 60 a 70%, con un 75% de los tumores en el colon proximal.

El cribado mediante colonoscopia y endoscopia alta se ha recomendado en pacientes con PAFA a partir de la edad de 20 a 25 años. Los pacientes con hallazgos endoscópicos compatibles con PAFA pueden someterse a una polipectomía, cuando sea posible, seguida de vigilancia anual. Los pacientes con múltiples adenomas que impide la extirpación endoscópica o en los que la vigilancia endoscópica no es técnicamente posible, deben considerarse candidatos a colectomía profiláctica.

Los pacientes con PAFA también pueden desarrollar adenomas y carcinoma periampular, como en la PAF clásica. Se recomienda la realización de endoscopia digestiva alta a partir de los 20 a 30 años de edad y luego cada uno a tres años, dependiendo de la cantidad de pólipos.

Tumores extraintestinales, especialmente desmoides, también pueden aparecer en la PAFA. No hay consenso sobre la prevención de tumores extraintestinales en la PAFA por lo que una actitud, conservadora, es la de realizar la misma vigilancia que en la PAF clásica.

3.2.3. Poliposis asociada a MYH.

La poliposis asociada a *MYH* (PAM) es un síndrome polipósico con herencia autosómica recesiva causado por mutaciones bialélicas en el gen *MYH*⁹⁹. Las dos mutaciones *MYH* más comunes en la población caucásica con PAM son *Y165C* y *G382D*, pero un 20% de los pacientes no tienen ninguna de estas mutaciones¹⁰⁰.

El espectro clínico de la PAM es variable. Las primeras descripciones de la PAM se dieron en pacientes con un fenotipo similar a la PAFA ¹⁰¹ o con un cuadro clínico que se superpone al de la PAF clásica (de 100 hasta 500 adenomas) ¹⁰². Posteriormente, fueron informados casos de CCR sin poliposis de aparición temprana (edad < 50 años) con mutaciones bialélicas en el gen *MYH*.

Hay una mayor incidencia de CCR en el momento del diagnóstico en pacientes con PAM en comparación con PAFA ^{103,104}. Aproximadamente dos tercios de estos cánceres aparecen en el colon derecho y la edad media al diagnóstico es de aproximadamente 45 años.

Aunque menos común que en la PAF, también se ha descrito afectación extracolónica incluyendo pólipos gastroduodenales, carcinoma duodenal, osteomas, cáncer de mama, hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina, quistes dentales, y fenotipo Muir Torre con tumores de las glándulas sebáceas. El riesgo de cáncer extraintestinal es sustancial en la PAM y la distribución de los cánceres observados varía de la que se observa en la PAF. Parece que hay un mayor riesgo de cáncer de ovarios, vejiga, piel y posiblemente cáncer de mama.

4. EL CÁNCER COLORRECTAL EN EL ADULTO JOVEN.

En general, el CCR constituye una enfermedad que suele aparecer de forma predominante en pacientes de mediana edad y de edad avanzada, diagnosticándose la mayoría de los casos después de los 55 años, con una edad media al diagnóstico de 60 a 70 años. Sin embargo, esta entidad nosológica también aparece en pacientes jóvenes, con una frecuencia reducida pero significativa, constituyendo entre el 2 y el 10 % de todos los CCR que se diagnostican en menores de 40-50 años ¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

En pacientes jóvenes con CCR se ha observado peor pronóstico y supervivencia en comparación con pacientes mayores ¹⁰⁸ debido en parte al diagnóstico tardío,

relacionado con estadios avanzados ¹⁰⁹ por la baja sospecha de malignidad en este grupo, y a que se trata, con alguna frecuencia, de tumores pobremente diferenciados ¹¹⁰.

La importancia de este tipo grupo se demuestra a partir de un estudio basado en la experiencia de dos registros de cáncer de USA [el “National Program for Cancer Registries” y el “Surveillance, Epidemiology and End Results” (SEER)], en donde se resalta el impacto sustancial que tiene el CCR en el adulto joven, puesto que supone uno de los 10 cánceres más frecuentes en individuos entre 20 y 49 años de cualquier raza. Este estudio además puntualiza acerca de la diferenciación clínico-patológica que existe en el paciente joven frente al CCR en el anciano ¹¹¹.

4.1 Características clínicas.

El CCR que se presenta a edad precoz es un grupo heterogéneo, encontrando desde casos con una importante carga familiar de CCR (casi un 50% de los menores de 40 años con CCR presentan al menos un familiar afecto) hasta otros que simplemente corresponden a casos esporádicos. Es de destacar el aspecto de la alta carga familiar en estos pacientes, puesto que existen múltiples estudios en los que se ha demostrado la importancia del criterio “edad precoz” para establecer el diagnóstico de SL. Sin embargo, la frecuencia de SL en pacientes con CCR menores de 40-45 años sólo alcanza el 15-20% de los casos ^{112,113}. El CCR en menores de 40-50 años, afecta preferentemente a varones y se diagnostica con mayor frecuencia entre los 31 y los 35 años de edad.

La edad límite para definir al grupo adulto joven varía según los estudios, situándose entre los 40 y los 50 años de edad. También existen diferencias tanto en las características anatómo-clínicas como en las moleculares.

El CCR en el adulto joven parece presentar características distintivas con respecto al de individuos de mayor edad. Desde el punto de vista anatómico-clínico en el CCR en menores de 40 a 50 años, los tumores presentan con mayor frecuencia localización a nivel del colon derecho, bajo grado de diferenciación, características mucinosas y mayor probabilidad de tumores sincrónicos y/o metacrónicos ¹¹⁴. Otra característica es el estadio avanzado en el momento del diagnóstico como se ha mencionado previamente.

Cuando se tiene en cuenta la característica de IMS y en aquellos pacientes que presentan características de SL, destaca el aumento de tumores a nivel del colon derecho y el diagnóstico a una edad más precoz ^{78,105,114-117}.

El pronóstico no está totalmente definido puesto que mientras algunas publicaciones encuentran que es más favorable en los IMS ⁷⁸ o con características de SL ^{105,115} otras indican que el factor “edad precoz” *per se* implica un peor pronóstico. En el CCR esporádico en el adulto joven, el pronóstico también empeora y el diagnóstico es más tardío ¹¹⁴. En general se describe una supervivencia media a los 5 años cercana al 30% en los pacientes menores de 40 años diagnosticados de CCR. Algunas publicaciones aportan datos llamativos acerca de la supervivencia como la analizada en Kelaniya ¹⁴. En este lugar existe una alta proporción de pacientes jóvenes con CCR de tipo esporádico, y cuyo pronóstico y supervivencia son excesivamente malos (mortalidad del 94% durante los 20 meses post-operatorios).

Cuando tenemos en cuenta exclusivamente los casos esporádicos de CCR en jóvenes encontramos que existen diferencias anatómico-clínicas. Un estudio llevado a cabo en la Universidad de Stanford, USA ¹¹⁸ analizó 1160 pacientes con CCR de los cuales 75 (6%) eran menores de 40 años. En 13 de estos 75 casos, se demostró alteración en los genes MMR. 55 pacientes correspondían a casos de CCR esporádico de aparición en edad temprana siendo diagnosticados principalmente entre los 35 y los 40 años. Estos casos de CCR esporádicos en jóvenes se compararon con un grupo

control (mayores de 40 años) y se encontraron diferencias significativas con respecto a la localización del tumor, preferentemente en colon izquierdo y en recto entre los más jóvenes, así como mayor presencia de características adversas incluyendo bajo grado de diferenciación, presencia de células en anillo de sello e invasión perineural y venosa. Sólo en el 4% de los CCR esporádicos en jóvenes se demostró mutación en el gen *KRAS* en comparación con el grupo de mayores de 40 años en donde esta mutación apareció en el 15% de los casos. Sin embargo, no se hallaron diferencias en cuanto a estadificación tumoral, infiltración linfática, recurrencia tumoral y supervivencia. No obstante, la presencia de enfermedad metastásica fue mayor en el grupo de jóvenes.

Una revisión que incluye 55 artículos y un total de 6425 pacientes menores de 40 años con CCR (sin distinción con respecto al patrón de presentación, esporádico o familiar) ¹⁰⁸ encuentra que no hay diferencia entre sexos en este rango de edad, que existe una mayor frecuencia de localización en sigma y recto (54%) y una mayor proporción de casos (66%) de estadios avanzados (Dukes C y D) al diagnóstico. Así mismo describe una mayor prevalencia de tumores mucinosos (21%) y pobremente diferenciados (27%) que en los pacientes de mayor edad (10-15% y 2-29%, respectivamente).

Sanguinetti presenta en el 2004, un estudio retrospectivo descriptivo en donde se comparan casos de CCR esporádicos y SL en pacientes menores de 40 años. Los pacientes con SL presentaron mayor porcentaje de tumores derechos (71,4% vs 6,2%). Además, los pacientes con SL tuvieron mayor porcentaje de tumores mucinosos (42,8% vs 25%), estadios más tempranos al diagnóstico (85,7% vs 50%) y supervivencia más prolongada ($232,2 \pm 65$ meses vs $49,6 \pm 11,4$ meses).

Alici por su parte, corrobora el mal pronóstico del CCR en pacientes menores de 40 años, sobretodo en los casos con localización distal y cuando se diagnostican en estadios avanzados ¹¹⁹ aunque no encuentra diferencias en los hallazgos clínico-patológicos de presentación.

4.2 Características moleculares.

Esencialmente se han valorado dos vertientes de los aspectos moleculares de este tipo de neoplasias en este grupo de pacientes: una corresponde a los casos relacionados con el SL y sus características de IMS, y otra asociada a ciertos marcadores moleculares relacionados con las vías de carcinogénesis del CCR en relación con IC.

En el primer caso, correspondiente a la vía de carcinogénesis del CCR representada por la IMS, la frecuencia de casos de SL es mayor. Este grupo posee como característica la edad precoz de desarrollo del CCR, siendo la media 46 años de edad ¹²⁰. Como se ha mencionado previamente, en el CCR de aparición precoz diagnosticado entre los 40 y los 45 años, un 15 a 20% de los casos corresponden a SL ^{112,121,122}. Varios estudios muestran que entre el 47 y el 60% de los pacientes con CCR, con una edad igual o menor de 40 años, presentan IMS y que una cuarta parte presentan mutaciones en los genes de reparación del ADN ¹²³⁻¹²⁵.

El otro grupo corresponde a los tumores con predominio de la vía de la IC que presentan CCR con estabilidad de microsatélites (EMS). Al igual que en los casos esporádicos, se ven alterada la expresión de los genes del *APC*, la β -catenina y el *p53* ¹²⁶. Sin embargo, dentro de este subgrupo, algunos tumores presentan aneuploidía ^{127,128}, característica propia de la IC, mientras que otros, al contrario, muestran diploidía, que se supone propia de la IMS. Esta posible diferenciación de fenotipo de los tumores EMS en adulto joven en IC + e IC -, sugiere un mecanismo distinto de la EMS que correspondería a un CCR hereditario dentro de la población de CCR diploides EMS de inicio precoz ¹²⁹. Tal vez estas aseveraciones podrían entroncar con estudios recientes en los que se sugiere la existencia de un nuevo síndrome de CCR hereditario, caracterizado por EMS, IHQ normal para las proteínas del sistema de reparación, la presencia exclusiva de CCR en la familia así como la ausencia de individuos con

neoplasia primaria múltiple ^{43,130}. Otras publicaciones apuntan hacia la posibilidad de la existencia de una vía alternativa de carcinogénesis en los CCR con mutación negativa de los genes de reparación ¹⁶⁵. A pesar de ello, no se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de los diferentes marcadores moleculares que intervienen en la carcinogénesis del CCR en adulto joven, ni de su influencia en la evolución de estos pacientes.

4.3. Tratamiento.

Desde el punto de vista terapéutico, el manejo es similar al del CCR esporádico. Sin embargo, la extensión de la cirugía radical recomendable puede ser mayor en aquellos pacientes con CCR de edad precoz y que asocien características moleculares y/o familiares de SL, debido al riesgo importante de desarrollar tumores metacrónicos en la evolución futura ¹¹⁵.

En resumen, el CCR del adulto joven tiene hallazgos específicos diferentes a los del adulto mayor, tanto desde el punto de vista clínico-patológico como molecular. Sin embargo, múltiples aspectos han impedido caracterizarlo mejor. Es un grupo heterogéneo con un importante componente hereditario (SL) y familiar, pero también con un 60% de casos esporádicos cuya caracterización está insuficientemente definida. Existen múltiples hallazgos moleculares que no han sido totalmente correlacionados. El conocimiento acerca del CCR en el adulto joven sigue siendo insuficiente y precisa de más estudios para su mejor comprensión. La comparación con un grupo de pacientes ancianos cuyo patrón de presentación es primordialmente esporádico puede ser de utilidad para entender las características específicas y las diferencias del CCR en el paciente joven.

HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

El CCR en jóvenes presentaría características fenotípicas diferenciales respecto al que aparece en ancianos, posiblemente debido, entre otros motivos, a exhibir diferencias para las principales vías de carcinogénesis.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS.

Objetivo general:

- El objetivo de este trabajo fue comparar a dos grupos de pacientes con CCR y de edad claramente diferenciada, analizando los hallazgos clínicos, anatómo-patológicos, familiares y moleculares.

Objetivos específicos:

- Identificar las características clínicas, anatómo-patológicas, familiares y moleculares del CCR en dos grupos de edades claramente diferenciados.
- Describir las características del CCR según la vía de carcinogénesis y según la clasificación molecular.
- Realizar un análisis comparativo entre los subgrupos estudiados para establecer las diferencias en el CCR de acuerdo al criterio edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. SUJETO DE ESTUDIO.

1.1. Procedencia.

En el presente estudio se incluyeron pacientes diagnosticados e intervenidos de CCR en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Los sujetos del estudio fueron identificados a partir del Registro de Tumores de este hospital con el siguiente criterio de inclusión:

- Grupo de jóvenes (CCR de aparición temprana) intervenidos con el diagnóstico de CCR con una edad igual o inferior a 45 años.
- Grupo de pacientes mayores (CCR de aparición tardía): cien pacientes consecutivos intervenidos con el diagnóstico de CCR con una edad igual o superior de los 70 años.

La edad de inclusión se determinó de acuerdo al momento de la intervención quirúrgica. En casos de tumores metacrónicos, la edad de inclusión fue la correspondiente a la del primer tumor.

El período de tiempo estudiado para la selección del grupo de jóvenes fue desde Enero de 2002 hasta Diciembre de 2008 y la muestra de pacientes mayores se seleccionó desde Enero de 2005 hasta completar una muestra de 100 casos consecutivos.

Se excluyeron del análisis, los pacientes con PAF.

1.2 Información recogida.

1.2.1. Información clínica.

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

- Datos clínicos: sexo y edad al diagnóstico.
- Datos anatómo-patológicos:
 - Localización del tumor colorrectal:
 - Derecho o proximal (desde el ciego hasta el ángulo esplénico).
 - Izquierdo o distal (desde el colon descendente hasta el sigma).
 - Recto.
 - Grado histológico de diferenciación: bien, moderado, pobre.
 - Producción de moco (mucinoso, con células en anillo de sello).
 - Estadio de Dukes.
 - Clasificación TNM.
 - Presencia de otros CCR sincrónicos o metacrónicos.
 - Presencia de pólipos en colon, asociados o después del CCR; tipo y número.
- Datos evolutivos:
 - Presencia de neoplasias relacionadas con el SL.
 - Presencia de otras neoplasias no relacionadas.

1.2.2. Información familiar.

Se contactó con los sujetos incluidos en el estudio (*probandus* o caso índice) o en caso de fallecimiento, con un familiar de primer grado. Se realizó una entrevista con varios objetivos:

- Recoger datos referentes a la estructura y antecedentes de la familia relacionados con enfermedades neoplásicas para determinar, en al menos tres generaciones, número y relación de familiares afectos, edades en el momento de la entrevista, fallecimientos y causa, ocurrencia de cánceres, edades al diagnóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Obtener un consentimiento informado (Anexo 1) para el estudio del tejido parafinado del CCR, motivo de la inclusión.

Posteriormente, como se detallará más adelante, en los casos en los que IMS resultaba positivo y/o se cumplían criterios de Ámsterdam II para SL, se contactó nuevamente con los sujetos para obtener una muestra de sangre periférica para el estudio de posibles mutaciones de los genes de reparación de errores en el ADN más frecuentes, *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*. En caso de que el caso índice hubiese fallecido, se recogía la muestra del familiar más cercano que hubiera desarrollado CCR o una neoplasia relacionada con SL a una edad más temprana, obteniendo a su vez el consentimiento para el mencionado estudio.

A partir de la información obtenida del árbol genealógico, se determinaba si la familia cumplía los criterios clínicos de CCR familiar y/o hereditario. Basado en estos datos, se definía al sujeto índice según sus antecedentes familiares como:

- Sospecha de SL, en aquellos casos en que se cumplían los criterios clínicos 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 existe 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. Líquidos biológicos. Sangre periférica.

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

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

- Extracción manual.
 - La sangre extraída se coloca en un tubo de 50 cc, a la que se añade suero fisiológico carbamilfosfato sintetasa hasta completar el volumen, y se agita para homogeneizar.
 - Se coloca en centrifugadora a 3.000 revoluciones por minuto (rpm) y a 4°C a lo largo de 15 minutos. Concluido este periodo, se decanta el sobrenadante con el fin de obtener el sedimento de leucocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Se toma este sedimento y se le añade agua bidestilada estéril hasta completar de nuevo 50 cc, para luego agitar hasta conseguir el desprendimiento del botón de células del fondo del tubo.
- De nuevo se centrifuga a la velocidad, temperatura y tiempo previos, y se obtiene tan sólo el sedimento de leucocitos.
- Se vuelve a repetir la operación de añadir agua bidestilada, pero hasta alcanzar los 25 cc y se agita. Se centrifuga con los mismos parámetros previamente descritos.
- Tras decantar y, una vez obtenido el sedimento de leucocitos, se añade, según el botón de células, un volumen variable de tampón de lisis de leucocitos (4-7 cc), que consiste en 40 cc de NaCl 5M, 4 cc de EDTA (pH 8) 0'25 M, 2'5 cc de Tris 2 M pH 7'5 y agua destilada hasta alcanzar un volumen de 500 cc; 266-466 µl de sodio dodecil sulfato (SDS); y 666-1.166 µl de solución de Proteinasa K (10 mg/ml).
- Se agita con el fin de disgregar el botón de células, para a continuación colocar en incubadora toda la noche a 37°C.
- Se añaden 1'33-2'33 cc de NaCl según los volúmenes usados para la lisis, con el objetivo de precipitar el ADN. Posteriormente se agita y se centrifuga, variando tan sólo el parámetro de tiempo, que de 15 minutos pasa a 30 minutos. Realizado esto, se sitúa el sobrenadante en un tubo distinto.
- Se añaden dos volúmenes de alcohol etílico absoluto respecto a la cantidad de tampón de lisis de leucocitos empleado, para luego agitar con suavidad, hasta lograr apreciar el ovillo de ADN.
- Con una pipeta Pasteur esterilizada con el extremo en forma de gancho, se coge el ovillo, y se pasa por dos tubos, uno después del otro, de etanol frío al 70%. Mediante esta maniobra se eliminan impurezas. Se deja secar unos instantes para eliminar los restos del etanol.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Se resuspende en Tris-EDTA (TE) 1:0'1 a pH 8 (solución amortiguadora) o en agua destilada estéril. Se busca la correcta disolución del ADN, por lo que se agita con suavidad durante dos horas a 37°C.

- Extracción automática.

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

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

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

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

2.2. Tejido incluido en parafina.

Como se ha mencionado previamente, se recogió tejido tumoral conservado en parafina de cada uno de los *probandus*. Para la obtención de las mencionadas muestras, se contó con la colaboración del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, de Madrid. De igual manera, con anterioridad a esto, también se había obtenido el consentimiento informado para el estudio de las mismas como se explicó anteriormente.

Con este tejido se realizó el análisis de la IMS, así como la realización de la inmunohistoquímica de las proteínas del sistema de reparación del ADN.

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

2.2.1. Tinción hematoxilina-eosina.

- Tomando el bloque de tejido incluido en parafina, se realiza un corte de 3 μm con un micrótopo.
- Se incuba a 70°C durante una hora.
- Se añade xilol a la muestra con objeto de desparafinar, durante 2 minutos, dos veces.
- Se hidrata la muestra con etanol en dos fases. La primera con etanol absoluto durante 2 minutos, y la segunda, al 95% durante el mismo período de tiempo.
- Se lava con agua destilada otros dos minutos.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Durante 15 minutos se tiñe con hematoxilina de Mayer.
- Se vuelve a lavar mediante el mismo procedimiento previo.
- Se tiñe con eosina durante 2 minutos.
- Se añade etanol al 70% con el fin de eliminar los restos de eosina.
- Por medio de varios pasos sucesivos, se deshidrata la muestra, con etanol al 96% (30 segundos), absoluto (2 minutos), y xilol (2 minutos, dos veces).
- Por último, se monta el cubre con Eukitt o DPX.

2.2.2. Extracción de ADN.

- Se colocan tres cortes de 10 μm de tejido en un tubo de 1'5 cc.
- Mediante 1 cc de xilol, incubando 5 minutos a 65°C, se centrifuga a 12.000 rpm 10 minutos, con el fin de desparafinar. Después se retira el sobrenadante.
- Si todavía quedan restos, se repite el paso anterior.
- Se añade 1 cc de etanol absoluto y se incuba 5 minutos a 65°C.
- Se centrifuga con los mismos parámetros previos y se retira el sobrenadante.
- Se añade 1 cc de etanol, aunque ahora al 50%, y se incuba 5 minutos a 65°C.
- Se realiza la misma operación de centrifugado, retirando el sobrenadante, para posteriormente dejar secar hasta que no queden restos de etanol.
- Se añaden 400 μl de tampón (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 2'5 mM MgCl_2 , 0'45% *Nonidet P40*, 4'5% *Tween 20*) y 40 μl (1/10 de volumen de tampón) de Proteinasa K (10 mg/ml).
- Se incuba a 55°C, el tiempo necesario hasta que no se observen restos de tejido.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Si pese a los pasos previos, y tras varias horas de incubación, quedan restos sin digerir, se debe añadir cantidades equivalentes de tampón y Proteinasa K, o centrifugar brevemente y separar el sobrenadante.
- A continuación se coloca el sobrenadante en un tubo de purificación *Phase Lock Gel™ Light* (Eppendorf AG, Alemania) y se añade un volumen (440 µl) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
- Incubar en rotación durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar a 12.000 rpm, 5 minutos.
- Recuperar la fase acuosa (superior), pasarla a un tubo nuevo *Phase Lock Gel™ Light* y añadir un volumen (440 µl) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Una vez hecho esto, se incuba de nuevo en rotación de igual forma que la previa y después se centrifuga con los mismos parámetros que en el paso previo.
- De nuevo se recupera la fase acuosa en un tubo de 1'5 ml y se añade en esta ocasión un volumen (440 µl) de cloroformo. Por tercera vez se incuba en rotación y centrifuga, para luego recoger la fase acuosa en un tubo de 1'5 ml.
- Se suma 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto frío. A continuación se deja precipitar el ADN a -20°C durante toda la noche.
- Se centrifuga a 12.000 rpm, 15 minutos a 4°C y se retira el sobrenadante. Acto seguido se lava con 1 ml de etanol frío al 75%.
- Misma maniobra de centrifugación a 12.000 rpm, aunque ahora 10 minutos, a 4°C, retirando el sobrenadante y dejando secar con el fin de eliminar los restos de etanol. Por último, se resuspende el botón de ADN en TE (pH 8) o en agua destilada estéril.

3. VALORACIÓN DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN.

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

- Se colocan 0'3 g de agarosa (Agarosa Media, Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid) y 30 cc de tampón TBE 1X (Tris, ácido bórico, EDTA) en un matraz de 250 cc de capacidad. Se lleva a ebullición en un microondas hasta que se funda la agarosa.
- Tras dejar que se atempere, se añaden 3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml).
- La disolución se dispersa en una bandeja, sellada por los extremos con cinta adhesiva, y luego se coloca un peine cerca del borde, donde quedarán los pocillos de carga. Una vez hecho esto, se deja que el gel solidifique.
- Se retiran la cinta adhesiva y el peine, para luego colocar el gel en una cubeta de electroforesis horizontal (Laboratorios Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña), cubriéndolo con TBE 1X.
- En lo pocillo del gel se cargan 2 µl de muestra junto con el tampón de carga (glicerol, azul de bromofenol, xilencianol), para acto seguido, conectar una fuente de alimentación a la cubeta y dejar migrar las muestras.
- El gel se visualiza en un transiluminador de luz ultravioleta (*GelDoc 2000*, Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña).

MATERIAL Y MÉTODOS

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

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

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

C: la concentración (μ g/ml); Abs_{260} : absorbancia de la muestra a 260 nm;

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

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

4. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TEJIDO NORMAL

Panel de Bethesda.

El denominado “panel de Bethesda” se recomienda actualmente para la determinación del estado de IMS en los tumores sospechosos de SL (Boland CR et al. 1998). Incluye el estudio de cinco microsatélites: BAT25, BAT26, D5S346 (APC), D17S250 (Mfd15CA) y D2S123. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario 12 de Octubre, de Madrid (Dr. Daniel Rueda).

Para realizar este estudio se utilizó un ensayo de PCR *multiplex* que genera productos marcados con fluorescencia para poder analizarlos en un secuenciador *ABI* automático (*HNPCC Microsatellite Instability Test*, Roche, Mannheim, Alemania) (Tabla 4).

Tabla 4. Tamaño de los productos de PCR y fluorocromos empleados para el análisis de la IMS mediante el “panel de Bethesda” (HNPC Microsatellite Instability Test, Roche).

Marcador microsatélite	Localización cromosómica (gen próximo a marcador)	Tamaño del producto de PCR (pb)	Fluorescencia
BAT25	4q12 (c-kit)	110-130	6-FAM
BAT26	2p16.3-p21 (hMSH2)	100-120	TET
D5S346	5q21/22 (APC)	100-130	HEX
D17S250	17q11.2-q12 (BRCA1)	140-170	TET
D2S123	2p16 (hMSH2)	200-230	6-FAM

A partir del ADN tumoral y normal extraído de tejidos incluidos en bloques de parafina, el protocolo de PCR *multiplex* que se empleó es el recomendado por el fabricante:

Se añaden a un tubo de 0’2 ml, en hielo, los siguientes reactivos: TESIS MIA 2015_08_02

- *Multi Primer Mix*.....5 µl

Es una mezcla de cebadores marcados con distintos fluorocromos (6-FAM, TET o HEX) para amplificar los 5 microsatélites.

- *Enzyme Master Mix*.....5 µl

MATERIAL Y MÉTODOS

Contiene un tampón de reacción, ADN Taq polimerasa y dNTPs.

- ADN (200 ng).....X
- H₂O destilada y estéril (hasta volumen final 25 µl).....Y

Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad de éste de 200 ng. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 25 µl, dependerá del valor de X.

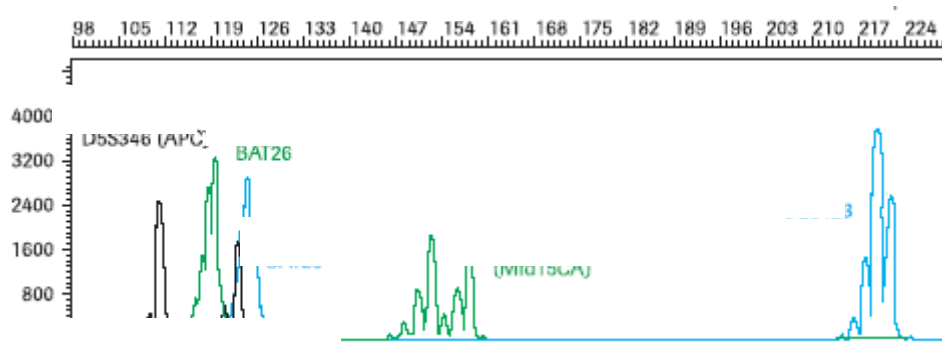
La reacción se realizó en un termociclador *GeneAmp® 9700* (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems) y en las siguientes condiciones:

94°C.....2'
94°C.....30"
55°C.....30" } 35 ciclos
72°C.....30"
72°C.....7'

Preparar para cada muestra: 12 µl de formamida desionizada, 0'1 µl de un marcador de tamaño marcado con TAMRA (TAMRA 500) y 1 µl del producto de PCR.

Esta mezcla se analiza en un secuenciador *ABI Prism 3700* (PE Applied Biosystems) y se visualizan los resultados mediante el software *GeneScan 3.5* (Figura 7).

A. Tejido normal, EMS.



B. Tejido tumoral, IMS

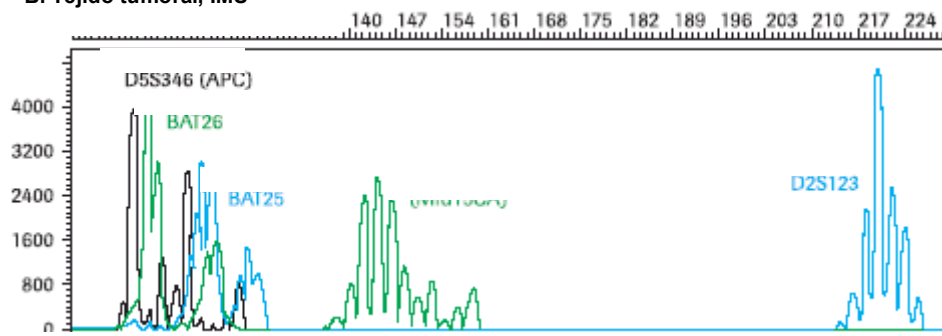


Figura 7. Resultado de la amplificación del ADN normal (A) y de un tumor (B) que muestra IMS en todos los marcadores microsatélites analizados.

Consideramos IMS aquellos casos con IMS alta, es decir, cuando presenta dentro del panel de Bethesda ≥ 2 loci con inestabilidad. El resto de casos se definieron como EMS.

5. ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES DE REPARACIÓN DE LOS ERRORES DE EMPAREJAMIENTO DEL ADN (*MLH1*, *MSH2* Y *MSH6*).

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

El estudio de la secuencia de *MLH1* y *MSH2*, así como el de *MSH6*, que se describe en el siguiente apartado, se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario 12 de Octubre, de Madrid (Dr. Daniel Rueda).

La identificación de las mutaciones de los genes se llevó a cabo por medio de la electroforesis en geles en gradiente desnaturizante ¹³¹

La PCR empleada es la descrita por Wijnen et al., con diversas modificaciones, tanto los cebadores y las condiciones de la PCR, como las de la electroforesis ^{132,133} (Tablas 5 y 6).

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

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

-Pinza CG: 5’ – CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCC3’

-M13: 5’ - GCCAGTCGACGTTGTAAAACGACG - 3’

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 5. Estudio de mutaciones del gen MLH1. Cebadores empleados para la amplificación de los exones y regiones intrónicas adyacentes, tamaños de los fragmentos amplificados en pares de bases y condiciones desnaturizantes de los geles.

Exón	Cebadores	Tamaño (pb)	Gradiente desnaturizante
1	(M13) 5' - AGACGTTTCCTTGGCTCTTC - 3' (Pinza CG) 5' - CCGTTAAGTCGTAGCCCTTA - 3'	257	50-70%
2	(Pinza CG) 5' - TTTTCTGTTTGATTTGCCAG - 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' - TTCTTTTCTTTTCAGTCTATTT - 3' (M13) 5' - TGAATATATATGAGTAAAAAGAAGTCAG - 3'	207	30-50%
5	(Pinza CG) 5' - TCTCTACTGGATATTAATTTGTT - 3' (M13) 5' - AAGCTTCAACAATTTACTCTCC - 3'	214	30-50%
6	(M13) 5' - CAAGAAAAATCAATCTTCTGTT - 3' (Pinza CG) 5' - ATGACAAATCTCAGAGACCC - 3'	223	30-50%
7	(M13) 5' - TCTAGTGTGTGTGTTTTGGCA - 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' - GGACAGTTTTGAACAGAGTTG - 3' (Pinza CG) 5' - GTCTTGGTTGAGGAGTTTGG - 3'	227	30-50%
11	(M13) 5' - AAGGTAATTGTTCTCTCTTATTTT - 3' (Pinza CG) 5' - CACAAGTAGCTGGATGAGAA - 3'	280	30-50%
12	(Pinza CG) 5' - TAATACAGACTTTTGTACCAGGA - 3' (M13) 5' - GGTAGGCTGTACTTTTCCCA - 3'	473	30-50%
13	(Pinza CG) 5' - CTGCACTTCCCTTTCTTCAT - 3' (M13) 5' - CCCTATGCATCCCAGGCA - 3'	270	30-50%
14	(Pinza CG) 5' - TGTTTTTGGTTTTATTTTTTG - 3' (M13) 5' - TCTGCTTGTTCACACTCA - 3'	232	30-50%
15	(Pinza CG) 5' - AATTCAGCTTTTCTTAAAGTC - 3' (M13) 5' - AAATTCAGAAGTGAAAAGGA - 3'	200	30-50%
16	(M13) 5' - CTCCTTCATGTTCTTGTTC - 3' (Pinza CG) 5' - AGAAGTATAAGAATGGCTGTCA - 3'	280	30-50%
17	(Pinza CG) 5' - TTCCCTTGTCTTTTTCTCG - 3' (M13) 5' - CATGTACCGAATGCTTAGTA - 3'	222	30-50%
18	(Pinza CG) 5' - TAAATTCGTACCTATTTTGAGG - 3' (M13) 5' - CCTGGGGTGCCAGTGTGCAT - 3'	251	15-30%
19	(M13) 5' - GGAGGCCTTATGACATCTAATG - 3' (Pinza CG) 5' - AAGAACACATCCCACAGTGC - 3'	300	30-50%

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 6. Estudio de mutaciones del gen MSH2. Cebadores empleados para la amplificación de los exones y regiones intrónicas adyacentes, tamaños de los fragmentos amplificados en pares de bases y condiciones desnaturalizantes de los geles.

Exón	Cebadores	Tamaño (pb)	Gradiente desnaturalizante
1	(M13) 5' - 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' - TCAAGAGTTTGTTAAATTTTTAAAA - 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' - CCATTCAACATTTTTAACCCCTT - 3'	308	15-30%
6	(M13) 5' - GCTTGCCATTCTTTCTATTTTATT - 3' (Pinza CG) 5' - GCAGGTTACATAAAACTAACGAAAG - 3'	277	30-50%
7	(M13) 5' - CATTAAATCAAGTTAATTTATTTC - 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' - GGATTTTGTCACTTTGTTCTGTT - 3' (Pinza CG) 5' - TCCAACCTCCAATGACCCAT - 3'	241	30-50%
10	(M13) 5' - TGGAATACTTTTTCTTTTCTTCTT - 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' - CCCACAAAGCCCAAAAACC - 3'	388	30-50%
13	(Pinza CG) 5' - ATAATTTGTTTTGTAGGCC - 3' (M13) 5' - TTTCTATCTTCAAGGGACTAGGAG - 3'	318	30-50%
14	(Pinza CG) 5' - CCACATTTTATGTGATGGGAA - 3' (M13) 5' - CCAATAGTACATACCTTCTTACC - 3'	370	30-50%
15	(M13) 5' - GTCCCCTCACGCTTCCC - 3' (Pinza CG) 5' - AAATATGAAAACAACTGACAAAC - 3'	295	30-50%
16	(M13) 5' - AATGGGACATTCACATGTGTT - 3' (Pinza CG) 5' - CCATGGGCACTGACAGTTAA - 3'	369	15-30%

MATERIAL Y MÉTODOS

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

• Tampón PCR 10X (BioTaq)	2'5 μ l
• dNTPs (1'25 mM)	2 μ l
• Cebador sentido (10 μ M)	2'5 μ l
• Cebador antisentido (10 μ M)	2'5 μ l
• ADN (50 ng)	X
• ADN Taq polimerasa (1 U) (BioTaq)	2 μ l
• H ₂ O destilada (hasta volumen final 25 μ l)	Y

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

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

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

Los productos de PCR se someten a una electroforesis vertical en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en un sistema *Dcode* (Bio-Rad). Una

solución es 100% desnaturizante cuando presenta una concentración de urea 7 M y 40% de formamida. Se describen las condiciones desnaturizantes para cada exón de *MLH1* y *MSH2* en las Tablas III.2 y III.3, respectivamente.

La electroforesis vertical se realiza a temperatura constante de 65°C durante 18 horas con una intensidad de corriente de 17 mA. Finalizada la electroforesis, el gel se tiñe con bromuro de etidio durante 15 minutos y se visualiza en un transiluminador de luz ultravioleta (*GelDoc 2000*, Bio-Rad).

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

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

5.2. Análisis de grandes deleciones genómicas.

El estudio de grandes deleciones genómicas de los genes *MLH1* y *MSH2* se realiza mediante la técnica de amplificación por PCR *multiplex* dependiente de ligación (*MLPA*). *SALSA P003 MLH1/MSH2* es la forma comercial de *MLPA* para el estudio completo de los exones de los genes *MLH1* y *MSH2* (MRC-Holland, Ámsterdam, Holanda). Presenta una mezcla de 42 sondas diferentes: una para cada uno de los 19 exones de *MLH1*, una para cada uno de los 16 exones de *MSH2* y 7 sondas que se utilizan como controles, y que corresponden a otros genes humanos localizados en distintos cromosomas (Tabla 7).

Tabla 7. Sondas utilizadas en el producto comercial de MLPA, SALSA P003 MLH1/MSH2, para la detección de grandes reordenamientos de los genes MLH1 y MSH2. Se indica la longitud de cada sonda y el exón del gen en el que se localiza, así como las sondas.

Longitud (nucleótidos)	Sonda MLPA	Posición 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		exón 1	
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		

MATERIAL Y MÉTODOS

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

A- Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas:

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

B- Reacción de ligación:

- La mezcla de ligación se prepara en hielo con los siguientes componentes:

3 μ l de Tampón A de la Ligasa 65.

3 μ l de Tampón B de la Ligasa 65.

25 µl de H₂O destilada y estéril.

1 µl de Ligasa 65.

- La temperatura del termociclador se lleva hasta 54°C y una vez alcanzada dicha temperatura, se añaden 32 µl de la mezcla a cada muestra.
- Por último, se incuban a 54°C durante 15 minutos y posteriormente a 98°C, tan sólo 5 minutos.

C- Reacción de PCR:

- La mezcla de PCR se prepara con los siguientes componentes:

2 µl de Cebadores SALSA:

Sentido: 5' - *GGGTTCCCTAAGGGTTGGA - 3'

Antisentido: 5' - GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA - 3'

*Marcado con fluorocromo.

2 µl de Tampón de Dilución de Enzima.

5'5 µl de H₂O destilada y estéril.

0'5 µl de ADN Taq Polimerasa SALSA.

- En otros tubos de 0'2µl se añade:

MATERIAL Y MÉTODOS

4 μ l de Tampón SALSA de PCR 10X.

26 μ l de H₂O destilada y estéril.

10 μ l de la reacción de ligación.

- Estos últimos tubos se colocan en el termociclador a 60°C y cuando estén a dicha temperatura, se añade a cada uno 10 μ l de la mezcla de PCR.
- La reacción de PCR se inicia bajo las siguientes condiciones:

95°C.....30''	}	33 ciclos
60°C.....30''		
72°C.....60''		
72°C.....20'		

- Por último, se cargan 6 μ l de producto de PCR en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se visualiza directamente bajo luz UV (GelDoc 2.000, Bio-Rad).

D- Visualización:

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

5.2.1. *MSH6*.

El estudio de mutaciones del gen *MSH6* se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (*dHPLC*) en condiciones parcialmente desnaturalizantes. El principio básico de esta técnica es la retención discriminante, a través de una matriz no porosa, de fragmentos de ADN que muestran complementariedad absoluta (homodúplex) y de fragmentos que no la muestran (heterodúplex).

- Amplificación de los exones y regiones intrónicas adyacentes.

Se diseñan cebadores que cubran toda la secuencia codificante del gen (exones) y regiones adyacentes. Se adquirieron los oligonucleótidos a través de *Sigma-Genosys Ltd* (Cambridgeshire, Gran Bretaña). En la Tabla 7 se indican las secuencias de los cebadores utilizados, el tamaño del fragmento amplificado por PCR, y las temperaturas y tiempos de las reacciones de PCR.

La composición de la mezcla de PCR es común para la amplificación de todos los fragmentos:

- Tampón PCR 10X (Roche).....2'5 µl
- MgCl₂1'5 µl
- dNTP (1'25 mM).....4 µl
- Cebador sentido (10 mM).....1 µl
- Cebador antisentido (10 mM).....1 µl
- ADN Taq Polimerasa (Roche) (1 U).....1 µl
- ADN (100 ng)X
- H₂O destilada (hasta volumen final 25 µl).....Y

Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad de éste de 100 ng. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 25 µl, dependerá del valor de X.

Las reacciones de PCR se realizan en un termociclador *GeneAmp® 9700* (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems). Los tiempos y ciclos de reacción varían entre fragmentos (Tabla 8):

Tiempos “largos”:

95°C.....5'	}	40 ciclos
95°C.....30''		

“T^a PCR”30”

72°C.....45”

2°C.....7’

Tiempos “intermedios”:

95°C.....5’

95°C.....30”

50°C.....30”

} 5 ciclos

72°C.....30”

95°C.....30”

52°C.....30”

} 5 ciclos

72°C.....30”

95°C.....30”

55°C.....30”

72°C.....30”

} 25 ciclos

72°C.....7’

Tiempos “cortos”:

95°C.....5’

95°C.....30”

} 35 ciclos

T^a PCR” . . .30”

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 8. Cebadores, tamaños de los productos amplificados, condiciones de amplificación y temperaturas de desnaturalización para la cromatografía de alto rendimiento, de cada uno de los fragmentos del gen *MSH6*.

Exón-fragmento	Cebadores	Tamaño (pb)	Tiempos PCR	Tª PCR (°C)	Tª DHPLC (°C)
1A	5' - TCCGTCCGACAGAACGGTTG - 3' 5' - TTCGCGTGAGGCCCTGGCCGA - 3'	129	Largo	55	66'0
1B	5' - CGCTGAGTGATGCCAACAAAG - 3' 5' - CAACCCCCTGTGCGAGCCTC - 3'	300	Largo	48	67'1
2	5' - AACTAAGTTATGTATTTCCT - 3' 5' - CCTGTCTGTCTGTTTCTCTC - 3'	300	Intermedio	55	59'4
3ª	5' - GAACTGCTGGGATTACAGGC - 3' 5' - GTATTTCAGGCTTTGCACTG - 3'	130	Corto	63	59'1
3B	5' - CCCAGAAGGGAGGTCATTTT - 3' 5' - CCCCATCACCCCTAACATAAA - 3'	200	Largo	55	58'6
4ª	5' - CCAAATTTTGATTTGTTTTT - 3' 5' - CCACATCAGAGCCACCAATG - 3'	207	Largo	55	58'3
4B	5' - CGAAGGGTCATATCAGATTC - 3' 5' - ATACCAAACAGTAGGGCGAC - 3'	357	Largo	55	59'0
4C	5' - CGTTAGTGGAGGTGGTGATG - 3' 5' - ATGAATACCAGCCCCAGTTC - 3'	303	Corto	55	58'4
4D	5' - CTGTACCACATGGATGCTCT - 3' 5' - CTCTCTTTTTTCTTTGAGG - 3'	304	Corto	48	58'5
4E	5' - CCTCTGAGAACTACAGTAAG - 3' 5' - CCAAACTGGGAGCCGGGTA - 3'	293	Corto	50	57'1
4F	5' - CTGTTCTCTTCAGGAAGGTC - 3' 5' - AGCCATTGATAAAAAGTCCT - 3'	271	Corto	55	58'5
4G	5' - CCTCAAAAAATGCCTTATTTG - 3' 5' - AGCCATTGCTTTAGGAGCCG - 3'	304	Corto	55	56'7
4H	5' - ACTTGCCATACTCCTTTTGG - 3' 5' - TCCAGAGCAGAAAGAAAATC - 3'	299	Corto	48	57'7
4I	5' - CTACATACAGCAAGAAGAAG - 3' 5' - CCTGCTTTGGGAGTAATAAG - 3'	253	Largo	55	56'0
4J	5' - GAAAAGGCTCGAAAGACTGG - 3' 5' - TCGTTTACAGCCCTTCTTGG - 3'	230	Corto	45	59'1
4K	5' - GAAGAATACGACTTGAAATC - 3' 5' - GCACTACTTATCAAAGCCTG - 3'	244	Corto	46	57'6
5ª	5' - AAAACCCCAAACGATGAAG - 3' 5' - GTCTTCGTAATGCAAGGATG - 3'	220	Corto	60	59'2
5B	5' - CTTAGAGCTTAAAGGATCAC - 3' 5' - CTTTCTGATAACAAAACCTTT - 3'	208	Largo	54	57'1
6	5' - CTTTATGAAACTGTACTACC - 3' 5' - GCAAATATCTTTTATCACAT - 3'	237	Corto	50	56'6
7	5' - GAGTATTCATTTGTGATTTT - 3' AAATGTTTTTAAGATAGATAGTCTTC - 3'	171	Corto	50	53'7
8	5' - CCTTTTTTGTTTTAAATCCT - 3' 5' - CAAGAGAAGTGCCCTCTCAA - 3'	268	Corto	50	56'4

- Cromatografía líquida de alto rendimiento (dHPLC).

Se utiliza el sistema *WAVE*® (Transgenomic, Gran Bretaña) (Figura III.2), basado en la cromatografía líquida de intercambio iónico en fase reversa. Consiste en una columna rellena de una matriz no porosa de bolas de polímeros de poliestireno-divinilbenceno (fase estacionaria). A estas bolas están unidas a cadenas de 18 carbonos (C-18) que forman puentes C-C. Por su naturaleza, las bolas de la columna son electrostáticamente neutras e hidrofóbicas, por lo que no reaccionan con los ácidos nucleicos. Para facilitar esta unión, se añade acetato de trietilamonio (TEAA), que actúa como molécula puente que ayuda a la adsorción de los ácidos nucleicos a las bolas, ya que es una molécula hidrofóbica y con carga positiva. El ADN debe estar parcialmente desnaturalizado. Para ello debe de aplicarse una temperatura de desnaturalización que es específica para fragmento ya que depende de la longitud y secuencia de bases.

La fase móvil del sistema consiste en una combinación de tampones que extraen el ADN de la columna: TEAA 0'1 M mezclado con acetonitrilo al 25%. A concentraciones mayores de acetonitrilo, la interacción hidrofóbica entre la matriz y el ADN/TEAA se va debilitando y los fragmentos comienzan a salir de la columna, en primer lugar los heterodúplex y posteriormente los homodúplex (Figura III.2).

Los fragmentos de ADN pasan por un detector ultravioleta a medida que van saliendo de la columna, de manera que el software (*Navigator*, Sistema *WAVE*, Transgenomic) lo representa en forma de picos.

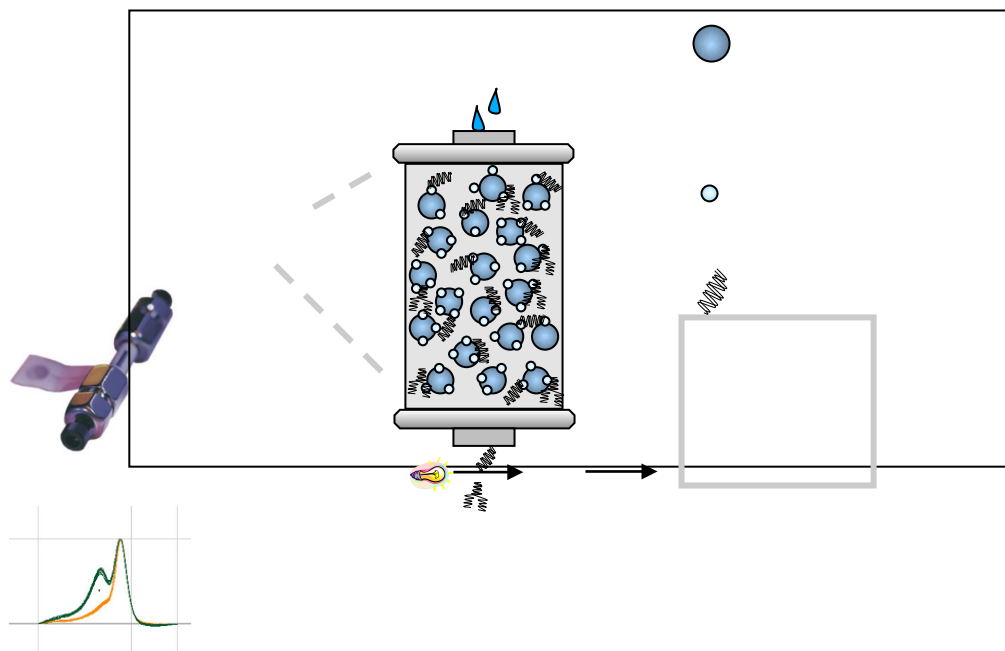


Figura 8. Esquema representativo de una columna del sistema WAVE. La fase estacionaria es una matriz de bolas de poliestireno-divinilbenceno-C18, a la que se une el acetato de trietilamonio y posteriormente los fragmentos de ADN. La columna se encuentra incluida en un horno que permite trabajar en condiciones desnaturalizantes.

Los casos con una mutación o un polimorfismo en uno de los alelos (heterocigotos), presentan un ratio 1:1 de alelo normal/mutado. En estos casos, cuando se desnaturaliza el ADN a 95 °C y se va enfriando (renaturalizando) poco a poco, se forma una mezcla de homo- y heterodúplex. Estos últimos saldrán de la columna en primer lugar, visualizándose como un pico previo al correspondiente a los homodúplex (Figura III.3, cromatograma verde).

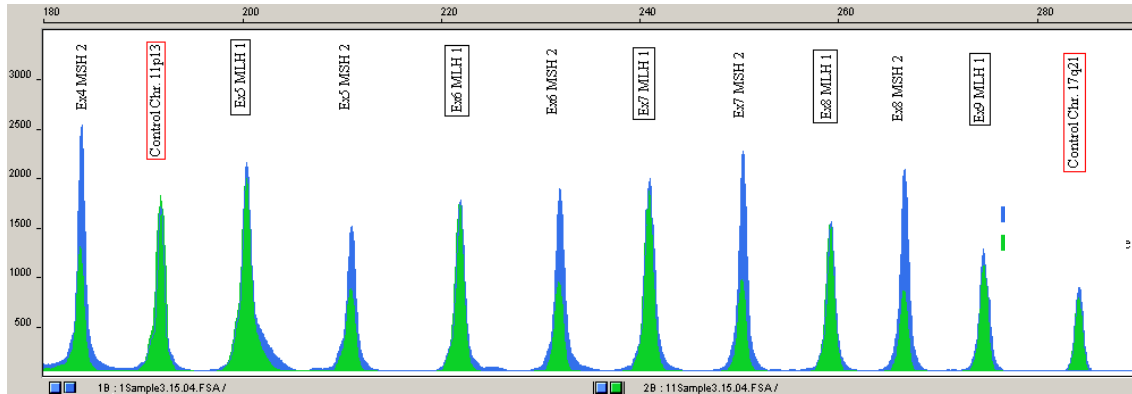


Figura 9. Visualización mediante GeneScan 3.5 de grandes reordenamientos estudiados mediante MLPA.

En el ejemplo, en azul está representada una muestra control (normal) y en verde, una muestra con una delección de varios exones del gen MSH2.

- Secuenciación.

Todos los productos de PCR en los que se detectan variantes mediante la técnica de dHPLC, son secuenciados con el objeto de definir si se trata de una variante polimórfica o de una mutación.

El producto de PCR se purifica para eliminar los restos de cebadores y dNTPs no utilizados en la reacción de amplificación (*High Pure PCR Product Purification Kit*,

MATERIAL Y MÉTODOS

Roche Diagnostics GmgH, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de PCR purificados se secuencian de forma automática mediante el sistema *ABI Prism* (Applied Biosystems, EEUU) de terminadores fluorescentes *Big DyeTM* y un secuenciador multicapilar *ABI* modelo 3.700.

Se realiza una reacción de secuenciación cíclica de 20 µl de volumen final que contiene: 10 µM del cebador sentido o antisentido (a elección), 5% de DMSO, 4 µl del terminador *Big Dye* y 4-12 ng del producto purificado (en función del tamaño del fragmento). La reacción se lleva a cabo en un termociclador *Gene Amp PCR system 9700* (Perkin Elmer, EEUU) en las siguientes condiciones:

95°C.....10''	}	10 ciclos
50°C.....5''		
60°C.....4'		

El producto final es purificado por ultrafiltración en columnas *Sephadex G-50* (Millipore), para ser analizado mediante el secuenciador multicapilar *ABI 3700*.

Las secuencias se visualizan mediante el visor de cromatogramas *Chromas* (<http://www.technelysium.com.au>).

5.3. Estudio de hipermetilación del promotor del gen *MLH1*.

Para las distintas partes del estudio se emplearon modificaciones de protocolos previamente descritos (Suter CM et al.2004, Herman JG et al. 1998).

Consideramos que una muestra presenta hipermetilación del promotor de *MLH1* en línea germinal cuando las tres pruebas que se realizan para este estudio lo corroboran.

5.3.1. Controles.

Como controles positivos de hipermetilación del promotor de *MLH1* se utilizaron las líneas celulares de cáncer colon RKO y SW48. Estas dos líneas están caracterizadas por no presentar mutación en ninguno de los genes de reparación, por mostrar IMS y por tener en ambos alelos del gen *MLH1* hipermetilación del promotor.

Como control negativo empleamos sangre periférica de un control normal de la población.

5.3.2. Modificación con bisulfito sódico.

En esta reacción todas las citosinas (C) se convierten en uracilos (U), pero aquellas que están metiladas (5-metilcitosina) son resistentes a esta modificación y permanecen como citosinas (Wang Y et al. 2003). Este ADN modificado puede ser amplificado y secuenciado, proporcionando así información detallada, dentro de la región amplificada, del estado de metilación de todas las islas CpG.

MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo del tratamiento con bisulfito y la posterior purificación y precipitación del ADN modificado se detalla a continuación:

- Preparar en tubos de 1'5 ml:

10 μ l de ADN a concentración 100 ng/ μ l.

40 μ l de H₂O destilada.

5'7 μ l de NaOH 3 M.

- Desnaturalizar 10-15 minutos a 37°C.
- Durante el tiempo de desnaturalización, preparar:

Hidroquinona 16'4 mM (45 mg en 25 ml de H₂O destilada).

Bisulfito sódico 3'03 M pH 5 (3.8 g en 10 ml de H₂O destilada y 100 μ l de NaOH 10 M para ajustar el pH) y protegerlo de la luz.

- Añadir 33 μ l de hidroquinona 16'4 mM y 530 μ l de bisulfito sódico 3'03 M pH 5 a los tubos con el ADN desnaturalizado. Agregar una gota de aceite de mineral.
- Incubar a 50°C durante 16 horas en oscuridad.
- Separar el aceite de la muestra pasando ésta a un nuevo tubo de 1'5 ml.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Preparar una unidad de filtración a vacío y colocar las columnas y jeringas de purificación *Wizard® DNA Clean-up* (Promega, Madison, WI, EEUU) identificadas con el número de cada muestra.
- Añadir 1 ml de resina *DNA Clean-up* a la muestra, resuspender y pasarlo a la jeringa.
- Abrir la bomba de vacío y las llaves correspondientes a cada columna.
- Una vez filtrada la muestra, lavar la columna con 1 ml de isopropanol al 80%, seguido de otro lavado con 800 µl de isopropanol al 80%.
- Descartar la jeringa y transferir la columna a un tubo de 1'5 ml.
- Centrifugar durante 1 minuto a 14.000 rpm a temperatura ambiente para eliminar restos de isopropanol.
- Transferir la columna a otro tubo de 1.5 ml y añadir 40 µl de agua destilada a 50°C para extraer el ADN de la columna. Se puede hacer una segunda extracción con 20 µl de agua.
- Añadir 4'4 µl de NaOH 3M a los 40 µl de ADN de la primera extracción y 2'2 µl a los 20 µl de la segunda.
- Incubar durante 15 minutos a 37°C (completar la reacción química de C a U).
- 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.
- Precipitar a -80°C.
- Centrifugar a 14.000 rpm 15 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante.
- Lavar con 800 µl de etanol frío al 75%.
- Centrifugar a 14.000 rpm 15 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante.
- Dejar secar el sedimento de ADN y resuspender en 20 µl de agua destilada.

5.3.3. PCR específicas de presencia y ausencia de metilación.

Las secuencias de los cebadores utilizados han sido descritas previamente ⁷². Se adquirieron los cebadores a través de *Sigma-Genosys Ltd* (Cambridgeshire, Gran Bretaña).

Cebadores específicos de metilación:

Sentido: 5' - ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC - 3'

Antisentido: 5' - CCTCATCGTAACTACCCGCG - 3'

Cebadores específicos de ausencia de metilación:

Sentido: 5' - TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT - 3'

Antisentido: 5' - ACCACCTCATCATAACTACCCACA - 3'

La mezcla de PCR, para un volumen final de 25 µl, para ambas reacciones contiene:

- Tampón PCR 10X (+MgCl₂).....2'5 µl
- dNTPs (1'25 mM).....4 µl
- Cebador sentido (20 mM).....0'5 µl
- Cebador antisentido (20 mM).....0'5 µl
- ADN modificado bisulfito.....X
- ADN Polimerasa *Herculase*® (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU).....0'2 µl
- H₂O destilada.....Y

Siendo X el volumen de la dilución de ADN modificado con bisulfito necesario para tener una cantidad de éste de 100 ng. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 25 µl, dependerá del valor de X.

La reacción de PCR se realiza en un termociclador *GeneAmp® 9700* de Perkin-Elmer (PE Applied Biosystems) en las siguientes condiciones:

95°C.....2'	}	40 ciclos
95°C.....5"		
58°C.....5"		
72°C.....20"		
72°C.....10'		

Los productos de PCR obtenidos (6 µl) se cargan directamente en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se visualiza directamente bajo luz UV (*GelDoc 2000*, Bio-Rad).

5.3.4. PCR independiente del estado de metilación.

La secuencia del promotor que corresponde a la de los cebadores que se utilizan en esta reacción de PCR no contiene islas CpG, por lo tanto, tras la modificación con bisulfito de sodio amplificarán tanto los casos con metilación de las islas CpG del promotor como los que no tienen estas islas metiladas.

Las secuencias de los cebadores utilizados han sido previamente descritas (Herman JG et al. 1998).

Sentido: 5' - GAGTAGTTTTTTTTTTTAGGAGTGAAG - 3'

MATERIAL Y MÉTODOS

Antisentido: 5' - AAAA ACTATA AAA ACCCTATACCTAATCTA - 3'

La mezcla de reactivos para la reacción de PCR, para un volumen final de 25 µl, contiene:

- Tampón PCR 10X (+MgCl₂).....2'5 µl
- dNTPs (1'25 mM).....4 µl
- Cebador sentido (100 mM).....1 µl
- Cebador antisentido (100 mM).....1 µl
- DMSO (dimetilsulfóxido).....1'25 µl
- ADN modificado bisulfito.....X
- ADN Polimerasa *Herculase® Enhanced DNA*.....0'2 µl
- H₂O destilada.....Y

Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad de éste de 100ng. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 25 µl, dependerá del valor de X.

La reacción de PCR se realiza en un termociclador *GeneAmp® 9700* de Perkin-Elmer (PE Applied Biosystems) en las siguientes condiciones:

95°C.....2'

} 40 ciclos

95°C.....5’’

58°C.....5’’

72°C.....20’’

72°C.....10’

Los productos de PCR obtenidos (6 μ l) se cargan directamente en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se visualiza directamente bajo luz UV.

- Digestión con enzima de restricción BstUI.

Entre 2 y 7 μ l del producto de PCR obtenido con los cebadores que amplifican independientemente del estado de metilación se digirieron con la enzima de restricción BstUI. La diana de restricción de esta enzima es la secuencia 5’-CG/CG-3’. Por lo tanto, cuando las islas CpG no están metiladas, tras la modificación con bisulfito esta secuencia se transforma en 5’-UGUG-3’, por lo que no será reconocida por BstUI, mientras que si están metiladas la secuencia original se conserva y la enzima realiza el corte.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las condiciones de digestión son las recomendadas por el fabricante (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, EEUU):

- Tampón 1X NE 2.....1'5 μ l

(Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂10 mM, ditiotreitól 1 mM)

- BstUI (10 U/ μ l).....0'3 μ l
- Producto de PCR.....X
- H₂O destilada (hasta volumen final 15 μ l).....Y

Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad suficiente para que la visualización de los productos digeridos sea adecuada. En general, el valor de X puede variar entre 3 y 9 μ l. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 15 μ l, dependerá del valor de X.

La mezcla se digestión se^B incuba^Ca 60°C^D durante^E4 horas^Fy se carga todo el volumen (15 μ l) en un gel de agarosa al 3%: 1'5% de agarosa media de Pronadisa y 1'5% de agarosa Metaphor (Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Rockland, EEUU) (figura 10).

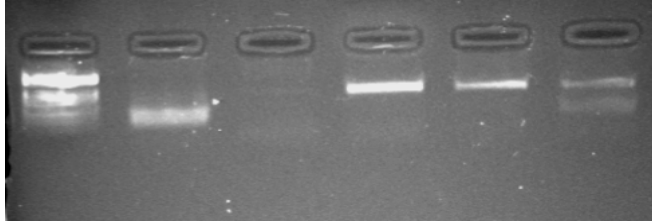


Figura 10. Visualización en gel de agarosa de la técnica combinada de modificación con bisulfito y digestión con la enzima BstUI.

A) Marcador de peso molecular M5. B) Control positivo de hipermetilación bialélica del promotor de MLH1: línea de cáncer.

- Secuenciación.

El volumen de producto de PCR que no se ha utilizado para la digestión, se purifica para eliminar los restos de cebadores y dNTPs no utilizados en la reacción de amplificación (*High Pure PCR Product Purification Kit*, Roche Diagnostics GmgH, Mannheim, Alemania), y se secuencia de forma automática mediante el sistema *ABI Prism* de terminadores fluorescentes *Big Dye™* y un secuenciador multicapilar *ABI* modelo 3.700.

El objetivo de esta secuenciación es la visualización de los picos correspondientes a las islas CpG. Cuando no existe metilación de las islas de la secuencia, tras la modificación con bisulfito, las citosinas se transforman, por lo que en la secuencia, el pico corresponderá en su totalidad a una timina. Sin embargo, cuando

uno de los alelos del promotor está metilado se observan dos picos superpuestos (C y T) de aproximadamente el mismo área (Figura III.5).

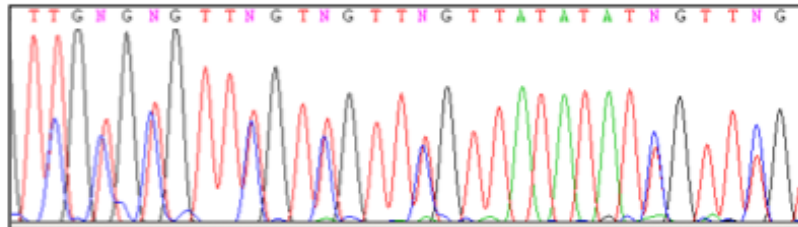


Figura 11. Resultado de la secuenciación de un caso que presenta un alelo del gen MLH1 con hipermetilación del promotor.

6. INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS DEL SISTEMA DE REPARACIÓN: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*.

Las hibridaciones inmunohistoquímicas con los anticuerpos seleccionados se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, de Madrid (Dra. Yolanda Rodríguez).

El proceso consta de los siguientes pasos:

- Se desparafinan las secciones de 4 μm de tejido fijado en formol e incluido en parafina durante 12 horas en la estufa a 36°C.
- Posteriormente se hidratan con sucesivos pases de alcoholes durante periodos de tiempo variable: 10 minutos en xileno (2 veces), 5 minutos en etanol al 100%, 5 minutos en etanol al 95%, 5 minutos en etanol al 70% y 2 minutos en agua destilada.
- Se lleva a cabo el desenmascaramiento antigénico por medio de una olla a presión en tampón de citrato sódico 10mmol/l a pH 5'6, durante 3 minutos.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Se inactiva la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% (solución bloqueante S2023, DAKO, Glostrup, Dinamarca), durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Después se incuba el anticuerpo primario a la dilución adecuada.
- La inmunodetección se realiza con inmunoglobulinas anti-ratón (anticuerpo secundario), biotiniladas, para después realizar la adición de estreptavidina marcada con peroxidasa y de diaminobenzidina como sustrato. Todas las tinciones inmunohistoquímicas fueron llevadas a cabo mediante el robot automatizado *TechMate 500* (DAKO).
- Por último se contratiñen las secciones con hematoxilina de Harry, se lavan y deshidratan a través de sucesivos pases por alcoholes: 30'' en etanol al 95%, 30'' en etanol al 100%, 10 minutos en xileno y 1 hora en xileno.

Las características de los anticuerpos y las diluciones utilizadas en cada caso, se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Anticuerpos utilizados, casas comerciales, clones y diluciones utilizadas para realizar la técnica de inmunohistoquímica en cortes de tejido incluido en parafina.

	Marcador	Clon	Proveedor
Proteínas del Sistema de reparación	Mlh1	BD PharMingen	G168-15
	Msh2	Oncogene	FE11
	Msh6	BD Transduction Lab.	44

Como se ha señalado previamente en la introducción, existen numerosos estudios que muestran que el análisis inmunohistoquímico utilizando anticuerpos para detectar las proteínas *MLH1*, *MSH2* Y *MSH6* es un método útil para identificar portadores de mutación en los genes de reparación (Berends MJ et al. 2001, Muller W et al. 2001, Christensen M et al. 2002, Hendriks Y et al. 2003). De igual manera, también

se ha indicado que esta técnica *per se* no es suficiente para la selección de casos para el estudio de los genes de reparación, siendo necesaria la utilización de otros estudios o criterios, como son la IMS y los criterios clínicos de Ámsterdam y Bethesda (Salahshor S et al. 2001, Lindor NM et al. 2002, Wahlberg SS et al. 2002, Muller A et al. 2004, Hampel H et al. 2005).

A la hora de valorar la IHQ de las proteínas de reparación del ADN, Mlh1, Msh2 y Msh6, los casos se consideraron positivos o negativos según la presencia o ausencia de expresión de dichas proteínas.

7. DETERMINACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL *BRAF*.

El exón 15 del gen *BRAF*, incluyendo el "punto caliente" V600E, fue estudiado mediante análisis de *High-resolution melting*. Los "primers" fueron diseñados usando el NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Cada reacción de mezcla contuvo 3 ng de ADN, 0.3 mmol/L de cada "primer", 3 mmol/L MgCl₂ más *Light Cycler LC480 high-resolution melting master mix* (Roche), y agua, hasta conseguir un volumen final de 10mL. Las condiciones para el ciclo de PCR fueron las siguientes: 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 72°C para 15 segundos, seguidos por 5 minutos de extensión a 72. El análisis de la curva de fusión se realizó de 40 a 95°C, a una proporción de 0.02°C por segundo para el mismo proceso. Los productos de PCR de muestras con diferente patrón fueron tratadas con reactivo ExoSAP-IT (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y secuenciados usando BigDye XTerminator v3.1 (Applied Biosystems) y con un secuenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems).

Estudiamos las mutaciones del gen *BRAF* con el fin de ver la relación entre su estado mutacional y el estado del fenotipo metilador, y para identificar posibles casos de IMS esporádica. Posteriormente esto se confirmó a su vez mediante la determinación del estado de metilación del promotor de *MLH1*.

8. ANÁLISIS DEL FENOTIPO METILADOR DE ISLOTES CpG.

El estado de metilación de las regiones promotoras del panel de genes del Fenotipo Metilador de Islotes CpG comprendía los siguientes genes: *CACNA1G*, *CDKN2A*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* y *SOCS1* (Ogino S et al. 2006, Weisenberger DJ et al. 2006). Fueron estudiados mediante la técnica de “*methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*” (MS-MLPA) (Nygren AO et al. 2005), usando el kit comercial SALSA MLPA (ME042-B1, MRC-Holland), siguiendo el procedimiento recomendado por el distribuidor. Los productos de MS-MLPA fueron analizados mediante electroforesis capilar en un analizador 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y los picos consiguientes examinados usando 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 HhaI dada y su equivalente no-digerido. El FM-Alto se definió como la presencia de $\geq 6/8$ promotores de genes metilados, FM-Bajo cuando presentaba de $1/8$ a $5/8$ promotores de genes metilados, mientras que el FM-0 resultó de la ausencia ($0/8$) de promotores de genes metilados (Ogino S et al. 2007).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

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

Para comparar las características familiares, clínico-patológicas, genéticas e inmunohistoquímicas entre las diferentes categorías dentro de cada grupo y entre los dos grupos, se utilizó la prueba de Chi cuadrado (χ^2) de Pearson para variables categóricas, o bien 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.17.0* para *Windows* (Chicago, Illinois, EEUU).

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

RESULTADOS

V. RESULTADOS.

1. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-CLÍNICAS.

En el grupo de CCR de aparición temprana, con edad igual o inferior a 45 años, se incluyeron 88 casos y en el grupo de CCR de aparición tardía, con edad igual o superior a los 70 años, se incluyeron 100 casos. Fueron excluidos 6 pacientes del grupo de los menores y 3 del grupo de mayores por tratarse de PAF.

La edad media al diagnóstico de CCR fue de 39,56 años con una desviación estándar de 4,9 años para el grupo de los jóvenes, con un rango de edades que iba desde los 27 años como edad más precoz de diagnóstico, hasta los 45 años. La edad media al diagnóstico en el grupo de los mayores fue de 77,9 años con una desviación estándar de 5,7 años, con un rango de edades que iba desde los 70 años hasta los 89 años, (tabla 9).

Se encontró predominio del sexo masculino en el grupo de jóvenes (49 (59,8%) fueron varones). En el grupo de mayores de 69 años hubo equivalencia entre mujeres y hombres como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Edad media al diagnóstico de CCR y distribución por sexo según la edad de aparición del tumor.

Característica	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Pacientes	82 (100)	97 (100)	
Edad media de aparición (años) ± DE	39,56 ± 4,9	77,9 ± 5,7	
Sexo			NS
Hombre	49 (59,8)	50 (51,5)	
Mujer	33 (40,2)	47 (48,5)	

Los datos son dados en número (porcentaje).
DE: Desviación estándar.

En el grupo de los pacientes jóvenes hubo un predominio de afectación del colon izquierdo (42,7%) en comparación con el colon derecho y el recto (24,4% y 32,9% respectivamente). En el grupo de mayores de 69 años, se encontró distribución más homogénea con leve predominio de localización en el colon derecho y del recto (39,2% y 38,1% respectivamente) ($p=0,013$) (tabla 11).

Tabla 11. Localización del CCR según la edad de aparición del tumor.

Característica	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Localización			
Colon derecho	20 (24,4)	38 (39,2)	
Colon izquierdo	35 (42,7)	22 (22,7)	
Recto	27 (32,9)	37 (38,1)	0,013

Los datos son dados en número (porcentaje).

Respecto al grado de diferenciación tumoral, se observó mayor proporción de casos con pobre diferenciación tumoral en el grupo de jóvenes (13,3% frente al 4,4% de los mayores de 69 años) dato estadísticamente significativo.

Otras características anatómo-patológicas fueron: el 31,7 % de los pacientes jóvenes presentaron tumores mucosecretorios estando éstos presentes en tan sólo el 19,8% de los pacientes mayores; la presencia de células en “anillo de sello” se objetivó en el 6,7% de los sujetos jóvenes frente al 2,2% en el grupo de los mayores de 69 años. En la tabla 12 se muestran los datos histopatológicos.

Tabla 12. Características anatómo-patológicas del CCR según la edad de aparición del tumor.

Característica	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Tumor pobremente diferenciado	8/60 (13,3)	4/90 (4,4)	0,036
Productor de moco	19/60 (31,7)	18/91 (19,8)	0.09
Células en anillo de sello	4/60 (6,7)	2/91 (2,2)	0,22

Los datos son dados en número (porcentaje).

Se analizó el CCR según el estadio. Entre los jóvenes, se encontró una distribución equivalente aunque con ligero predominio de los estadios A (28%) y B (31,7%) de Dukes frente a estadios avanzados C (17,1%) y D (23,2%). En los mayores, es significativa la pequeña proporción de pacientes diagnosticados en estadio precoz A de Dukes de 5,2% frente a B (49,5%), C (25,8%) y D (19,6%) (tabla 13).

Tabla 13. Estadificación tumoral según la edad de aparición del tumor.

Característica	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Estadio Dukes			
A	23 (28.0)	5 (5,2)	
B	26 (31,7)	48 (49,5)	
C	14 (17,1)	25 (25,8)	
D	19 (23,2)	19 (19,6)	< 0,001

Los datos son dados en número (porcentaje).

Jóvenes y mayores presentaron una frecuencia similar de presencia de pólipos en asociados (56,1% y 63,9% respectivamente). Las proporciones de los tipos de pólipos también fueron equiparables en ambos grupos: predominaron los pólipos adenomatosos (47,1% y 61,3%), seguidos de los mixtos (34,8% y 29%) y en menor proporción los pólipos hiperplásicos (17,4% y 9,7%) (Tabla 13). El grupo de pacientes mayores presentó un mayor número de neoplasia primaria múltiple que los jóvenes (34% Vs 13,4%) y de lesiones sincrónicas y/o metacrónicas (21,6% Vs 6,1%) (tabla 14).

Tabla 14. Pólipos asociados y presencia de neoplasia primaria múltiple, CCR sincrónico o metacrónico según la edad de aparición del tumor.

Característica	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Pólipos asociados	46 (56,1)	62 (63,9)	0,22
Adenomatoso	22 (47,8)	38 (61,3)	0,24
Hiperplásico	8 (17,4)	6 (9,7)	NS
Mixtos	16 (34,8)	18 (29,0)	NS
Neoplasia primaria múltiple	11 (13,4)	33 (34,0)	< 0,001
CCR sincrónico o metacrónico	5 (6,1)	21 (21,6)	< 0,004

Los datos son dados en número (porcentaje).

2. CARACTERÍSTICAS FAMILIARES.

En cuanto a los antecedentes familiares, en los pacientes jóvenes la agregación familiar relacionada estuvo principalmente relacionada con neoplasias propias de SL (26,6%) mientras que el 19,5% cumplía criterios de Ámsterdam y el 15,9% tenía agregación familiar con tumores no relacionados con SL. Un 39% de los CCR correspondieron a casos esporádicos.

De manera estadísticamente significativa, la mayoría de los pacientes mayores presentó casos esporádicos (80,4%), sólo un paciente (1%) cumplió criterios de Ámsterdam tipo II y se observó agregación familiar para tumores relacionados o no con SL en menor proporción que en los jóvenes (12,4% y 6,2% respectivamente) (tabla 15).

Tabla 15. Características familiares del CCR según la edad de aparición del tumor.

Característica	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Historia familiar de cáncer			<0,001
Familias con criterios de Ámsterdam II	16 (19,5)	1 (1,0)	
Presencia de agregación familiar con neoplasia relacionada con SL	21 (26,6)	12 (12,4)	
Presencia de agregación familiar con neoplasia no relacionada con SL	13 (15,9)	6 (6,2)	
Casos esporádicos	32 (39,0)	78 (80,4)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES.

21 tumores fueron definidos como IMS (11,8%), y los 157 restantes (88,2%) fueron definidos como tumores EMS. La IMS coincidió en todos los casos con la ausencia de expresión en alguna de las proteínas del sistema MMR en el análisis IHQ. Once de los 21 casos analizados (52,4%) presentaron una mutación en la línea germinal de uno de los genes MMR.

3.1. Comparación de los grupos según la IMS.

Se estudiaron las características clínico-patológicas y familiares entre ambos grupos (IMS y EMS) tanto en la población de menores de 45 años como en mayores de 69 años. Se analizaron estas características por separado, individualizando ambos grupos por edad y comparando los casos IMS y EMS en cada uno de ellos.

3.1.1. Análisis comparativo dentro del grupo de jóvenes.

- Características clínico-patológicas.

En el grupo de menores de 45 años, se observó que los pacientes con EMS presentaban una edad mayor al diagnóstico de CCR (40,4 años frente a los 34,33 años

RESULTADOS

de los IMS). Los tumores IMS fueron más frecuentes en hombres (75%) mientras que cuando existía EMS, las diferencias fueron menores (58% hombres), siendo el dato estadísticamente significativo (tabla 16).

Tabla 16. Edad media al diagnóstico de CCR y distribución por sexo según IMS en pacientes jóvenes.

Característica	IMS Aparición temprana	EMS Aparición temprana	<i>p</i>
Pacientes	12 (14,8)	69 (85,2)	
Edad media de aparición (años) ± DE	34,33 ± 4,9	40,4 ± 4,3	NS
Sexo			
Hombre	9 (75,0)	40 (58,0)	
Mujer	3 (25,0)	29 (42,0)	0,008

Los datos son dados en número (porcentaje).
DE: Desviación estándar.

En los pacientes jóvenes, los tumores EMS se localizaron en menor proporción en el colon derecho (20,3%) comparado con el izquierdo y el recto (42% y 37,7% respectivamente) mientras que en los tumores IMS no hubo afectación del recto y se distribuyeron en igual proporción en el resto del colon ($p=0,02$) (tabla 17).

Tabla 17. Localización del tumor según IMS en pacientes jóvenes.

Característica	IMS Aparición temprana	EMS Aparición temprana	<i>p</i>
Localización			
Colon derecho	6 (50)	14 (20,3)	
Colon izquierdo	6 (50)	29 (42,0)	
Recto	0	26 (37,7)	0,02

Los datos son dados en número (porcentaje).

En lo que respecta al estadio en este grupo de pacientes, se observó que con mayor frecuencia se diagnosticaron los tumores EMS bien en estadio temprano o bien avanzado (A 31,9% y D 26,1%) y menos en estadios intermedios (B 24,6% y C 17,4%). Estos hallazgos fueron completamente opuestos a los de tumores IMS (A 8,3%, B 75%, C 16,7% y D 0%) (tabla 18). Se encontró una mayor proporción de estadios tempranos en los tumores IMS (83,3%) que en los EMS (56,5%).

Tabla 18. Estadio del tumor según IMS en pacientes jóvenes.

Característica	IMS Aparición temprana	EMS Aparición temprana	<i>p</i>
Estadio			
A	1 (8,3)	22 (31,9)	
B	9 (75,0)	17 (24,6)	
C	2 (16,7)	12 (17,4)	
D	0	18 (26,1)	<0,001

Los datos son dados en número (porcentaje).

RESULTADOS

A pesar de no alcanzar significación estadística, los CCR IMS mostraron con mayor frecuencia producción de mucina (54,9% frente al 26,5% de los EMS), pobre diferenciación (18,2% frente a 12,2%), células en “anillo de sello” (18,2% frente a 4,1%) (tabla 18), así como mayor presencia de tumores sincrónicos y/o metacrónicos (16,7% frente a 4,3% no referenciados en tabla). En cuanto a la presencia de pólipos asociados con el CCR, se encontraron resultados equivalentes, aunque algo más frecuentes en tumores IMS que en EMS (66,7% y 53,6%, respectivamente). No hubo diferencias significativas en cuanto al tipo de pólipo (tabla 19).

Tabla 19. Características anatómo-patológicas de los tumores y de los pólipos asociados según IMS en pacientes jóvenes.

Característica	IMS Aparición temprana	EMS Aparición temprana	<i>p</i>
Pobre diferenciación	2/11 (18,2)	6/49 (12,2)	NS
Productor de moco	6/11 (54,9)	13/49 (26,5)	0,07
Células en anillo de sello	2/11 (18,2)	2/49 (4,1)	0,48
Pólipos asociados	8 (66,7)	37 (53,6)	0,25
Adenomatoso	2 (25,0)	20 (54,1)	
Hiperplásico	2 (25,0)	6 (16,2)	
Mixtos	4 (50,0)	11 (29,7)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

- Características familiares.

En los pacientes jóvenes, los tumores con IMS presentaron una mayor proporción de agregación familiar que los tumores EMS. Cuando existía IMS, el 83,3% cumplía con criterios de Ámsterdam y el resto presentaba neoplasias relacionadas con SL mientras que en los EMS predominaron los casos esporádicos (46,4%), la agregación familiar con neoplasias no asociadas a SL (18,8%) o asociadas a SL (26,1%), y sólo un 8,7% cumplía con criterios de Ámsterdam (tabla 20). Estas características junto con las otras descritas previamente (menor edad de presentación, mayor frecuencia de localización en el colon derecho y estadios tempranos al diagnóstico) confirman la asociación existente entre este grupo de jóvenes con IMS y el SL. En los jóvenes IMS, no hubo ningún caso de CCR esporádico.

Tabla 20. Características familiares según la presencia de inestabilidad de microsatélites en pacientes jóvenes.

Característica	IMS Aparición temprana	EMS Aparición temprana	<i>p</i>
Historia familiar de cáncer			0,0005
Familias con criterios de Ámsterdam II	10 (83,3)	6 (8,7)	
Presencia de agregación familiar con neoplasia relacionada con SL	2 (16,7)	18 (26,1)	
Presencia de agregación familiar con neoplasia no relacionada con SL	0	13 (18,8)	
Casos esporádico	0	32 (46,4)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

3.1.2. Análisis comparativo dentro del grupo de mayores.

- Características clínico-patológicas.

La edad al diagnóstico de CCR en este grupo fue similar tanto para tumores IMS como para tumores EMS (75,8 y 78,1 respectivamente). En cuanto a distribución por género, observamos una preferencia por la mujer en los casos de tumores IMS (88,9%), no ocurriendo así en los casos de tumores EMS donde el reparto fue equitativo (mujeres 44,3%)(tabla 21).

Tabla 21. Edad media al diagnóstico de CCR y distribución por sexo según IMS en pacientes mayores.

Característica	IMS Aparición tardía	<i>p</i>	EMS Aparición tardía	<i>P</i>
Pacientes	9 (9,3)		88 (90,7)	0,001
Edad media de aparición (años) ± DE	75,8 ± 5,7		78,1 ± 5,7	NS
Sexo				
Hombre	1 (11,1)		49 (55,7)	
Mujer	8 (88,9)	0,008	39 (44,3)	NS

Los datos son dados en número (porcentaje).

DE: Desviación estándar.

La localización del CCR fue más frecuente en el colon derecho (77,8%) sin existir afectación del recto en el caso de IMS mientras que en los tumores EMS, la distribución fue similar salvo por un leve predominio en el recto (colon derecho 35,2%, izquierdo 22,7% y recto 42%) ($p=0,002$) (tabla 22).

Tabla 22. Localización del tumor según IMS en pacientes mayores.

Característica	IMS Aparición tardía	EMS Aparición tardía	<i>p</i>
Localización			
Colon derecho	7 (77,8)	31 (35,2)	
Colon izquierdo	2 (22,2)	20 (22,7)	
Recto	0	37 (42)	0,002

Los datos son dados en número (porcentaje).

En lo que respecta a la diferenciación tumoral, los tumores IMS mostraron una pobre diferenciación en mayor proporción que los EMS (11,1% Vs 3,7%). Los tumores EMS presentaron una mayor proporción de presencia de células en “anillo de sello” (2,4%) y producción de mucina (20,7%), comparado con los tumores IMS (0 y 11,1% respectivamente) (tabla 23).

Tabla 23. Características anatómo-patológicas de los tumores y de los pólipos asociados según IMS en pacientes mayores.

Característica	IMS Aparición tardía	EMS Aparición tardía	<i>p</i>
Pobre diferenciación	1/9 (11,1)	3/82 (3,7)	0,07
Productor de moco	1/9 (11,1)	17/82 (20,7)	0,07
Células en anillo de sello	0	2/82 (2,4)	0,48

Los datos son dados en número (porcentaje).

RESULTADOS

La distribución presentó diferencias por estadios con dominancia del estadio B de Dukes en EMS (45,9% mientras que A, C y D correspondían al 4,5%, 27,1% y 22,4% respectivamente), mientras que en los tumores IMS se observó una clara predominancia del estadio B (77,8 %) en el momento del diagnóstico (tabla 24) y sin tumores en estadio D.

Tabla 24. Estadio del tumor según IMS en pacientes mayores.

Característica	IMS	EMS	<i>p</i>
	Aparición tardía	Aparición tardía	
Estadio			
A	1 (11,1)	4 (4,5)	
B	7 (77,8)	39 (45,9)	
C	1 (11,1)	23 (27,1)	
D	0	19 (22,4)	<0,001

Los datos son dados en número (porcentaje).

La frecuencia de pólipos asociados al CCR fue similar en ambas categorías en este grupo de edad, con discreta inclinación a favor de tumores IMS (78% frente al 62,5% de los tumores EMS). Los pólipos asociados al tumor no presentaron diferencias significativas con respecto a su incidencia entre IMS (77,8%) y EMS (62,5%) ni a sus características: adenomatosos, hiperplásicos y mixtos (IMS 42,9%, 14,3%, 42,9% y EMS 9,1%, 27,3% y 33%). La presencia de tumores sincrónicos y/o metacrónicos fue mayor en el caso de los tumores IMS (33,3% Vs 20,5% de los EMS) así como de neoplasia primaria múltiple (44,4% Vs 33% de los EMS) (tabla 25).

Tabla 25. Características anatómo-patológicas de los tumores y de los pólipos asociados según IMS en pacientes mayores.

Característica	IMS Aparición tardía	EMS Aparición tardía	<i>p</i>
Pólipos asociados	7 (77,8)	55 (62,5)	0,25
Adenomatoso	3 (42,9)	5 (9,1)	
Hiperplásico	1 (14,3)	15 (27,3)	
Mixtos	4 (42,9)	29 (33)	
CCR sincrónico o metacrónico	3 (33,3)	18 (20,5)	NS
Neoplasia primaria múltiple	4 (44,4)	29 (33,0)	NS

Los datos son dados en número (porcentaje).

- Características familiares.

Por otro lado, la proporción de casos esporádicos fue más alta para los tumores EMS (81,8%) que para los tumores IMS (66,7%) en el grupo de mayores de 69 años. La agregación familiar representada por neoplasias relacionadas y no relacionadas con SL también fue menor en los mayores con EMS (11,4% y 5,7% respectivamente) frente a los IMS de la misma edad (22,2% y 11,1% respectivamente). Sólo 1 paciente mayor de 69 años cumplía con criterios de Ámsterdam y presentaba EMS (tabla 26).

Tabla 26. Características familiares según la presencia de inestabilidad de microsatélites en pacientes mayores.

Característica	IMS Aparición tardía	EMS Aparición tardía	<i>p</i>
Historia familiar de cáncer			NS
Familias con criterios de Ámsterdam II	0	1 (1,1)	
Presencia de agregación familiar con neoplasia relacionada con SL	2 (22,2)	10 (11,4)	
Presencia de agregación familiar con neoplasia no relacionada con SL	1/9 (11,1)	5 (5,7)	
Casos esporádicos	6 (66,7)	72 (81,8)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

3.1.3. Comparación entre tumores IMS en jóvenes y tumores IMS en mayores de 69 años.

- Características anatómo-clínicas y familiares.

Cuando se compararon las características de los tumores IMS en los dos grupos de edad, se encontraron varias diferencias significativas pese a ser un grupo constituido por pocos pacientes. 12 (14,8%) pacientes jóvenes y 9 (9,3%) mayores de 69 años presentaban IMS. Entre los menores de 45 años, un 75% eran hombres mientras que dentro de los mayores predominaban las mujeres (88,9%) (tabla 27).

Tabla 27. Características clínicas de los tumores IMS según la edad.

Característica	IMS		P
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pacientes	12 (14,8)	9 (9,3)	NS
Edad media (años) y DE	34,33 ± 4,9	75,8 ± 5,7	
Sexo			
Hombre	9 (75,0)	1 (11,1)	0,008
Mujer	3 (25,0)	8 (88,9)	

Los datos son dados en número (porcentaje).
DE: Desviación estándar.

Con respecto a la localización, en ningún caso hubo compromiso del recto pero si tendencia a comprometer el colon derecho (50% en pacientes jóvenes y 77,8% en mayores) (tabla 28).

Tabla 28. Localización de los tumores IMS según la edad.

Característica	IMS		P
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Localización			
Colon derecho	6 (50)	7 (77,8)	
Colon izquierdo	6 (50)	2 (22,2)	
Recto	0	0	0,37

Los datos son dados en número (porcentaje).

Los pacientes jóvenes presentaron más frecuentemente pobre diferenciación tumoral (18,2% Vs 11,1%), mayor producción de moco (54,9% Vs 11,1%) y mayor porcentaje de células en anillo de sello (18,2% Vs 0) (tabla 29) que los mayores.

Tabla 29. Características patológicas de los tumores IMS según la edad.

Característica	IMS		P
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pobre diferenciación	2/11 (18,2)	1/9 (11,1)	NS
Productor de moco	6/11 (54,9)	1/9 (11,1)	0,07
Células en anillo de sello	2/11 (18,2)	0	0,48

Los datos son dados en número (porcentaje).

Por otro lado, en los tumores IMS se encontró una proporción mayor en el grupo de mayores de 69 años de neoplasias de colon sincrónicas y/o metacrónicas (33,3% frente al 16,7% de los jóvenes) así como de neoplasia primaria múltiple (44,4% frente al 16,7% de los jóvenes) (tabla 30).

Tabla 30. Neoplasias asociadas a los tumores IMS según la edad.

Característica	IMS		P
	Aparición temprana	Aparición tardía	
CCR sincrónico o metacrónico	2 (16,7)	3 (33,3)	NS
Neoplasia primaria múltiple	2 (16,7)	4 (44,4)	NS

Los datos son dados en número (porcentaje).

La estadificación tumoral al diagnóstico mostró una distribución similar en ambos grupos de edad. Vale la pena resaltar que predominaron los estadios tempranos en ambos grupos de edades (83,3% eran estadios A y B en los jóvenes así como 88,9% en los mayores) (tabla 31).

Tabla 31. Estadio de los tumores IMS según la edad.

Característica	IMS		P
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Estadio			NS
A	1 (8,3)	1 (11,1)	
B	9 (75,0)	7 (77,8)	
C	2 (16,7)	1 (11,1)	
D	0	0	

Los datos son dados en número (porcentaje).

Los pólipos se presentaron con una frecuencia y características similares en los tumores IMS, independientemente de la edad (tabla 32).

Tabla 32. Pólipos asociados a los tumores IMS según la edad.

Característica	IMS		P
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pólipos asociados	8 (66,7)	7 (77,8)	NS
Adenomatoso	2 (25,0)	3 (42,9)	
Hiperplásico	2 (25,0)	1 (14,3)	
Mixtos	4 (50,0)	3 (42,9)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

Comparando las características de los tumores IMS de los dos grupos de edad, también se observaron diferencias en la agregación familiar. En los más jóvenes se evidenció un importante componente de cáncer familiar (agregación 100%, positividad para criterios de Ámsterdam II 83,3%) mientras que en el grupo de mayores de 69 años hubo una presencia mayoritaria de casos esporádicos (66,7%) (tabla 33).

Tabla 33. Agregación familiar en tumores IMS según la edad.

Característica	IMS		P
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Historia familiar de cáncer			0,29
Familias con criterios de Ámsterdam II	10 (83,3)	0	
Presencia de agregación familiar con neoplasia relacionada con SL	2 (16,7)	2 (22,2)	
Presencia de agregación familiar con neoplasia no relacionada con SL	0	1/9 (11,1)	
Casos esporádicos	0	6 (66,7)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

- Características moleculares.

Los tumores IMS en el grupo de jóvenes presentaron principalmente mutación en genes MMR (83,3%) lo que implica que corresponden a casos de SL, mientras que en el grupo de mayores de 69 años encontramos que las causas principales fueron mutaciones en *BRAF* (44,4%) o ausencia de expresión del gen *MLH1* por hipermetilación (87,5%), es decir IMS esporádica (tabla 34).

Tabla 34. Alteraciones genéticas en tumores IMS según la edad.

Característica	IMS		P
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Mutación en MMR	10 (83,3)	1 (11,1)	0,002
Mutación en BRAF	0	4 (44,4)	0,21
Ausencia de expresión Mlh1	5 (41,7)	7 (87,5)	0,18

Los datos son dados en número (porcentaje).

Se extrajo sangre de los *probandus* con tumores IMS para detectar las mutaciones *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*. En el grupo de los jóvenes, 10 de los 12 casos analizados presentaron una mutación, 4 en *MLH1*, 4 en *MSH2* y 2 en *MSH6*. Uno de los casos mostró ausencia de expresión del *MLH1* e hipermetilación de su promotor. En otro caso, no se pudo detectar ninguna mutación.

De los 9 casos IMS de la población anciana sólo uno resultó ser SL, mientras que otros siete presentaron hipermetilación del promotor de *MLH1* y/o mutación en *BRAF*.

3.1.4. Comparación entre tumores EMS en jóvenes y tumores EMS en mayores de 69 años.

La distribución por género fue similar en ambos grupos, con discreta preferencia por el sexo masculino (58% en jóvenes y 55,7% en mayores). En cuanto a la localización del tumor, hubo una distribución más homogénea predominando discretamente el lado izquierdo entre los jóvenes (42%) y el lado derecho y recto en los mayores de 69 años (35,2% y 42% respectivamente) (tabla 35).

Tabla 35. Características clínicas de los tumores EMS según la edad.

Característica	EMS		p
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pacientes	69 (85,2)	88 (90,7)	NS
Edad media (años) y DE	40,4 ± 4,3	78,1 ± 5,7	
Sexo			NS
Hombre	40 (58,0)	49 (55,7)	
Mujer	29 (42,0)	39 (44,3)	
Localización			NS
Colon derecho	14 (20,3)	31 (35,2)	
Colon izquierdo	29 (42,0)	20 (22,7)	
Recto	26 (37,7)	37 (42)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

También en ambos grupos, la producción de mucina y la presencia de células en “anillo de sello” fue similar, sólo algo mayor en los jóvenes que a su vez, presentaban mayor proporción de casos con pobre diferenciación tumoral (12,2% frente al 3,7% de los mayores de 69 años) (tabla 36).

Tabla 36. Características anatómo-patológicas de los tumores EMS según la edad

Característica	EMS		<i>p</i>
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pobre diferenciación	6/49 (12,2)	3/82 (3,7)	NS
Productor de moco	13/49 (26,5)	17/82 (20,7)	NS
Células en anillo de sello	2/49 (4,1)	2/82 (2,4)	NS

Los datos son dados en número (porcentaje).

Los pacientes jóvenes con tumores EMS, comparados con los de los mayores, presentaron mayor frecuencia de estadio A (31,9% Vs 4,5%), menor proporción de neoplasia primaria múltiple (10,1% Vs 33%) y de lesiones sincrónicas/metacrónicas (4,3% Vs 20,5%) (tabla 37), similar a lo que ocurría en los tumores IMS con significación estadística.

Tabla 37. Estadio y lesiones asociadas a los tumores EMS según la edad.

Característica	EMS		P
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Estadio			
A	22 (31,9)	4 (4,5)	
B	17 (24,6)	39 (45,9)	
C	12 (17,4)	23 (27,1)	
D	18 (26,1)	19 (22,4)	
CCR sincrónico o metacrónico	3 (4,3)	18 (20,5)	0,004
Neoplasia primaria múltiple	7 (10,1)	29 (33,0)	0,001

Los datos son dados en número (porcentaje).

En el grupo de jóvenes con tumores EMS hubo mayor agregación familiar (53,6% Vs 18,2% en mayores). Vale la pena anotar que un 46,4% de los tumores de los jóvenes con EMS corresponden a casos esporádicos (tabla 38).

Tabla 38. Características familiares de los tumores EMS según la edad.

Característica	EMS		P
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Historia familiar de cáncer			0,0005
Familias con criterios de Ámsterdam II	6 (8,7)	1 (1,1)	
Presencia de agregación familiar con neoplasia relacionada con SL	18 (26,1)	10 (11,4)	
Presencia de agregación familiar con neoplasia no relacionada con SL	13 (18,8)	5 (5,7)	
Casos esporádicos	32 (46,4)	72 (81,8)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

3.2. Fenotipo Metilador (Islas CpG).

De los pacientes del estudio, 68 de los 88 menores de 45 años y 90 de los 97 mayores de 69 años fueron incluidos para caracterización y análisis de la vía de carcinogénesis de hipermetilación de las islas CpG (CIMP), como se define en el apartado de material y métodos.

Dado que el grado de metilación de las islas CpG implica un comportamiento distinto del tumor, en cuanto a características anatómo-patológicas y clínicas, se analizaron las tres categorías: CIMP alto, CIMP bajo y CIMP negativo, para ambos grupos de edad.

3.2.1. Características del fenotipo metilador en menores de 45 años.

En la población menor de 45 años, las categorías más frecuentes fueron tumores con CIMP bajo (41,2%) y CIMP negativo (39,7%), siendo el grupo CIMP alto el de menor proporción (19,1%). En el grupo CIMP alto se presentaron los resultados más significativos desde el punto de vista estadístico y características que lo diferencian de los otros dos: predilección por el sexo femenino (53,8% frente a 35,7% y 33% en CIMP bajo y CIMP 0 respectivamente), edad de aparición del CCR más precoz (36,9 años frente a 39,4 años de los CIMP bajo y 40,15 años de los CIMP negativo), localización predominante en el colon derecho (61,5% frente al 21,4 % y 7,4% de los grupos CIMP bajo y CIMP negativo, respectivamente) ($p=0,007$), así como mayor proporción de pobre diferenciación tumoral (22,2% Vs 13,6% y 0) y producción de mucina por el tumor (44,4% Vs 36,4% y 20,8%) (tabla 39).

Tabla 39. Características de los tumores según el grado de CIMP en los pacientes jóvenes.

Los datos son dados en número (porcentaje).

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	<i>p</i>
Pacientes	13 (19,1)	28 (41,2)	27 (39,7)	
Edad media (años) ± DE	36,9 ± 6,4	39,4 ± 5	40,15 ± 4,5	0,18
Sexo				
Hombre	6 (46,2)	18 (64,3)	18 (66,7)	0,43
Mujer	7 (53,8)	10 (35,7)	9 (33,3)	
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)	
Pobre diferenciación	2/9 (22,2)	3/22 (13,6)	0	0,27
Productor de mucina	4/9 (44,4)	8/22 (36,4)	5/24 (20,8)	0,3
Células en anillo de sello	0/9 (0)	3/22 (13,6)	0/24 (0)	0,12

DE: Desviación estándar.

RESULTADOS

Además, el grupo de tumores CIMP alto en jóvenes presentó mayor proporción de mutaciones en los genes MMR (30,8% Vs 7,1% y 7,4% respectivamente), de IMS ((30,8% Vs 14,3% y 7,4%) y de ausencia de expresión del gen *MLH1* por hipermetilación (15,4% Vs 3,6% y 0) como era de esperar (tabla 40).

Tabla 40. Características moleculares de los tumores CIMP en jóvenes.

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	<i>p</i>
MSI	4 (30,8)	4 (14,3)	2 (7,4)	0,15
Expresión de Mlh1 (ausente)	2 (15,4)	1 (3,6)	0	0,09
Mutación en MMR	4 (30,8)	2 (7,1)	2 (7,4)	0,06

Los datos son dados en número (porcentaje).

RESULTADOS

Por otro lado, el grupo CIMP alto en pacientes jóvenes también presentó mayor asociación de pólipos durante el seguimiento (77% Vs 50% y 52%), con predominio de pólipos hiperplásicos. En CIMP bajo o 0 predominaron los pólipos adenomatosos (57,1% en cada uno) (tabla 41).

Tabla 41. Pólipos asociados a los tumores de pacientes jóvenes según CIMP.

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	<i>p</i>
Pólipos asociados	10 (76,9)	14 (50,0)	14 (52)	0,23
Adenomatoso	3 (30,0)	8 (57,1)	8 (57,1)	NS
Hiperplásico	1 (10,0)	2 (14,3)	4 (28,6)	NS
Mixto	6 (60,0)	4 (28,6)	2 (14,3)	0,21

Los datos son dados en número (porcentaje).

En cuanto a la presencia de lesiones asociadas, hubo mayor aparición de tumores sincrónicos y/o metacrónicos (23,1% Vs 3,6% y 14,8%) y neoplasia primaria múltiple (30,8% Vs 10,7% y 18,5%) en el grupo de alta metilación comparado con los otros dos (tabla 42).

Tabla 42. Neoplasias asociadas a los tumores de pacientes jóvenes según CIMP.

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	<i>p</i>
Neoplasia primaria múltiple	4 (30,8)	3 (10,7)	5 (18,5)	0,26
CCR sincrónico o metacrónico	3 (23,1)	1 (3,6)	4 (14,8)	0,15

Los datos son dados en número (porcentaje).

En las tres categorías CIMP del grupo de CCR de aparición temprana, se encontró un predominio de los estadios tempranos al diagnóstico (A y B de Dukes), principalmente en el grupo CIMP-alto (A 30,8%, B 46,2%, C 15,4% y D 7,7%) (tabla 43).

Tabla 43. Estadio según CIMP en pacientes jóvenes.

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	<i>p</i>
Estadio Dukes				
A	4 (30,8)	7 (25,0)	7 (25,9)	
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)	NS

Los datos son dados en número (porcentaje).

En este grupo de jóvenes, la agregación familiar estuvo presente en los tres grupos. Los casos esporádicos constituyeron una minoría (CIMP alto 38,5%, CIMP bajo 42,9% y CIMP 0 37%). Los CCR asociados a criterios de Ámsterdam y a neoplasias relacionadas con SL fueron más frecuentes en CIMP alto comparado con los otros dos grupos (53,8% Vs 35,5% y 40,4%) (Tabla 44).

Tabla 44. Agregación familiar en el grupo de aparición temprana según el grado de CIMP.

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	<i>p</i>
Historia familiar de cáncer:				NS
Criterios Ámsterdam II	4 (30,8)	5 (17,9)	5 (14,8)	
Agregación familiar para neoplasia SL	3 (23,1)	5 (17,9)	8 (29,6)	
Agregación familiar para neoplasia no SL	1 (7,7)	6 (21,4)	4 (14,8)	
Casos esporádicos	5 (38,5)	12 (42,9)	10 (37)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

3.2.2. Características del fenotipo metilador en mayores de 69 años.

Al igual que en el grupo de menores de 45 años, la categoría más definida y característica de este grupo de mayores correspondió a los casos CIMP alto. Esta categoría también fue la menos frecuente (24,4%) correspondiendo la mayoría de los casos a los grupos CIMP bajo (26,7%) y sobretodo a CIMP 0 (48,9%) (tabla 45). Al igual que en los jóvenes, hubo predominio del sexo femenino en los casos de CIMP alto (63,6%) y predominio leve del masculino en CIMP bajo o 0 (62,5% y 52,3% respectivamente).

Tabla 45. Características de los pacientes en el grupo de CCR de aparición tardía según el grado de CIMP.

Los datos son dados en número (porcentaje).

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	p
Pacientes	22 (24,4)	24 (26,7)	44 (48,9)	
Edad media (años) ± DE	77,8 ± 5	78,2 ± 5,3	77,6 ± 6,4	NS
Sexo				
Hombre	8 (36,4)	15 (62,5)	23 (52,3)	
Mujer	14 (63,6)	9 (37,5)	21 (47,7)	0,2

DE: desviación estándar.

En este grupo de CCR de aparición tardía, CIMP alto se asoció en mayor proporción a pobre diferenciación tumoral (10% Vs 0 y 4,7% de CIMP bajo y 0 respectivamente), a asociación con inestabilidad de microsatélites (31,8% Vs 4,2% y 2,3%) y a presencia de pólipos asociados (72,7% Vs 58,3% y 65,9%) dentro de los cuales predominaban los pólipos adenomatosos. Hubo un alto porcentaje de mutaciones en el gen *BRAF* en CIMP alto (27,3% frente a 4,2% en CIMP bajo y 0 en CIMP 0)

RESULTADOS

(tabla 46). Otras características como la producción de moco o las células en anillo de sello no presentaron diferencias resaltables entre categorías. Los casos de IMS asociados con *BRAF* y con ausencia de expresión de *MLH1* por hipermetilación pertenecían a la categoría CIMP alto.

Tabla 46. Características de los tumores en el grupo de aparición tardía según el grado de CIMP.

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	P
Pobre diferenciación	2 (10,0)	0	2 (4,7)	0,28
Producción de moco	1/20 (5)	5/21 (23,8%)	8/43 (18,6)	0,24
Células en anillo de sello	0/20 (0)	1/21 (4,8)	1/43 (2,3)	NS
IMS	7 (31,8)	1 (4,2)	1 (2,3)	<0,001
Ausencia de expresión de Mlh1	6/10 (60)	0	1 (3,7)	<0,001
Mutación en <i>BRAF</i>	6 (27,3)	1 (4,2)	0	<0,001
Pólipos asociados	16 (72,7)	14 (58,3)	29 (65,9)	NS
Adenomatoso	9 (56,3)	9 (64,3)	18 (62,1)	
Hiperplásico	2 (12,5)	1 (7,1)	3 (10,3)	
Mixto	5 (31,3)	4 (28,6)	8 (27,6)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

RESULTADOS

En el resto de características, los tres grupos fueron similares, con lesiones sincrónicas y/o metacrónicas en alrededor de un 30% en cada categoría y neoplasia primaria múltiple con proporciones cercanas al 20% en cada categoría (tabla 47).

Tabla 47. Neoplasias asociadas al CCR en el grupo de aparición tardía según el grado de CIMP.

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	P
Neoplasia primaria múltiple	7 (31,8)	9 (37,5)	15 (34,1)	NS
CCR sincrónico o metacrónico	4 (18,2)	6 (25)	10 (22,7)	NS

Los datos son dados en número (porcentaje).

En este grupo de pacientes mayores, hubo predominio de estadios tempranos y avanzados al diagnóstico (B y D de Dukes específicamente) en las tres categorías CIMP (alto, bajo y 0): estadio B 54,5%, 29,2% y 59,1% respectivamente y estadio D 27,3%, 37,5% y 9,2% respectivamente (tabla 48).

Tabla 48. Estadio según CIMP en pacientes mayores.

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	<i>p</i>
Estadio Dukes				
A	1 (4,5)	2 (8,3)	1 (2,3)	
B	12 (54,5)	7 (29,2)	26 (59,1)	
C	3 (13,6)	6 (25)	13 (29,4)	
D	6 (27,3)	9 (37,5)	4 (9,2)	0,42

Los datos son dados en número (porcentaje).

También en este grupo de CCR de aparición tardía, se detectó menor agregación familiar que en los jóvenes, sin diferencias con respecto a la categoría CIMP. Por el contrario, hubo mayor proporción de casos esporádicos en este grupo de edad en los tres grados de metilación, 81,8% en CIMP-alto, 75% en CIMP-bajo y 79,5% en CIMP negativo (tabla 49).

Tabla 49. Agregación familiar en el grupo de aparición temprana según el grado de CIMP.

Característica	CIMP alto	CIMP bajo	CIMP 0	<i>p</i>
Historia familiar de cáncer:				NS
Criterios Ámsterdam II	0	1 (4,2)	0	
Agregación familiar para neoplasia SL	2 (9,1)	3 (12,5)	6 (13,6)	
Agregación familiar para neoplasia no SL	2 (9,1)	2 (8,3)	2 (4,5)	
Casos esporádicos	18 (81,8)	18 (75)	36 (81,8)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

3.2.3. Comparación fenotipo metilador entre menores de 45 años y mayores de 69 años.

Como se ha descrito previamente, ambos grupos de edad presentaban características similares en cada uno de los grados de metilación, siendo la categoría más diferenciada la de alta metilación, con similitudes entre ambos grupos de edad. El sexo femenino predominó en la categoría de CIMP alto (53,8% jóvenes y 63,6% en mayores) mientras que en CIMP bajo o 0 presentaron predominio de afectación en hombres (tabla 50).

Tabla 50. Comparación de los pacientes según el momento de aparición del CCR y el grado CIMP.

Característica	CIMP alto			CIMP bajo			CIMP 0		
	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Pacientes	13 (19,1)	22 (24,4)	NS	28 (41,2)	24 (26,7)	NS	27 (39,7)	44 (48,9)	NS
Edad media (años) ± DE	36,9 ± 6,4	77,8 ± 5	NS	39,4 ± 5	78,2 ± 5,3	NS	40,15 ± 4,5	77,6 ± 6,4	NS
Sexo			NS			NS			
Hombre	6 (46,2)	8 (36,4)		18 (64,3)	15 (62,5)		18 (66,7)	23 (52,3)	
Mujer	7 (53,8)	14 (63,6)		10 (35,7)	9 (37,5)		9 (33,3)	21 (47,7)	0,32

Los datos son dados en número (porcentaje).
DE: Desviación estándar.

RESULTADOS

En CIMP alto predominó el compromiso del colon derecho en jóvenes (61,5%) y del recto en mayores (54,5%) (tabla 51). En los pacientes jóvenes con CIMP bajo y CIMP 0, la localización más frecuente fue el colon izquierdo (50% y 51,9% respectivamente) mientras que en los pacientes mayores predominaron los tumores proximales (CIMP bajo 50% y CIMP 0 38%). En tumores CIMP bajo de pacientes jóvenes fue mínimo el compromiso de colon derecho (7,4%).

Tabla 51. Localización del tumor de acuerdo a CIMP y a edad.

Característica	CIMP alto			CIMP bajo			CIMP 0		
	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Localización									
Colon derecho	8 (61,5)	7 (31,8)		6 (21,4)	12 (50,0)		2 (7,4)	17 (38,6)	
Colon izquierdo	3 (23,1)	3 (13,6)		14 (50,0)	4 (16,7)		14 (51,9)	14 (31,8)	
Recto	2 (15,4)	12 (54,5)	0,07	8 (28,6)	8 (33,3)	0,026	11 (40,7)	13 (29,5)	0,11

Los datos son dados en número (porcentaje).

Los tumores CIMP alto de los pacientes jóvenes, se asociaron a mutaciones de MMR en un 30,8% de los casos, con la consiguiente IMS y con la presencia de características propias de SL. Dichos tumores presentaron con mayor frecuencia producción de moco (44,4% en jóvenes frente a 5% en mayores) y pobre diferenciación (22,2% frente a 10%), diferente a las características de CIMP alto en pacientes mayores (tabla 52).

Tabla 52. Características anatómo-patológicas de los tumores según CIMP y de acuerdo a edad de aparición.

Característica	CIMP alto			CIMP bajo			CIMP 0		
	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Pobre diferenciación§	2/9 (22,2)	2 (10,0)	NS	3/22 (13,6)	0	0,18	0	2 (4,7)	NS
Productor de mucina§	4/9 (44,4)	1/20 (5,0)	0,02	8/22 (36,4)	5/21 (23,8)	NS	5/24 (20,8)	8/43 (18,6)	NS
Células anillo de sello§	0/9	0/20	NS	3/22 (13,6)	1/21 (4,8)	NS	0/24	1/43 (2,3)	NS
MSI	4 (30,8)	7 (31,8)		4 (14,3)	1 (4,2)	0,3	2 (7,4)	1 (2,3)	NS
Expresión de MLH1 (ausente)	2 (15,4)	6/10 (60,0)	0,08	1 (3,6)	0		0	1/27 (3,7)	NS
Mutación en BRAF	0	6 (27,3)	0,07	1 (3,6)	1 (4,2)	NS	0	0	NS
Mutación en MMR	4 (30,8)	0	0,014	2 (7,1)	1 (4,2)	NS	2 (7,4)	0	NS

§ Los porcentajes presentados se basan en el número total cambiante en el caso de CCR de aparición temprana debido a que no todos pudieron ser analizados para BRAF. Los datos son dados en número (porcentaje).

Los pacientes jóvenes con CIMP alto presentaron mayor proporción de tumores en estadio A que los mayores (30,8% Vs 4,5%). Dicha diferencia de proporción se mantuvo en todas las categorías CIMP. Los tumores en estadios B y C fueron similares independientemente de la edad y de la categoría CIMP. Los pacientes jóvenes con tumores CIMP alto tuvieron una menor proporción de estadios D que los mayores con el mismo grado de metilación (7,7% Vs 27,3%) mientras que en los tumores CIMP 0 se invirtió dicha proporción (22,2% en jóvenes frente a 9,2% en mayores) siendo los resultados para la categoría CIMP 0 estadísticamente significativos (tabla 53).

Tabla 53. Estadio tumoral según CIMP y de acuerdo a edad de aparición.

Característica	CIMP alto			CIMP bajo			CIMP 0		
	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Estadio Dukes									
A	4 (30,8)	1 (4,5)		7 (25,0)	2 (8,3)		7 (25,9)	1 (2,3)	
B	6 (46,2)	12 (54,5)		9 (32,1)	7 (29,2)		10 (37)	26 (59,1)	
C	2 (15,4)	3 (13,6)		7 (25,0)	6 (25)		4 (14,8)	13 (29,4)	
D	1 (7,7)	6 (27,3)	NS	5 (17,9)	9 (37,5)	0,3	6 (22,2)	4 (9,2)	0,003

Los datos son dados en número (porcentaje).

Con respecto a los pólipos asociados, no hubo diferencias significativas entre categorías de fenotipo metilador cuando se compararon los dos grupos de edad. Sin embargo los pacientes mayores con CIMP bajo tuvieron mayor tendencia a presentar neoplasias primarias que los jóvenes (37,5% Vs 10,7% respectivamente) y CCR sincrónico o metacrónico (25% Vs 3,6%) (tabla 54).

Tabla 54. Lesiones asociadas a CCR según CIMP y de acuerdo a edad de aparición.

Característica	CIMP alto			CIMP bajo			CIMP 0		
	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>
Pólipos asociados	10 (76,9)	16 (72,7)	NS	14 (50,0)	14 (58,3)	NS	14 (52)	29 (65,9)	0,32
Adenomatoso	3 (30,0)	9 (56,3)		8 (57,1)	9 (64,3)		8 (57,1)	18 (62,1)	0,3
Hiperplásico	1 (10,0)	2 (12,5)	0,43	2 (14,3)	1 (7,1)		4 (28,6)	3 (10,3)	
Mixto	6 (60,0)	5 (31,3)		4 (28,6)	4 (28,6)		2 (14,3)	8 (27,6)	
Neoplasia primaria múltiple	4 (30,8)	7 (31,8)	NS	3 (10,7)	9 (37,5)	0,02	5 (18,5)	15 (34,1)	0,18
CCR sincrónico o metacrónico	3 (23,1)	4 (18,2)	NS	1 (3,6)	6 (25,0)	0,034	4 (14,8)	10 (22,7)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

RESULTADOS

Los pacientes jóvenes con CCR CIMP alto tuvieron mayor componente familiar que los pacientes mayores con el mismo fenotipo (61,6% Vs 18,2%). Estos pacientes mayores con tumores CIMP alto correspondían en su mayoría a los casos esporádicos de IMS. También es destacable que los pacientes jóvenes con tumores CIMP 0 presentaron una importante agregación familiar (63%) (tabla 55).

Tabla 55. Comparación de la agregación familiar de cada grupo CIMP según edad de aparición.

Característica	CIMP alto			CIMP bajo			CIMP 0		
	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía	<i>p</i>	Aparición temprana	Aparición tardía*	<i>p</i>
Historia familiar de cáncer			0,08			0,1			<0,001
Criterios Ámsterdam II	4 (30,8)	0		5 (17,9)	1 (4,2)		5 (14,8)	0	
Agregación familiar para neoplasia SL	3 (23,1)	2 (9,1)		5 (17,9)	3 (12,5)		8 (29,6)	6 (13,6)	
Agregación familiar para neoplasia no SL	1 (7,7)	2 (9,1)		6 (21,4)	2 (8,3)		4 (14,8)	2 (4,5)	
Casos esporádicos	5 (38,5)	18 (81,8)		12 (42,9)	18 (75)		10 (37)	36 (81,8)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

3.3. Clasificación molecular del CCR.

De acuerdo a los mecanismos y vías de carcinogénesis descritas (IMS y vía de la hipermetilación de islas CpG) se clasificaron los casos de CCR en cuatro tipos (IMS-CIMP alto, IMS-CIMP bajo o negativo, EMS-CIMP alto y EMS-CIMP bajo o negativo) siguiendo la descripción de Ogino y Goel ⁴¹. A continuación se exponen y comparan los hallazgos en cada uno de los grupos de edad establecidos en este estudio.

- IMS-CIMP alto.

Las muestras poblacionales en ambos grupos de edad fueron pequeñas (4 pacientes jóvenes y 7 mayores de 69 años). Se observaron varias características significativas.

En el grupo de pacientes menores de 45 años, el grupo IMS-CIMP alto presentó una caracterización mejor diferenciada que las otras categorías en varios aspectos. Por un lado, el CCR se presentó en edades más tempranas (media de 29 años frente a 37, 40 y 40 años de las categorías IMS/CIMP bajo o 0, EMS/CIMP alto y EMS/CIMP bajo o 0 respectivamente) ($p < 0,01$) (tabla 56).

Tabla 56. Características clínicas de acuerdo a las diferentes categorías moleculares en CCR de aparición temprana y según el estado IMS y CIMP.

Característica	IMS / CIMP alto	IMS / CIMP bajo-0	EMS / CIMP alto	EMS / CIMP bajo-0	<i>p</i>
Pacientes	4 (5,9)	6 (8,8)	9 (13,2)	49 (72,1)	
Edad media (años) y DE	29,25 ± 3,3	37,17 ± 3,3	40,3 ± 1,3	40,1 ± 54,8	<0,001

Los datos son dados en número (porcentaje).
DE: desviación estándar.

También en el grupo de pacientes jóvenes de la misma categoría molecular, la localización preferente fue el colon derecho (75% frente a 25% en el colon izquierdo y sin compromiso del recto), mientras que la categoría EMS/CIMP bajo o 0 presenta un predominio de tumores en colon izquierdo y recto mostrando significación estadística. En el grupo IMS, independientemente del CIMP, se diagnosticaron en estadios tempranos en contraste con las categorías EMS cuya distribución es más homogénea (Tabla 57).

Tabla 57. Localización y estadio de acuerdo a las diferentes categorías moleculares en CCR de aparición temprana y según el estado IMS y CIMP.

Característica	IMS / CIMP alto	IMS / CIMP bajo-0	EMS / CIMP alto	EMS / CIMP bajo- 0	p
Localización					
Colon derecho	3 (75,0)	2 (33,3)	5 (55,6)	6 (12,2)	0,004
Colon izquierdo	1 (25,0)	4 (66,7)	2 (22,2)	24 (49,0)	
Recto	0	0	2 (22,2)	19 (38,8)	
Estadio Dukes					
A	1 (25,0)	0	3 (33,3)	14 (28,6)	0,011
B	3 (75,0)	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)	

Los datos son dados en número (porcentaje) .

Los CCR de aparición temprana IMS/CIMP alto correspondieron todos a SL. Sin embargo, sólo se encontraron algunas de las características específicas de dicho síndrome como fue producción de moco en 33% de los casos.

En los pacientes menores de 45 años con CCR IMS/CIMP alto hubo una importante asociación de pólipos en el seguimiento (100%) predominando los pólipos adenomatosos y mixtos (50% cada uno), alta proporción de lesiones sincrónicas y/o metacrónicas (50%) y de neoplasia primaria múltiple (50%). Dado que los casos

correspondían a SL, 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 58).

Tabla 58. Lesiones asociadas y agregación familiar de acuerdo a las diferentes categorías moleculares en CCR de aparición temprana y según el estado IMS y CIMP.

Característica	IMS / CIMP alto	IMS / CIMP bajo-0	EMS / CIMP alto	EMS / CIMP bajo-0	p
Pólipos asociados	4 (100)	4 (66,7)	6 (66,7)	24 (49,0)	0,21
Adenomatoso	2 (50)	0	1 (16,7)	16 (66,7)	0,018
Hiperplásico	0	2 (50,0)	1 (16,7)	4(16,7)	
Mixtos	2 (50,0)	2 (50,0)	4 (66,7)	4 (16,7)	
CCR sincrónico o metacrónico	2 (50,0)	0	1 (11,1)	5 (10,2)	0,12
Neoplasia primaria múltiple	2 (50,0)	0	2 (22,2)	8 (16,3)	0,2
Historia familiar de cáncer:					<0,001
Criterios <u>Ámsterdam II</u>	4	5 (83,3)	0	5 (10,2)	
Agregación familiar para neoplasia SL	0	1 (16,7)	3 (33,3)	12 (24,5)	
Agregación familiar para neoplasia no SL	0	0	1 (11,1)	10 (20,4)	
Casos esporádicos	0	0	5 (55,6)	22 (44,9)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

Al igual que en el grupo de jóvenes, los mayores de 69 años con IMS y CIMP-alto constituyen la categoría más pequeña pero la más característica. No hubo diferencias significativas en la edad de presentación entre las cuatro categorías moleculares (75, 78, 79 y 81 años en IMS/CIMP alto, IMS/CIMP bajo o 0, EMS/CIMP alto y EMS/CIMP bajo o 0 respectivamente) pero sí predilección por el sexo femenino (85,7%) en este grupo (tabla 59).

Tabla 59. Características clínicas de acuerdo a las diferentes categorías moleculares en CCR de aparición tardía y según el estado IMS y CIMP.

Característica	IMS / CIMP alto	IMS / CIMP bajo-0	EMS / CIMP alto	EMS / CIMP bajo-0	p
Pacientes	7 (7,8)	2 (4,5)	15 (16,7)	66 (73,3)	
Edad media (años) y DE	75,1 ± 4,5	78 ± 11,3	79,1 ± 4,9	77,8 ± 6	NS
Sexo					
Hombre	1 (14,3)	0 (0)	7 (46,7)	38 (57,6)	
Mujer	6 (85,7)	2 (100)	8 (53,3)	28 (42,4)	0,06

Los datos son dados en número (porcentaje).
DE: desviación estándar.

También como en los jóvenes, la localización más frecuente fue el colon derecho (71,4%) y no hubo compromiso del recto ($p=0,001$). La mayoría de los casos se diagnosticaron en estadios tempranos (A 14,3% y B 71,4%) en comparación con los casos de EMS (tabla 60).

Tabla 60. Localización y estadio de acuerdo a las diferentes categorías moleculares en CCR de aparición tardía y según el estado IMS y CIMP.

Característica	IMS / CIMP alto	IMS / CIMP bajo-0	EMS / CIMP alto	EMS / CIMP bajo-0	<i>p</i>
Localización					
Colon derecho	5 (71,4)	2 (100)	2 (13,3)	27 (41)	0,001
Colon izquierdo	2 (28,6)	0	1 (6,7)	18 (27,3)	
Recto	0	0	12 (80)	21 (31,7)	
Estadio Dukes					
A	1 (14,3)	0	0	3 (4,8)	0,27
B	5 (71,4)	2 (100)	7 (46,7)	29 (46)	
C	1 (14,3)	0	2 (13,3)	19 (30,2)	
D	0	0	6 (40)	12 (19)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

Los tumores en este grupo molecular de pacientes mayores presentaron pobre diferenciación y producción de moco en un 14,3% cada uno y no se encontraron células en anillo de sello. Una alta proporción presentó mutaciones en *BRAF* (57,1%) y ausencia de expresión del gen *MLHI* (100%), sin estar relacionado con SL (dato estadísticamente significativo) (tabla 61).

Tabla 61. Características patológicas de acuerdo a las diferentes categorías moleculares en CCR de aparición tardía y según el estado IMS y CIMP.

Característica	IMS / CIMP alto	IMS / CIMP bajo-0	EMS / CIMP alto	EMS / CIMP bajo-0	p
Pobre diferenciación§	1 (14,3)	0	1 (7,7)	2 (3,2)	0,32
Productor de moco§	1/7 (14,3)	0/2 (0)	0/13 (9)	13/62 (21)	0,28
Células en anillo de sello§	0/9 (0)	0/2 (0)	0/13 (0)	2/62 (2)	NS
Expresión de Mlh1 (ausente)	6 (100)	1 (50)	0	0	<0,001
Mutación en BRAF	4 (57,1)	0	2 (13,3)	1 (1,5)	<0,001
Mutación en MMR	0	1/50	0	0	<0,001

Los datos son dados en número (porcentaje).

§ Los porcentajes presentados se basan en el número total cambiante porque algunos casos fueron excluidos debido a que sólo se pudo obtener una biopsia (estadio D) o porque los tumores correspondían a displasia severa con carcinoma *in situ*, y no era posible estudiar ninguna otra característica.

RESULTADOS

En los mayores con IMS/CIMP alto, al igual que en los jóvenes de esta categoría molecular, hubo asociación a lesiones sincrónicas y/o metacrónicas (57,1% de neoplasia primaria múltiple y 42,9% de CCR sincrónico o metacrónico), así como a pólipos en el seguimiento (100%) de los cuales la mayoría eran adenomatosos y mixtos (42,9% cada uno). Sin embargo, al contrario de los jóvenes, no hubo ningún caso que cumpliera criterios de Ámsterdam II aunque sí cierta agregación familiar para neoplasias relacionadas con SL (28,6%). La mayor proporción de casos correspondió a CCR esporádico (57,1%) (tabla 62).

Tabla 62. Lesiones asociadas y agregación familiar de acuerdo a las diferentes categorías moleculares en CCR de aparición tardía y según el estado IMS y CIMP.

Característica	IMS / CIMP alto	IMS / CIMP bajo-0	EMS / CIMP alto	EMS / CIMP bajo-0	<i>p</i>
Pólipos asociados	7 (100)	0	9 (60)	44 (66,7)	0,042
Adenomatoso	3 (42,9)	0	6 (66,7)	28 (61,9)	NS
Hiperplásico	1 (14,3)	0	1 (11,1)	4 (9,5)	
Mixtos	3 (42,9)	0	2 (22,2)	12 (28,6)	
CCR sincrónico o metacrónico	3 (42,9)	0	1 (6,7)	16 (24,2)	0,2
Neoplasia primaria múltiple	4 (57,1)	0	3 (20)	24 (36,4)	0,3
Historia familiar de cáncer:					NS
Criterios Ámsterdam II	0	0	0	1 (1,5)	
Agregación familiar para neoplasia SL	2 (28,6)	0	0	9 (13,6)	
Agregación familiar para neoplasia no SL	1 (14,3)	0	1 (6,7)	4 (6,1)	
Casos esporádicos	4 (57,1)	2 (100)	14 (93,3)	52 (78,8)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

A la hora de comparar el grupo IMS/CIMP alto entre los dos grupos de edad, a pesar del pequeño tamaño muestral, nos encontramos con que el CCR en jóvenes se

asociaba a SL, cumpliendo en todos los casos los criterios de Ámsterdam II, el CCR en ancianos se asoció a mutaciones en BRAF siendo la mayoría casos esporádicos.

- IMS-CIMP bajo o 0.

Entre los jóvenes destacó, en comparación con el grupo IMS-CIMP alto, la preferencia por el sexo masculino (83,3%) (tabla 63) y el compromiso predominante del colon izquierdo (66,7%) sin que hubiese afectación del recto (tabla 57). Todos los casos se diagnosticaron en estadio B (tabla 58).

Tabla 63. Características clínicas de acuerdo a las diferentes categorías moleculares en CCR de aparición temprana y según el estado IMS y CIMP.

Característica	IMS / CIMP alto	IMS / CIMP bajo-0	EMS / CIMP alto	EMS / CIMP bajo-0	<i>p</i>
Sexo					NS
Hombre	2 (50,0)	5 (83,3)	4 (44,4)	31 (63,3)	
Mujer	2 (50,0)	1 (16,7)	5 (55,6)	18 (36,7)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

Además, entre los jóvenes con IMS/CIMP bajo o 0, se evidenció mayor proporción de casos con producción de mucina (66,7%) en comparación con IMS/CIMP alto (33,3%) y con las otras categorías moleculares y grupos de edad. También en este mismo grupo destacó encontrarse la mayor proporción de presencia de células en “anillo de sello” (16,7%) (tabla 64).

Tabla 64. Características patológicas de acuerdo a las diferentes categorías moleculares en CCR de aparición temprana y según el estado IMS y CIMP.

Característica	IMS / CIMP alto	IMS / CIMP bajo-0	EMS / CIMP alto	EMS / CIMP bajo-0	<i>p</i>
Pobre diferenciación§	0	0	2/6 (33,3)	3/40 (7,5)	0,13
Productor de moco§	1/3 (33,3)	4/6 (66,7)	3/6 (50,0)	9/40 (22,5)	0,08
Células en anillo de sello§	0/3	1/6 (16,7)	0/6	2/40 (5,0)	NS
Expresión de Mlh1 (ausente)	2 (50,0)	1 (16,7)	0	0	0,0015
Mutación en <i>BRAF</i>	0	0	0	1 (2,0)	NS
Mutación en MMR	4 (100)	3 (50,0)	0	0	<0,001

Los datos son dados en número (porcentaje).

§ Los porcentajes presentados se basan en el número total cambiante porque algunos casos fueron excluidos debido a que sólo se pudo obtener una biopsia (estadio D) o porque los tumores correspondían a displasia severa con carcinoma *in situ*, y no era posible estudiar ninguna otra característica.

Ninguno de los tumores en estos pacientes jóvenes con tumores IMS/CIMP bajo o 0 presentó neoplasia primaria múltiple ni lesiones sincrónicas y/o metacrónicas (tabla 57). De igual forma, se encontró un importante componente familiar relacionado con SL (83,3% cumplieron criterios de Ámsterdam II y 16,7%% presentaron neoplasias relacionadas con el SL), sin presencia de casos de CCR esporádicos (tabla 58).

El grupo de mayores de 69 años con IMS/CIMP bajo o 0 estuvo constituido por solo dos pacientes. Se objetivaron diferencias con respecto a los jóvenes pertenecientes a la misma categoría molecular en cuanto a sexo (100% mujeres en mayores y 83% de hombres en jóvenes) (tabla 58) y con respecto al componente familiar debido a que los jóvenes de esta categoría molecular tenían relación con SL mientras que todos los mayores correspondían a casos esporádicos sin agregación familiar (tabla 62). En los mayores IMS/CIMP bajo o 0, el 50% de los pacientes presentó ausencia de expresión del gen *MLH1* por hipermetilación y no hubo mutaciones en el gen *BRAF* (tabla 61). Al igual que en los jóvenes, predominó el estadio B (100% en mayores) (tabla 60).

A la hora de comparar ambos grupos de edad, las diferencias se presentan en relación al sexo (los jóvenes son la mayoría varones mientras que en ancianos, contrariamente son mujeres) y al componente familiar (los jóvenes mostraron una agregación importante para tumores asociados a SL mientras que los ancianos fueron en su mayoría esporádicos).

● EMS-CIMP alto.

Entre los menores de 45 años, hubo similar distribución por género con discreto predominio del sexo femenino (55,6%) y localización preferente en el colon derecho (55,6% frente a 22,2% tanto en colon izquierdo como en recto), mientras que en el grupo de ancianos el predominio fue de tumores localizados en recto (80%) (p=0,021) (tabla 65).

Tabla 65. Características clínicas de los tumores MSS/CIMP alto de acuerdo a la edad de aparición.

Característica	MSS / CIMP alto		p
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pacientes	9 (13,2)	15 (16,7)	
Edad media (años) ± DE	40,3 ± 1,3	79,1 ± 4,9	
Sexo			NS
Hombre	4 (44,4)	7 (46,7)	
Mujer	5 (55,6)	8 (53,3)	
Localización			
Colon derecho	5 (55,6)	2 (13,3)	
Colon izquierdo	2 (22,2)	1 (6,7)	
Recto	2 (22,2)	12 (80,0)	0,021

Los datos son dados en número (porcentaje).
DE: desviación estándar.

Por otro lado, predominó la presencia de pobre diferenciación tumoral (33,3% de los casos), característica que no apareció en los casos con IMS en este mismo grupo de CCR de aparición temprana (tabla 66).

Comparado con el grupo de mayores de la misma categoría molecular, hubo mayor proporción de casos con producción de mucina (50% Vs 0). En ninguno de los dos grupos de edad hubo presencia de células en “anillo de sello”. En la tabla 65 se detallan las características anatómo-patológicas de los dos grupos de edad.

Tabla 66. Características anatómo-patológicas de los tumores MSS/CIMP alto de acuerdo a la edad de aparición.

Característica	MSS / CIMP alto		<i>p</i>
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pobre diferenciación	2/6 (33,3)	1 (7,7)	0,18
Productor de mucina	3/6 (50,0)	0/13	0,02
Células anillo de sello	0/6	0/13	NS
Expresión de MLH1 (ausente)	0	0	NS
Mutación en BRAF	0	2 (13,3)	NS
Mutación en MMR	0	0	NS

Los datos son dados en número (porcentaje).

En los jóvenes EMS/CIMP alto, predominaron los estadios tempranos al diagnóstico (66,6%) mientras que en los mayores predominaron los avanzados (53,3% estadios C y D), dato estadísticamente significativo (tabla 67).

Tabla 67. Estadio de los tumores MSS/CIMP alto de acuerdo a la edad de aparición.

Característica	MSS / CIMP alto		<i>p</i>
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Estadio Dukes			
A	3 (33,3)	0	
B	3 (33,3)	7 (46,7)	
C	2 (22,2)	2 (13,3)	
D	1 (11,1)	6 (40,0)	0,007

Los datos son dados en número (porcentaje).

En los jóvenes hubo un 66,7% de asociación de pólipos en el seguimiento predominando los pólipos mixtos (66,7%), un 20% de neoplasia primaria múltiple y un 11,1% de CCR sincrónico y/o metacrónico (tabla 68). Las características para estas variables dentro del grupo de ancianos son equivalentes excepto para el tipo de pólipos presentados, siendo en estos más frecuentes adenomatosos (66,7%).

Tabla 68. Lesiones asociadas a los tumores MSS/CIMP alto de acuerdo a la edad de aparición.

Característica	MSS / CIMP alto		<i>p</i>
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pólipos asociados	6 (66,7)	9 (60)	0,16
Adenomatoso	1 (16,7)	6 (66,7)	
Hiperplásico	1 (16,7)	1 (11,1)	
Mixto	4 (66,7)	2 (22,2)	
Neoplasia primaria múltiple	2 (22,2)	3 (20)	NS
CCR sincrónico o metacrónico	1 (11,1)	1 (6,7)	NS

Los datos son dados en número (porcentaje).

En ambos grupos, se encontró una menor proporción de casos con agregación familiar que en los casos de IMS y ningún paciente cumplió con criterios de Ámsterdam. Sin embargo en jóvenes con EMS/CIMP alto hubo importante agregación familiar representada por un 33,3% de neoplasias familiares relacionadas con SL y 11,1% con neoplasias familiares no relacionadas con SL. En contraposición, el grupo de pacientes mayores con EMS/CIMP alto correspondieron a casos esporádicos en un 93,3% ($p=0,02$) (tabla 69).

Tabla 69. Agregación familiar en los tumores MSS/CIMP alto de acuerdo a la edad de aparición.

Característica	MSS / CIMP alto		<i>p</i>
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Historia familiar de cáncer			0,02
Criterios Ámsterdam II	0	0	
Agregación familiar para neoplasia SL	3 (33,3)	0	
Agregación familiar para neoplasia no SL	1 (11,1)	1 (6,7)	
Casos esporádicos	5 (55,6)	14 (93,3)	

Los datos son dados en número (porcentaje).

● EMS-CIMP bajo o 0.

En ambos grupos de edad, se observó mayor proporción de casos en hombres (63,3% en CCR de aparición temprana y 57,6% en aparición tardía). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad a la hora de la localización tumoral. En los jóvenes predominó el colon izquierdo y el recto (49% y 38% respectivamente) mientras que en los mayores lo hizo en el colon derecho (40,9% frente a 27,3% de colon izquierdo y 31,8% de recto) (tabla 70).

Tabla 70. Características clínicas de los tumores MSS/CIMP bajo o 0 de acuerdo a la edad de aparición.

Característica	MSS / CIMP bajo o 0		<i>p</i>
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pacientes	49 (72,1)	66 (73,3)	
Edad media (años) ± DE	40,1 ± 4,8	77,8 ± 6	
Sexo			
Hombre	31 (63,3)	38 (57,6)	
Mujer	18 (36,7)	28 (42,4)	
Localización			
Colon derecho	6 (12,2)	27 (40,9)	0,002
Colon izquierdo	24 (49,0)	18 (27,3)	
Recto	19 (38,8)	21 (31,8)	

Los datos son dados en número (porcentaje).
DE: desviación estándar.

RESULTADOS

No hubo diferencias significativas entre jóvenes y mayores en cuanto a pobre diferenciación (7,5% y 3,2% respectivamente), producción de mucina (22,5% y 21% respectivamente) y células en anillo de sello (5% y 3,2% respectivamente). En estos dos grupos hubo expresión completa de la proteína Mlh1 en todos los casos, sin mutaciones en los genes MMR, pero con una proporción similar y muy baja de mutaciones en el gen *BRAF* (2% y 1,5% respectivamente) (tabla 71).

Tabla 71. Características anatomo-patológicas de los tumores MSS/CIMP bajo o 0 de acuerdo a la edad de aparición.

Característica	MSS / CIMP bajo o 0		<i>p</i>
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pobre diferenciación	3/40 (7,5)	2 (3,2)	NS
Productor de mucina	9/40 (22,5)	13/62 (21)	NS
Células anillo de sello	2/40 (5,0)	2/62 (3,2)	NS
Expresión de MLH1 (ausente)	0	0	NS
Mutación en BRAF	1 (2,0)	1 (1,5)	NS
Mutación en MMR	0	0	NS

Los datos son dados en número (porcentaje).

En los tumores EMS/CIMP bajo o 0, en ambos grupos de edad, se encontraron estadios avanzados al diagnóstico (C y D, en jóvenes, sumaban 44,8% y en mayores, 49,2%). Los jóvenes exhibieron una distribución homogénea en todos los estadios mientras que en los ancianos son eminentemente estadios intermedios (B y C) ($p=0,03$) (tabla 72).

Tabla 72. Estadio de los tumores MSS/CIMP bajo o 0 de acuerdo a la edad de aparición.

Característica	MSS / CIMP bajo o 0		<i>p</i>
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Estadio Dukes			
A	14 (28,6)	3 (4,8)	
B	13 (26,5)	29 (46)	
C	11 (22,4)	19 (30,2)	
D	11 (22,4)	12 (19,0)	0,003

Los datos son dados en número (porcentaje).

Los pólipos asociados, en esta categoría molecular, se presentaron en 49% de los jóvenes y 66,7% de los mayores, predominando los pólipos adenomatosos en ambas edades (66,7% y 63,6% respectivamente). Se encontró más neoplasia primaria múltiple en mayores que en jóvenes (36,4% Vs 16,3%) así como CCR sincrónico o metacrónico (24,2% Vs 10,2%) (tabla 73).

Tabla 73. Lesiones asociadas a los tumores MSS/CIMP bajo o 0 de acuerdo a la edad de aparición.

Característica	MSS / CIMP bajo o 0		<i>p</i>
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Pólipos asociados	24 (49)	44 (66,7)	0,09
Adenomatoso	16 (66,7)	28 (63,6)	
Hiperplásico	4 (16,7)	4 (9,1)	
Mixto	4 (16,7)	12 (27,3)	
Neoplasia primaria múltiple	8 (16,3)	24 (36,4)	0,004
CCR sincrónico o metacrónico	5 (10,2)	16 (24,2)	0,08

Los datos son dados en número (porcentaje) .

El componente de agregación familiar fue mayor en el grupo de jóvenes EMS/CIMP bajo o 0 presentando 10% de pacientes que cumplían criterios de Ámsterdam, 24,5% que presentaban antecedentes familiares de neoplasias relacionadas con SL y 20,4% con neoplasias no relacionadas con SL. En los jóvenes, el 44,9% de los casos fueron esporádicos mientras que en los mayores dichos casos constituyeron el 78,8% (tabla 74).

Tabla 74. Agregación familiar en los tumores MSS/CIMP bajo o 0 de acuerdo a la edad de aparición.

Característica	MSS / CIMP alto		<i>p</i>
	Aparición temprana	Aparición tardía	
Historia familiar de cáncer			<0,001
Criterios Ámsterdam II	5 (10,2)	1 (1,5)	
Agregación familiar para neoplasia SL	12 (24,5)	9 (13,6)	
Agregación familiar para neoplasia no SL	10 (20,4)	4 (6,1)	
Casos esporádicos	22 (44,9)	52 (78,8)	

Los datos son dados en número (porcentaje) .

VI. DISCUSIÓN.

La presentación del CCR es heterogénea. Múltiples factores generan esta variabilidad dentro de los que se encuentran la edad y las vías de carcinogénesis. Así mismo, el análisis de la asociación entre dichos factores parece explicar determinados fenotipos.

1. LA EDAD, UN FACTOR DETERMINANTE EN EL CÁNCER COLORRECTAL.

La relevancia del CCR es indiscutible. Su alta prevalencia y las diferentes opciones terapéuticas hacen de esta enfermedad un objeto de incesante estudio. El análisis de las vías de carcinogénesis hace parte de esta labor y tiene implicaciones a nivel diagnóstico, pronóstico y terapéutico.

El CCR tiene una etiología multifactorial y su forma de presentación es variable. La edad constituye una de estas variables. El CCR en el adulto joven es una entidad específica y cada vez más definida^{108,117}, y su incidencia parece estar aumentando^{13,16}. La comparación de este grupo con el del adulto mayor, exponente habitual del CCR, puede permitir una mejor caracterización y una mayor comprensión de las vías de carcinogénesis.

Diferentes estudios corroboran las diferencias del CCR entre el adulto joven y el paciente mayor^{111,126}. El CCR de aparición temprana se asocia a bajo grado de diferenciación, producción de moco, mayor frecuencia de células en anillo de sello, mayor porcentaje de tumores sincrónicos o metacrónicos así como de pólipos durante el seguimiento. La localización es variable pues algunos trabajos muestran mayor

frecuencia de afectación del colon derecho mientras que otros, del izquierdo y del recto^{134,135}. El CCR en el adulto mayor se distribuye de manera más homogénea aunque es algo más frecuente en el colon sigmoide y en el recto.

El CCR de aparición precoz, por su parte, es un grupo heterogéneo dentro del cual se incluyen las diferentes formas de presentación: hereditarias, familiares y esporádicas. Así mismo, se han identificado sub-grupos con características específicas a nivel clínico-patológico, familiar y molecular¹³⁶.

En el paciente joven, las formas hereditarias son más frecuentes como se comprueba a través de la agregación familiar en el síndrome de Lynch^{3,127}.

A nivel molecular, el CCR de aparición precoz se puede dividir en tumores con IMS que se relacionan con SL y tumores con EMS. En estos últimos, la presentación es más tardía, con menor compromiso del colon derecho, menor porcentaje de CCR sincrónico y metacrónico y con diagnóstico en estadios extremos.

Además, existe un grupo de CCR con EMS que no presenta IC y cuya aparición también es más precoz. Se asocia a peor pronóstico, fenotipo invasivo, metástasis tempranas y mayor agregación familiar. Podrían estar en relación con nuevos síndromes de CCR hereditario (familiar tipo X) o con alteraciones moleculares en *KRAS*, *BRAF* o fenotipo metilador^{127,137,138}.

2. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER COLORRECTAL SEGÚN LA EDAD DE APARICIÓN.

2.1. Características clínicas y anatomo-patológicas.

Este estudio se llevó a cabo comparando dos grupos con edades claramente diferentes. La edad media en el paciente joven fue de 39 años y en el mayor de 77. Predominó el sexo masculino (60%) en el CCR del paciente joven, similar a lo

reportado por otros estudios ¹²⁶, mientras que en el paciente mayor no hubo diferencias entre géneros ¹³⁹.

La localización fue mayor en el colon izquierdo en los pacientes jóvenes mientras que en los mayores predominó la afectación del colon derecho y del recto. Si bien la localización del CCR en la población general está bastante bien definida ¹³⁹, cuando se realiza una división por edades, existen datos contradictorios. Losi y cols. describen que casi el 50% de los pacientes jóvenes presentan CCR en el colon izquierdo, y Giráldez y cols., en el colon izquierdo y en el recto en un 81% ¹⁴⁰. Datos similares fueron publicados por Chang y cols. ¹¹⁸. Por el contrario, otros autores como Savas y cols. ¹⁴¹ reportan la alta frecuencia de CCR en el colon derecho en los jóvenes, probable reflejo de la asociación con el componente familiar o genético ^{107,142}. Sin embargo, la mayoría de las series son pequeñas lo que constituye una clara limitación al analizar este aspecto. Sólo una minoría de los pacientes jóvenes de este estudio correspondían a SL y esto puede explicar que la localización no haya sido predominantemente proximal así como la posibilidad de otros factores que puedan influir en la localización del CCR de aparición temprana.

La proporción de tumores mucinosos y en anillo de sello fue mayor en el grupo de jóvenes (31,7% Vs 19% y 6,7% Vs 2,2% respectivamente). También fueron más frecuentes los tumores pobremente diferenciados en este grupo (13,3% Vs 4,4%). Dichos hallazgos coinciden con las características del SL ^{43,66,143} y con los tumores de los jóvenes con IMS.

Los resultados de este estudio confirman que la IMS en el CCR de aparición temprana se relaciona con SL y rara vez es debida a la inactivación somática de *MLH1* ¹⁴³. Se corrobora también que la edad y los hallazgos clínico-patológicos son útiles para detectar el SL ¹³⁶.

Se empleó la clasificación de Dukes modificada para describir el estadio debido a su sencillez, vigencia y relevancia, como se explica en la introducción. Su correlación con el TNM es clara y permite una adecuada caracterización de la población estudiada. Las series publicadas reflejan variabilidad en el estadio en los pacientes jóvenes con

CCR ^{43,118,126,144,145} con porcentajes de Dukes II y III entre el 18,3% y el 75%. Otros autores asocian esta edad con estadios avanzados ^{117,118,127} lo que podría explicarse por la falta de sospecha diagnóstica o la evolución desfavorable en este tipo de pacientes. En este trabajo, en el grupo de jóvenes no hubo diferencias significativas pero llamativamente, cerca del 60% de los casos correspondieron a estadios A y B. Probablemente la existencia de un programa de cribado intensivo y de una consulta de alto riesgo para cáncer colorrectal en el área a la que pertenecían los pacientes haya influido en la detección precoz de CCR en los jóvenes. En los mayores cabe resaltar la pequeña proporción de pacientes diagnosticados en estadio A (5,2%), reflejo probable del retraso diagnóstico en este grupo.

En lo que respecta al estadio de los tumores con IMS, tampoco hay coincidencias en las publicaciones y mientras algunos describen estadios avanzados al diagnóstico ^{146,147}, otros reflejan resultados similares a los tumores con EMS ¹¹⁷.

Otro hallazgo peculiar fue la identificación de pólipos en un 56% en jóvenes y un 64% en los mayores, con predominio de los adenomatosos. Cerca de la mitad de estos pólipos fueron visualizados en el momento mismo del diagnóstico y la otra mitad durante el seguimiento. Cabría esperar una menor proporción de pólipos sincrónicos en el grupos de jóvenes como describen Chang y cols. (35% Vs 52% en edad avanzada) ¹¹⁸ pero pocas series describen este aspecto. En contraposición, el SL se asocia a mayor presencia de pólipos sincrónicos y metacrónicos ^{85,148,149} lo que concuerda con este estudio en donde los pacientes jóvenes con IMS presentaban casi 67% de pólipos asociados.

El porcentaje de CCR sincrónico o metacrónico de un 6% y un 21% en pacientes jóvenes y mayores respectivamente, fue globalmente mayor que el descrito en la literatura. Es llamativo que fuera más frecuente en la edad avanzada, hallazgo que no coincide con los datos publicados por Liang de un 9,8% y de un 1,8% ¹¹⁷ para grupos similares. En el SL también existe mayor probabilidad de CCR sincrónico o metacrónico ¹¹⁵ y explicaría el porcentaje encontrado en los pacientes jóvenes de esta serie. La neoplasia primaria múltiple también fue más frecuente en la edad avanzada

(11% Vs 34%). Esta mayor proporción de lesiones asociadas en los pacientes mayores puede deberse a la probabilidad acumulada de desarrollar lesiones asociadas con el paso de los años.

2.2. Características familiares.

Para determinar las características familiares en la población estudiada se realizaron entrevistas a los sujetos del estudio así como a sus familiares, en los casos necesarios, como se expuso en la sección de materiales y métodos. De esta manera se estableció la agregación familiar existente y los tumores asociados al CCR.

En la población general, el CCR es hereditario en un 5% de los casos, familiar en un 25% y esporádico en el restante 70% ^{21,43,91}. En este trabajo, la forma de presentación en los jóvenes fue hereditaria en cerca de un 20% de los casos, existió agregación familiar en 40% y fue esporádica en otro 40%. En los pacientes mayores, las respectivas proporciones fueron 1%, 19% y 80%. Es evidente que la edad constituye un criterio diferenciador en la forma de presentación del CCR.

También merece un comentario el grupo compuesto por 39% de pacientes jóvenes con CCR esporádico. Este grupo representa un interés específico pues es el menos caracterizado desde el punto de vista molecular. La aparición de CCR a una edad temprana no es habitual y es probable que se explique en parte por vías de carcinogénesis que aún no están claramente definidas.

En el grupo de los jóvenes la identificación de CCR asociado a SL es más probable ^{149,150}. De hecho, la edad constituye una herramienta diagnóstica útil para este síndrome. También es lógico pensar que dependiendo del punto de corte en la edad se establezcan proporciones diferentes. En general, las publicaciones coinciden en que el CCR en jóvenes se asocia a mayor agregación hereditaria y familiar. Losi y cols. con

un punto de corte de 45 años identifican SL en el 10% de los sujetos estudiados, Steinhagen y cols. describen que el 4,5% de los menores de 50 años tiene criterios de *Ámsterdam II* y el 30,8%, agregación familiar, y Jasperson, con una edad tope de 35 años, 18% con criterios de *Ámsterdam II* y 28% hereditarios ^{126,149,151}.

Claramente, la agregación familiar en CCR no está siempre relacionada con la IMS. La agregación familiar, cuando existe EMS, puede deberse a la concurrencia de diversos factores genéticos de menor penetrancia o de alteraciones genéticas aún desconocidas como en el caso de CCR familiar tipo X en donde se cumplen los criterios de *Ámsterdam* pero no existe IMS ^{21,149}. En nuestro estudio, la mayoría de los jóvenes con CCR presentaba EMS (85,2%), dato similar al publicado por Yiu y cols. (80%) ¹⁴³. Comparado con el grupo de los mayores con CCR y EMS, los jóvenes presentaban mucha mayor agregación familiar (56,4% Vs 18,2%). Este hallazgo ha sido confirmado en varias publicaciones y es probable que corresponda a la existencia de nuevos síndromes de CCR hereditario ^{43,127,137,138}.

2.3. Características moleculares.

2.3.1. Inestabilidad de microsatélites.

La IMS se debe a una alteración del sistema de reparación de errores del ADN que conduce a la acumulación de errores de los microsatélites distribuidos por todo el genoma ¹⁵². La IMS es característica de algunos tumores cuya base molecular es la alteración del sistema de reparación. Representa el 10-15% de todos los CCR y es habitual en las formas hereditarias como el SL en donde se producen mutaciones germinales en algunos de los MMR. En los casos esporádicos de CCR, la IMS se

produce por silenciamiento somático del gen *MLH1* por hipermetilación de su región promotora ¹⁵³.

La identificación de IMS mediante panel de Bethesda o mediante técnica de IHQ ha sido ampliamente descrito. Estos métodos presentan una mayor sensibilidad que los criterios clínicos de Ámsterdam y Bethesda para detectar el SL. Empleando el panel de Bethesda, seguido de la IHQ y el test genético se puede identificar a cerca de un 90% de los individuos con CCR por SL. La IHQ es algo menos sensible que el panel de Bethesda pero varios trabajos la consideran igualmente válida y es menos costosa ^{154,155}. En este estudio se emplearon ambas técnicas.

Todos los tumores fueron analizados para IMS y alteración genética de MMR en este trabajo. En el grupo de los jóvenes, el 15% de los jóvenes presentó IMS y los 69 pacientes restantes fueron definidos como EMS. IMS se correlacionó con la ausencia de expresión de cualquiera de las proteínas MMR por análisis IHQ en todos los casos. Otros trabajos publicados en los que se tiene en cuenta la edad coinciden con nuestros resultados en jóvenes, con proporciones de tumores IMS entre el 19,7% y el 41% ^{117,126,143,150}. Estas publicaciones también reflejan que a menor edad existe una mayor proporción de CCR con IMS ¹⁵⁶ así como en pacientes que cumplen criterios de Ámsterdam ⁴³.

El SL es responsable de un 2% de todos los CCR y es la causa más frecuente de CCR hereditario. En nuestra población se detectó mutación de los genes MMR en sólo trece pacientes y dentro del grupo de los más jóvenes, sólo en un 12%. Podría esperarse un porcentaje más alto de SL en estos jóvenes pero los datos coinciden con otros publicados en una población similar ^{118,157,158}. Fácilmente se deduce que existen otras vías de carcinogénesis por descubrir.

El estudio de los genes MMR en los casos de IMS mostró que hubo mutaciones en cuatro casos de *MLH1*, cuatro en *MSH2* y dos en *MSH6* (se identificó

hipermetilación de *MLH1* en un caso y en un caso no se halló alteración molecular aunque la proteína *MSH6* no se expresó). La localización en las mutaciones coincide con los datos de Niessen y cols. que identifican 32% de alteraciones en *MLH1*, 36% en *MSH2* y 32% en *MSH6* ¹⁵⁹.

En la población de mayores de 69 años, el porcentaje de tumores IMS fue menor (9,3%). Los porcentajes publicados en población mayor son variables entre un 6,3% y un 14% ^{117,118}. Sin embargo la causa de IMS en la población mayor se debe a hipermetilación del promotor *MLH1* en una proporción más alta ^{3,153}. Estos datos coinciden con el hallazgo de que el 89% de los pacientes mayores analizados con tumores IMS no presentaban mutaciones en los genes MMR.

Se comparó la IMS y la EMS según el grupo de edad. En el grupo de menores de 45 años, los tumores IMS presentaron menor edad al diagnóstico, mayor afectación del colon derecho, estadios iniciales de presentación y más antecedentes familiares de cáncer que los tumores EMS. Estas características se explican por el número de SL existentes en este grupo ⁶⁵. Las características histológicas también correspondieron con las de dicho síndrome.

En el grupo de mayores de 69 años, el 9% de los tumores presentó IMS. Estos fueron debidos principalmente a la mutación en *BRAF* o a hipermetilación de *MLH1*. Su aparición fue más frecuente en mujeres y la mayoría de estos tumores fueron esporádicos.

El hallazgo de un 85% de tumores con EMS en el grupo de jóvenes es destacable. Pocos estudios hacen referencia a este aspecto. Chang y cols. describen que los CCR con EMS en jóvenes tienen predilección por el colon sigmoide y el recto así como características histopatológicas de mal pronóstico ¹¹⁸. Estos datos coinciden con nuestros resultados en donde los jóvenes con CCR y EMS tienen mayor compromiso de colon izquierdo y recto que los mayores con CCR con EMS, así como peor diferenciación tumoral y mayor producción de mucina. Estas diferencias son aún más evidentes cuando se analiza simultáneamente la influencia del fenotipo metilador, como se describirá más adelante. También es resaltable que de manera significativa, la

agregación familiar fue mayor en el grupo de jóvenes con tumores EMS que en los mayores mientras que la presentación fue en estadios más tempranos y con una proporción menor de neoplasia primaria múltiple.

2.3.2. Fenotipo metilador.

La vía serrada o del fenotipo metilador es la forma más recientemente descrita de carcinogénesis en el CCR. El pólipo serrado es el precursor del CCR con fenotipo metilador (CIMP) de tumores IMS pero también de tumores EMS. CIMP está presente en cerca de un 40% de los CCR ya que se solapa con tumores tanto de la vía cromosómica (esporádicos) como de la vía de la IMS.

Como se ha explicado anteriormente, esta vía se caracteriza por la metilación de islas CpG (CIMP) en regiones promotoras de genes supresores de tumores, lo que produce un silenciamiento epigenético^{134,160}. Diversos mecanismos están implicados siendo los más comunes la activación del gen *BRAF* y la metilación del promotor de *MLH1*^{3,161-163}.

El CCR perteneciente a esta vía puede tener diferentes grados de metilación. El grado de metilación es importante pues modifica el comportamiento tumoral en cuanto a las características clínicas, patológicas y moleculares. El grado de CIMP clásicamente se ha dividido en tres grupos: CIMP alto, CIMP bajo y CIMP cero o negativo. El CCR con alto grado de metilación se ha asociado con mayor afectación del colon proximal¹⁶⁴, del sexo femenino¹⁶⁵, pobre diferenciación¹⁶² y preferentemente a IMS y a mutaciones en *BRAF*³⁵.

En este trabajo se realizó la caracterización del fenotipo metilador en 68 tumores de pacientes menores de 46 años y en 90 pacientes mayores de 69 años. En los jóvenes se encontró CIMP alto en tan sólo 19,1%, y fue bajo en 41,2% y negativo en 39,7%. Se

encontró una asociación entre CIMP alto y familias tanto con criterios de Ámsterdam como con tumores relacionados con SL. La localización en el colon derecho también fue más frecuente en el CIMP alto.

En el grupo de mayores se encontró que el fenotipo más frecuente era CIMP cero (49%). En esta población, los casos con CIMP alto e IMS se asociaron a mutaciones en *BRAF* y ausencia de expresión de la proteína *MLH1* debido a hipermetilación del promotor de *MLH1*.

Según estudios publicados, el fenotipo metilador aparece en un 12 a 25% de los CCR datos que coinciden con nuestros resultados. Si se excluyen los tumores IMS, el porcentaje de aparición del fenotipo metilador disminuye ^{127,161}.

Con alguna frecuencia se ha utilizado la estabilidad de los microsatélites para clasificar el CCR. De manera general, se ha considerado que los CCR con EMS y que siguen la vía de la inestabilidad cromosómica se asocian en un 60% a fenotipo metilador, mientras que los CCR con IMS, dentro de los cuales se encuentran los SL, presentan fenotipo metilador en un 40% ³.

Aunque pocos trabajos estratifican el CIMP por la edad, el fenotipo metilador influye en determinados aspectos de la presentación del CCR. Cuando se incluyen todas las edades, el fenotipo metilador se ha asociado a localización en colon proximal, sexo femenino, edad avanzada, producción de moco, p53 nativo, IMS y mutación de *KRAS* ^{127,161}. También se han asociado a la mutación de *V600E* del gen *BRAF* ^{166,167}. Una serie de 864 pacientes encontró que el fenotipo metilador se hallaba presente en el 29,8% de los CCR analizados y de estos, el 82,1% eran IMS. La hipermetilación de *MLH1* se presentaba en el 21,3% del total, en el 15,3% de los casos EMS y en el 80,2% de los casos IMS. También se encontró una importante asociación entre la mutación *V600E* del gen *BRAF* y el fenotipo metilador.

En este trabajo, los pacientes más jóvenes con tumores IMS presentaban CIMP alto en 5,9% de los casos y CIMP bajo o cero, en 8,8%. En los mayores con IMS, los resultados fueron 7,8% y 4,5% respectivamente. En cuanto a los tumores EMS en

jóvenes CIMP alto constituyó el 13,2% y CIMP bajo o cero 72,1%, mientras que en los mayores, 16,7% y 73,3% respectivamente.

Autores como Ogino y cols. han descrito que los pacientes SL se incluyen en el grupo CIMP cero mientras que la IMS en casos esporádicos tienen mayor proporción de CIMP alto, en relación con mutaciones en *BRAF*. Nuestros resultados sólo concuerdan con dicha descripción cuando se analiza el grupo de pacientes con CCR de aparición tardía. Llamativamente, varios de nuestros pacientes con SL presentaban CIMP alto, aspecto que confirma la relevancia del criterio edad.

En contraste, en la categoría de los pacientes mayores con CIMP alto estaban incluidos la mayoría de los casos de IMS esporádicos. Los dos únicos casos que presentaron IMS sin mutación MMR pertenecían a CIMP bajo. Esto puede ser debido a la mutación en *BRAF* y a la hipermetilación del promotor de *MLH1* tal y como lo hemos observado en el CCR de aparición precoz y como ha sido descrito por otros autores ^{135,168}.

Los tumores con CIMP bajo o cero en jóvenes se localizaron más frecuentemente en el colon izquierdo mientras que los tumores en los mayores con igual fenotipo mostraron una tendencia a desarrollar otras neoplasias primarias, incluyendo CCR. Finalmente, en jóvenes CIMP cero fue raro el compromiso del colon derecho, tuvieron una alta frecuencia de tumores estadio A y un importante componente familiar.

Las diferencias entre CIMP bajo y CIMP cero son poco llamativas habitualmente. Cuando se realiza un análisis de CCR en general, estos dos grupos se pueden incluir en uno sólo. Sin embargo, algunos resultados merecen ser destacados en el grupo con CCR de aparición temprana comparado con el de mayores: a medida que disminuye el grado de CIMP, disminuye la localización en el colon derecho y aumenta la edad; una proporción más alta de tumores CIMP bajo; un importante componente

familiar como resultado de neoplasias relacionadas y no relacionadas con SL en el grupo CIMP bajo: y un importante número de neoplasias relacionadas con el SL en el grupo CIMP cero.

3. CARACTERÍSTICAS DE LA PRESENTACIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL SEGÚN LA VÍA DE CARCINOGENÉISIS: INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES Y FENOTIPO METILADOR.

3.1. Vía de la inestabilidad de microsatélites.

3.1.1. Características clínicas y anatómo-patológicas.

Globalmente, en los pacientes con tumores IMS, la edad al diagnóstico fue menor que en el grupo de tumores EMS. Este hallazgo fue más llamativo en el grupo de CCR de aparición temprana en donde la edad promedio fue de 34 años en IMS y 40 en EMS. La causa puede ser al mayor porcentaje de casos de SL en este grupo. Este hallazgo coincide con otras publicaciones ^{126,136}.

La localización del CCR de los tumores en los pacientes jóvenes con IMS se distribuyó de manera homogénea y exclusivamente en el colon derecho y el izquierdo (sin afectar el recto) mientras que los EMS en este mismo grupo se localizaron predominantemente en el colon izquierdo y en el recto (42% y 37% respectivamente). En los pacientes mayores, los tumores IMS mostraron predominio del colon derecho y los EMS, predominio levemente mayor del recto. Como hemos anotado previamente, el tamaño de la muestra es relativamente pequeño para definir este aspecto. Lo habitualmente descrito es que en los tumores IMS en jóvenes se localicen en el colon derecho y que la distribución de los EMS, sobretodo en mayores, sea más homogénea ^{126 117}, diferente a los resultados obtenidos en este trabajo y que puede deberse a la mayor caracterización de los pacientes al dividirlos por grupos de edades.

En lo que respecta al estadio tanto en jóvenes como en mayores, la mayoría de los tumores IMS se diagnosticaron en estadio B mientras que los tumores EMS se distribuyeron de manera más homogénea, hallazgo estadísticamente significativo aunque de difícil correlación clínica. La interpretación del estadio con respecto a la presencia de IMS no está aclarado y autores como Losi¹²⁶ tampoco logran encontrar diferencias.

En cuanto a las características anatómo-patológicas de los tumores de los pacientes jóvenes, cuando había IMS hubo mayor frecuencia de pobre diferenciación, presencia de células en anillos de sello y producción de moco que en EMS. Este hallazgo se corresponde con las características de SL^{169,170} pero también con hallazgos específicos atribuibles a la menor edad^{108,117,118,146}. En los mayores no se encontraron diferencias tan definidas y mientras que los tumores EMS presentaron algo más de células en anillo de sello y producción de moco, los IMS presentaron pobre diferenciación en mayor proporción.

3.1.2. Características familiares.

En los jóvenes, los tumores IMS presentaron, claramente, una mayor agregación familiar que los EMS, siendo en estos últimos, el 46,4% de los tumores esporádicos. No hubo ningún caso de CCR esporádico en los jóvenes con tumores IMS. Se comprueba fácilmente la relación existente entre SL y CCR de aparición temprana con IMS.

En el grupo de mayores, las diferencias atribuibles a IMS fueron menos notorias. Tanto en IMS como en EMS predominaron los casos esporádicos, 66,7 y 81,8% respectivamente.

3.1.3. Características moleculares.

En los jóvenes, el 83% de los tumores que presentaba IMS correspondían a SL por lo que presentaban MMR. En los mayores, la IMS se produce por otra vía, como se comprueba a través de nuestros resultados y en donde la mutación en *BRAF* (44,4%) o la ausencia de expresión del gen *MLH1* por hipermetilación (87,5%) son las causas principales. Estos hallazgos están claramente establecidos^{37,140} y serán tratados al analizar el fenotipo metilador.

3.2. Vía del fenotipo metilador.

Se detectaron diferencias relacionadas con el grado de CIMP en los grupos estudiados. CIMP alto fue el grado menos frecuente tanto en jóvenes como en mayores. Sin embargo, CIMP alto se diferenció, en ambos grupos, por tener características más definidas.

CIMP alto en el grupo de jóvenes se asoció a predilección por el sexo femenino, edad de aparición más temprana, localización en el colon derecho así como mayor proporción de pobre diferenciación tumoral y producción de mucina. También estuvo relacionado con la mutaciones en los genes MMR e IMS y a un importante componente familiar.

CIMP alto en los mayores también se asoció a sexo femenino y a pobre diferenciación pero además a IMS y a la presencia de pólipos asociados. Es de destacar que CIMP alto se asoció, en estos casos de CCR de aparición tardía, a una mayor proporción de mutaciones en el gen *BRAF* (27% Vs 4,2% en pacientes con CIMP bajo o cero) y a la presencia de pólipos asociados.

Los hallazgos de este estudio concuerdan, al menos en parte, con los publicados en la literatura en donde el fenotipo metilador se asocia a localización en el colon proximal, sexo femenino, producción de moco, IMS y mutaciones en *BRAF*^{127,161,167}. Estas publicaciones no tienen en cuenta la edad por lo que pueden explicarse algunas de nuestras diferencias.

4. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL EN DOS GRUPOS DE EDADES DIFERENCIADOS.

Como explican Ogino y Goel⁴¹, en el CCR cada tumor tiene una presentación única debido a que es el producto de múltiples alteraciones y combinaciones posibles. Sin embargo, al menos teóricamente, diferentes tumores exhiben patrones comunes. El

objetivo de la clasificación molecular es encontrar dichos patrones comunes para poder predecir la patogénesis y el comportamiento biológico de cada tumor en particular.

La clasificación molecular del CCR se basa en las principales vías de carcinogénesis y fue descrita inicialmente por Jass ⁴². En su descripción original se correlacionaban características clínicas, morfológicas y moleculares. Posteriormente, Ogino y Goel la modificaron. Diferenciaron cuatro grupos y establecieron su frecuencia en el CCR (porcentajes entre paréntesis): IMS/CIMP alto (5%), IMS/CIMP bajo o cero (10%), EMS/CIMP alto (5-10%) y EMS/CIMP bajo o cero (75-80%).

En cada grupo se han descrito características específicas: IMS/CIMP alto frecuentemente presenta metilación de *MLH1* y mutaciones en *BRAF*, pobre diferenciación tumoral, reacción linfocitaria, producción de moco, células en anillo de sello; clínicamente se describe como IMS esporádico y es más frecuente en mujeres mayores y en el colon proximal; IMS/CIMP bajo/0 se incluyen los SL y muestran preferencia por el colon derecho, reacción linfocitaria, producción de moco pero sin pobre diferenciación ni células en anillo de sello; EMS/CIMP alto presentan frecuentemente mutaciones en *BRAF*, pobre diferenciación, células en anillo de sello y clínicamente se presentan en el colon derecho de mujeres mayores; EMS/CIMP bajo/0 tiene mayor heterogeneidad pero se asocian a sexo masculino y se localizan en el colon distal.

En este estudio, los grupos presentaron la siguiente frecuencia: IMS/CIMP alto constituyó el 5,9%, IMS/CIMP bajo/0 el 8,8%, EMS/CIMP alto el 13,2% y EMS/CIMP bajo/0 el 72,1%. Estos resultados coinciden con la descripción de Ogino.

Uno de los objetivos de este trabajo era caracterizar los grupos de esta clasificación molecular de acuerdo a la edad de presentación. En IMS/CIMP alto, las muestras poblacionales fueron pequeñas pero se reconocieron algunas características significativas. Aunque jóvenes y mayores presentaron mayor afectación del colon

derecho, similar a lo descrito en publicaciones anteriores, todos los tumores IMS/CIMP alto en jóvenes correspondieron a SL, sin predominio de género y con las características propias de este síndrome. Por su parte, el grupo de aparición tardía con IMS/CIMP alto se caracterizó por mutaciones en el gen *BRAF* y predilección por el sexo femenino. En este grupo de mayores no hubo SL, 42,9% presentaron agregación familiar y los casos esporádicos constituyeron el 57,1%.

El 50% de los pacientes del grupo IMS/CIMP bajo/0 jóvenes fueron SL y destacó, como cabía esperar, producción de moco e importante agregación familiar. Sin embargo, predominó la localización en el colon izquierdo (67%). En los mayores con IMS/CIMP bajo/0 se objetivó ausencia de expresión del gen *MLHI* en el 50% de los casos y el 100% fueron esporádicos, predominó la localización en colon derecho y no hubo tumores con células en células en anillo de sello.

Si se realiza una visión de conjunto de los datos presentados se puede anotar que las características fenotípicas de los grupos IMS/CIMP alto y IMS/CIMP bajo/0 descritos por Ogino y Goel, son similares a las de los dos grupos correspondientes de pacientes mayores mientras que los pacientes jóvenes, de estos dos grupos, poseen características diferenciales. En otras palabras, la edad determina un comportamiento específico y discrimina a los dos grupos IMS de Ogino y Goel.

Los hallazgos en los jóvenes son especialmente llamativos en el grupo IMS/CIMP alto pero una limitación es que la muestra es pequeña. Estas limitaciones específicas ya han sido reseñadas en la literatura e implican cautela en el momento de analizar los datos ⁴¹.

El grupo constituido por EMS/CIMP alto también es relativamente pequeño. En los más jóvenes representó el 13,2% de los tumores y en los mayores, el 16,7%. En ambos grupos se encontró que predominaban los casos esporádicos (55,6% y 93,3% respectivamente). En los jóvenes, los tumores eran proximales, mucinosos, con importante agregación familiar (44,4%) y sin género preferente ni mutaciones en *BRAF* mientras que en los mayores, se encontró mutación en *BRAF* en un 13% y predominó la localización en el colon izquierdo y en el recto. Aunque existen similitudes con el

subgrupo descrito por Ogino y Goel, nuevamente es difícil establecer conclusiones al respecto por el limitado tamaño de la muestra. De todas maneras, vale la pena resaltar que en el grupo de los más jóvenes con EMS/CIMP alto existe un componente familiar importante secundario a la agregación de neoplasias relacionadas con el SL.

El grupo más frecuente, tanto en jóvenes como en mayores, fue EMS/CIMP bajo/0 (72% y 73% respectivamente). Aunque existen algunas características comunes en los dos grupos etarios (predominio en hombres, producción de moco, ausencia de expresión de *MLH1* y de mutaciones en MMR así como una muy baja proporción de mutaciones en *BRAF*), son más llamativas las diferencias. En los jóvenes, es rara la afectación del colon derecho, existe presencia de pólipos y de otras neoplasias en el seguimiento y presentan un importante componente de agregación familiar (sólo el 44,9% de estos tumores eran esporádicos mientras que en los pacientes mayores casi el 80% era esporádico).

Lamentablemente, subdividir la clasificación molecular por edades reduce el tamaño de los grupos e impidió obtener un análisis multivariante de los datos obtenidos. Incluyendo otros datos que no son presentados en este trabajo, solamente el CCR de aparición temprana junto con IMS se asoció con mejor pronóstico en relación con SG y SLE.

De todas formas, en este estudio se comprobó que la edad permite caracterizar los tumores EMS, tanto con CIMP alto como con CIMP bajo/0, y es importante reseñar que el grupo de los pacientes más jóvenes exhibió, en ambos casos, un importante componente familiar. En el caso específico de los tumores EMS/CIMP bajo/0 en jóvenes probablemente estén incluidos pacientes con CCR familiar tipo X ²¹, cuya característica es la de cumplir con los criterios de Ámsterdam pero no exhibir IMS. Este grupo de pacientes con CCR familiar tipo X puede explicar algunas de las diferencias entre CCR EMS/CIMP bajo/0 de aparición temprana o tardía.

Por otro lado, existe otro grupo establecido de tumores de aparición precoz y que presentan EMS y estabilidad cromosómica ¹³⁷. Se han denominado MACS y se caracterizan, además de la aparición precoz, por localización en el colon distal, estadios

avanzados y asociación con tumores relacionados con SL (principalmente de endometrio). Su relación con el fenotipo metilador no está aclarada y mientras algunos estudios admiten asociaciones ¹⁷¹, otros consideran que tienen vías de carcinogénesis distintas ¹⁷². Los tumores MACS podrían estar incluidos en el grupo de EMS y serían responsables de algunas diferencias entre estas dos poblaciones.

Otra característica molecular relacionada con la aparición temprana de CCR es la hipometilación LINE-1 ^{157,173}. Los tumores que exhiben esta característica también presentan agregación familiar ^{174,175}. Existe una relación inversa entre CIMP e IMS y LINE-1 lo que presupone que CIMP/IMS y la hipometilación genómica representan diferentes modelos de carcinogénesis. Por otro lado, tumores con inestabilidad cromosómica (IC) y sin IMS se asocian a LINE-1 de donde se infiere una relación entre IC y LINE-1. Esta característica molecular de la hipometilación LINE-1 relacionada con el CCR EMS en el paciente joven sugiere también CIMP/IMS y la hipometilación genómica representan vías diferentes de CCR.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES.

1. En nuestro estudio encontramos que la edad es un factor diferenciador en la presentación del CCR. Desde el punto de vista fenotípico, en el CCR del adulto joven predominan género masculino, colon izquierdo, pobre diferenciación y células en anillo de sello, diagnóstico en estadios tempranos, asociación a pólipos sincrónicos, agregación familiar y asociación con SL. El CCR en el adulto mayor presentó características propias del tipo esporádico como era de esperar.
2. En el CCR del paciente joven, la IMS se asoció a SL, localización en colon derecho e izquierdo, presentación en estadios tempranos y agregación familiar. En el paciente mayor, la IMS se asoció a CCR esporádico con mutaciones en *BRAF* con predominio en mujeres, colon derecho y diagnóstico en estadios iniciales.
3. Los tumores colorrectales EMS fueron los más frecuentes. En los pacientes jóvenes se diferenciaron de los mayores por menor proporción de neoplasia primaria múltiple y especialmente por una importante agregación familiar para cáncer.
4. En la vía del fenotipo metilador del CCR, el CIMP alto fue la categoría menos frecuente pero la más diferenciada. En jóvenes, CIMP alto se asoció a tumores mucinosos y a SL mientras que los pacientes mayores de esta categoría exhibieron mayoritariamente CCR esporádico.

CONCLUSIONES

5. Cada vía de carcinogénesis colorrectal tiene manifestaciones determinadas. Si además se analizan según la edad, se evidencian grupos característicos dentro de cada vía de carcinogénesis. Estas diferencias fueron más evidentes en la vía de la IMS que en la del fenotipo metilador en nuestra población.
6. Los tumores de pacientes jóvenes con CCR IMS/CIMP alto se asociaron a SL localizado en colon derecho mientras que en los mayores lo hicieron a casos esporádicos con mutaciones en *BRAF*. Los tumores EMS/CIMP alto de los pacientes jóvenes tuvieron mayor presentación en estadios tempranos, en colon derecho, producción de moco y agregación familiar que los de los mayores. Los tumores EMS/CIMP bajo o 0 de jóvenes se diferenciaron de los de pacientes mayores por localización, estadio, incidencia de neoplasia primaria múltiple y componente familiar.
7. El análisis asociado de las vías de carcinogénesis junto con la edad pone de manifiesto la existencia de la gran heterogeneidad del CCR. La edad constituiría un criterio que permite clasificar el CCR.
8. Las tres vías de carcinogénesis explican sólo parcialmente los hallazgos fenotípicos del CCR e insuficientemente la agregación familiar en los tumores de los pacientes jóvenes EMS, lo que sugiere la existencia de mecanismos moleculares subyacentes aún no descritos.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Fukushima T, Takenoshita S. Colorectal carcinogenesis. *Fukushima journal of medical science* 2001;47:1-11.
2. Pharoah PD, Caldas C. Molecular genetics and the assessment of human cancers. *Expert reviews in molecular medicine* 1999;1999:1-19.
3. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Human pathology* 2011;42:1-10.
4. de la Chapelle A. Microsatellite instability. *The New England journal of medicine* 2003;349:209-10.
5. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761, 3.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
7. Aaron S, Alexander M, Maya T, et al. Underlying prothrombotic states in pregnancy associated cerebral venous thrombosis. *Neurol India* 2010;58:555-9.
8. Knudson AG. Cancer genetics. *American journal of medical genetics* 2002;111:96-102.
9. Bodmer WF. Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet* 2006;51:391-6.
10. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2010;127:2893-917.
11. Pinol V, Andreu M, Castells A, et al. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicentre, prospective, nationwide study. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2004;16:39-45.

12. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2007;18:581-92.
13. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European journal of cancer* 2010;46:765-81.
14. Chan TW, Brown C, Ho CC, Gill S. Primary tumor resection in patients presenting with metastatic colorectal cancer: analysis of a provincial population-based cohort. *Am J Clin Oncol* 2010;33:52-5.
15. Eddy DM. Screening for colorectal cancer. *Annals of internal medicine* 1990;113:373-84.
16. 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.
17. 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.
18. Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JK. Focus on colon cancer. *Cancer cell* 2002;1:233-6.
19. Schoen RE. The case for population-based screening for colorectal cancer. *Nature reviews Cancer* 2002;2:65-70.
20. Wirtzfeld DA, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA. Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. *Annals of surgical oncology* 2001;8:319-27.

21. Lindor NM. Familial colorectal cancer type X: the other half of hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome. *Surgical oncology clinics of North America* 2009;18:637-45.
22. Pinsky PF. Does hereditary nonpolyposis colorectal cancer explain the observed excess risk of colorectal cancer associated with family history? *Epidemiology* 2000;11:297-303.
23. Ricciardiello L, Goel A, Mantovani V, et al. Frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. *Cancer research* 2003;63:787-92.
24. Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, et al. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96:1631-4.
25. Houlston RS, Cheadle J, Dobbins SE, et al. Meta-analysis of three genome-wide association studies identifies susceptibility loci for colorectal cancer at 1q41, 3q26.2, 12q13.13 and 20q13.33. *Nature genetics* 2010;42:973-7.
26. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *The New England journal of medicine* 1993;329:1977-81.
27. Jass JR, Smith M. Sialic acid and epithelial differentiation in colorectal polyps and cancer--a morphological, mucin and lectin histochemical study. *Pathology* 1992;24:233-42.
28. Szyllberg L, Janiczek M, Popiel A, Marszalek A. Serrated polyps and their alternative pathway to the colorectal cancer: a systematic review. *Gastroenterology research and practice* 2015;2015:573814.

29. Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O, O'Brien MJ. BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *The American journal of surgical pathology* 2004;28:1452-9.
30. Boparai KS, Reitsma JB, Lemmens V, et al. Increased colorectal cancer risk in first-degree relatives of patients with hyperplastic polyposis syndrome. *Gut* 2010;59:1222-5.
31. Noffsinger AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annual review of pathology* 2009;4:343-64.
32. Fearon ER, Pierceall WE. The deleted in colorectal cancer (DCC) gene: a candidate tumour suppressor gene encoding a cell surface protein with similarity to neural cell adhesion molecules. *Cancer surveys* 1995;24:3-17.
33. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995;768:101-10.
34. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, et al. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998;392:300-3.
35. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature genetics* 2006;38:787-93.
36. van Engeland M, Derks S, Smits KM, Meijer GA, Herman JG. Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:1382-91.
37. Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, et al. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007;132:127-38.

38. Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2006;98:1731-8.
39. Spring KJ, Zhao ZZ, Karamatic R, et al. High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy. *Gastroenterology* 2006;131:1400-7.
40. Grady WM. CIMP and colon cancer gets more complicated. *Gut* 2007;56:1498-500.
41. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2008;10:13-27.
42. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50:113-30.
43. Valle L, Perea J, Carbonell P, et al. Clinicopathologic and pedigree differences in amsterdam I-positive hereditary nonpolyposis colorectal cancer families according to tumor microsatellite instability status. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:781-6.
44. Vasen HF, Moslein G, Alonso A, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *Journal of medical genetics* 2007;44:353-62.
45. Lynch HT, Coronel SM, Okimoto R, et al. A founder mutation of the MSH2 gene and hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States. *JAMA* 2004;291:718-24.
46. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical genetics* 2009;76:1-18.

47. Warthin AS. The Genetic Neoplastic Relationships of Hodgkin's Disease, Aleukaemic and Leukaemic Lymphoblastoma, and Mycosis Fungoides. *Annals of surgery* 1931;93:153-61.
48. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer* 1971;27:1505-11.
49. Peltomaki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Disease markers* 2004;20:269-76.
50. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-32.
51. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* 2003;138:560-70.
52. Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1995;33:90-104.
53. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:839-47.
54. Lucci-Cordisco E, Zito I, Gensini F, Genuardi M. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions. *American journal of medical genetics Part A* 2003;122A:325-34.
55. Quehenberger F, Vasen HF, van Houwelingen HC. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *Journal of medical genetics* 2005;42:491-6.
56. Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, Jarvinen H, Lynch HT. The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med* 1994;96:516-20.

57. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International journal of cancer Journal international du cancer* 1999;81:214-8.
58. Lin KM, Shashidharan M, Ternent CA, et al. Colorectal and extracolonic cancer variations in MLH1/MSH2 hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds and the general population. *Dis Colon Rectum* 1998;41:428-33.
59. Vasen HF, Hendriks Y, de Jong AE, et al. Identification of HNPCC by molecular analysis of colorectal and endometrial tumors. *Disease markers* 2004;20:207-13.
60. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, Lane MR, Lanspa SJ, Lynch HT. Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer research* 1994;14:1631-4.
61. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007;133:48-56.
62. Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 2009;181:273-80.
63. Vasen HF, Taal BG, Nagengast FM, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: results of long-term surveillance in 50 families. *European journal of cancer* 1995;31A:1145-8.
64. de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Familial cancer* 2005;4:233-7.
65. Lynch PM. The hMSH2 and hMLH1 genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Surgical oncology clinics of North America* 2009;18:611-24.

66. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Diseases of the colon and rectum* 1991;34:424-5.
67. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.
68. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *Journal of the National Cancer Institute* 1997;89:1758-62.
69. Rodriguez-Bigas MA. Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary non-polyposis colorectal cancer even if the Amsterdam criteria are not fulfilled. *The British journal of surgery* 1997;84:1027-8.
70. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96:261-8.
71. Kempers MJ, Kuiper RP, Ockeloen CW, et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *The lancet oncology* 2011;12:49-55.
72. Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6870-5.
73. Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A, Peltomaki P. Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *The American journal of pathology* 2000;156:1773-9.

74. Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J, Leggett BA. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *European journal of cancer* 2002;38:858-66.
75. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM. Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Journal of the National Cancer Institute* 2007;99:261-3.
76. Boland CR, Sato J, Saito K, et al. Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: a review of the current models. *Cancer detection and prevention* 1998;22:377-82.
77. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
78. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2000;342:69-77.
79. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000;119:921-8.
80. Wright CM, Dent OF, Barker M, et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *The British journal of surgery* 2000;87:1197-202.
81. Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, et al. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *The American journal of surgical pathology* 2003;27:563-70.

82. Watanabe Y, Koi M, Hemmi H, Hoshai H, Noda K. A change in microsatellite instability caused by cisplatin-based chemotherapy of ovarian cancer. *British journal of cancer* 2001;85:1064-9.
83. Jeong SY, Shin KH, Shin JH, et al. Microsatellite instability and mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. *Diseases of the colon and rectum* 2003;46:1069-77.
84. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *The New England journal of medicine* 2003;349:247-57.
85. Vasen HF. Review article: The Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2007;26 Suppl 2:113-26.
86. Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2008;123:444-9.
87. Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2011;305:2304-10.
88. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology* 2008;135:419-28.
89. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *The New England journal of medicine* 2005;352:1851-60.
90. Felton KE, Gilchrist DM, Andrew SE. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? *Clinical genetics* 2007;71:499-500.

91. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2005;293:1979-85.
92. Winawer SJ. Screening sigmoidoscopy: can the road to colonoscopy be less traveled? *Annals of internal medicine* 2003;139:1034-5.
93. Offit K, Kauff ND. Reducing the risk of gynecologic cancer in the Lynch syndrome. *The New England journal of medicine* 2006;354:293-5.
94. Burke W, Petersen G, Lynch P, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. I. Hereditary nonpolyposis colon cancer. Cancer Genetics Studies Consortium. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1997;277:915-9.
95. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, et al. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nature genetics* 1997;17:79-83.
96. Wallace MH, Phillips RK. Upper gastrointestinal disease in patients with familial adenomatous polyposis. *The British journal of surgery* 1998;85:742-50.
97. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *The American journal of gastroenterology* 2006;101:385-98.
98. Knudsen AL, Bisgaard ML, Bulow S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Familial cancer* 2003;2:43-55.
99. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *The New England journal of medicine* 2003;348:791-9.
100. Russell AM, Zhang J, Luz J, et al. Prevalence of MYH germline mutations in Swiss APC mutation-negative polyposis patients. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006;118:1937-40.

101. Wang L, Baudhuin LM, Boardman LA, et al. MYH mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps. *Gastroenterology* 2004;127:9-16.
102. Balaguer F, Castellvi-Bel S, Castells A, et al. Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer: a multicenter, case-control, population-based study. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2007;5:379-87.
103. Kanter-Smoler G, Bjork J, Fritzell K, et al. Novel findings in Swedish patients with MYH-associated polyposis: mutation detection and clinical characterization. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2006;4:499-506.
104. Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, et al. MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006;119:807-14.
105. Chung YF, Eu KW, Machin D, et al. Young age is not a poor prognostic marker in colorectal cancer. *The British journal of surgery* 1998;85:1255-9.
106. Guillem JG. Molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colon cancer. *The New England journal of medicine* 1998;339:924-5.
107. Mitry E, Benhamiche AM, Couillault C, et al. Effect of age, period of diagnosis and birth cohort on large bowel cancer incidence in a well-defined French population, 1976-1995. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* 2002;11:529-34.
108. O'Connell JB, Maggard MA, Livingston EH, Yo CK. Colorectal cancer in the young. *Am J Surg* 2004;187:343-8.

109. Adloff M, Arnaud JP, Schloegel M, Thibaud D, Bergamaschi R. Colorectal cancer in patients under 40 years of age. *Diseases of the colon and rectum* 1986;29:322-5.
110. Smith C, Butler JA. Colorectal cancer in patients younger than 40 years of age. *Diseases of the colon and rectum* 1989;32:843-6.
111. Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, et al. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer* 2006;107:1153-61.
112. Guillem JG, Bastar AL, Ng J, Huhn JL, Cohen AM. Clustering of colorectal cancer in families of probands under 40 years of age. *Diseases of the colon and rectum* 1996;39:1004-7.
113. Percesepe A, Benatti P, Roncucci L, et al. Survival analysis in families affected by hereditary non-polyposis colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 1997;71:373-6.
114. Chiang JM, Chen MC, Changchien CR, et al. Favorable influence of age on tumor characteristics of sporadic colorectal adenocarcinoma: patients 30 years of age or younger may be a distinct patient group. *Diseases of the colon and rectum* 2003;46:904-10.
115. Guillem JG, Puig-La Calle J, Jr., Cellini C, et al. Varying features of early age-of-onset "sporadic" and hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Diseases of the colon and rectum* 1999;42:36-42.
116. Lynch HT, Smyrk TC. Hereditary colorectal cancer. *Seminars in oncology* 1999;26:478-84.
117. Liang JT, Huang KC, Cheng AL, Jeng YM, Wu MS, Wang SM. Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *The British journal of surgery* 2003;90:205-14.

118. Chang DT, Pai RK, Rybicki LA, 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. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2012;25:1128-39.
119. Alici S, Aykan NF, Sakar B, Bulutlar G, Kaytan E, Topuz E. Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2003;199:85-93.
120. Vasen HF, Nagengast FM, Khan PM. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* 1995;345:1183-4.
121. Hall NR, Williams MA, Murday VA, Newton JA, Bishop DT. Muir-Torre syndrome: a variant of the cancer family syndrome. *Journal of medical genetics* 1994;31:627-31.
122. Fante R, Benatti P, di Gregorio C, et al. Colorectal carcinoma in different age groups: a population-based investigation. *The American journal of gastroenterology* 1997;92:1505-9.
123. Lukish JR, Muro K, DeNobile J, et al. Prognostic significance of DNA replication errors in young patients with colorectal cancer. *Annals of surgery* 1998;227:51-6.
124. Dunlop M, Campbell H. Screening for people with a family history of colorectal cancer. *BMJ* 1997;314:1779-80.
125. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nature genetics* 1995;9:48-55.
126. Losi L, Di Gregorio C, Pedroni M, et al. Molecular genetic alterations and clinical features in early-onset colorectal carcinomas and their role for the recognition of hereditary cancer syndromes. *The American journal of gastroenterology* 2005;100:2280-7.

127. Hawkins NJ, Tomlinson I, Meagher A, Ward RL. Microsatellite-stable diploid carcinoma: a biologically distinct and aggressive subset of sporadic colorectal cancer. *British journal of cancer* 2001;84:232-6.
128. Georgiades IB, Curtis LJ, Morris RM, Bird CC, Wyllie AH. Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene* 1999;18:7933-40.
129. Boardman LA, Johnson RA, Petersen GM, et al. Higher frequency of diploidy in young-onset microsatellite-stable colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007;13:2323-8.
130. Abdel-Rahman WM, Ollikainen M, Kariola R, et al. Comprehensive characterization of HNPCC-related colorectal cancers reveals striking molecular features in families with no germline mismatch repair gene mutations. *Oncogene* 2005;24:1542-51.
131. Guldberg P, Guttler F. A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1993;21:2261-2.
132. Wijnen PA, van Dieijen-Visser MP. Capillary electrophoresis of serum proteins. Reproducibility, comparison with agarose gel electrophoresis and a review of the literature. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 1996;34:535-45.
133. Wijnen J, Vasen H, Khan PM, et al. Seven new mutations in hMSH2, an HNPCC gene, identified by denaturing gradient-gel electrophoresis. *American journal of human genetics* 1995;56:1060-6.
134. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature reviews Cancer* 2004;4:988-93.

135. 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. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2010;8:966-71.
136. Perea J, Rodriguez Y, Rueda D, et al. Early-onset colorectal cancer is an easy and effective tool to identify retrospectively Lynch syndrome. *Annals of surgical oncology* 2011;18:3285-91.
137. Chan TL, Curtis LC, Leung SY, et al. Early-onset colorectal cancer with stable microsatellite DNA and near-diploid chromosomes. *Oncogene* 2001;20:4871-6.
138. Banerjea A, Hands RE, Powar MP, Bustin SA, Dorudi S. Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2009;11:601-8.
139. Mostafa G, Matthews BD, Norton HJ, Kercher KW, Sing RF, Heniford BT. Influence of demographics on colorectal cancer. *Am Surg* 2004;70:259-64.
140. Giraldez MD, Lopez-Doriga A, Bujanda L, et al. Susceptibility genetic variants associated with early-onset colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2012;33:613-9.
141. Savas N, Dagli U, Akbulut S, Yuksel O, Sahin B. Colorectal cancer localization in young patients: should we expand the screening program? *Dig Dis Sci* 2007;52:798-802.
142. Mahdavinia M, Bishehsari F, Ansari R, et al. Family history of colorectal cancer in Iran. *BMC cancer* 2005;5:112.
143. Yiu R, Qiu H, Lee SH, Garcia-Aguilar J. Mechanisms of microsatellite instability in colorectal cancer patients in different age groups. *Diseases of the colon and rectum* 2005;48:2061-9.

144. Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK, et al. Clinical, pathologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma. *The American journal of surgical pathology* 2009;33:572-82.
145. 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. *Annals of surgical oncology* 2011;18:2469-76.
146. Lin JT, Wang WS, Yen CC, et al. Outcome of colorectal carcinoma in patients under 40 years of age. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:900-5.
147. Calin GA, Gafa R, Tibiletti MG, et al. Genetic progression in microsatellite instability high (MSI-H) colon cancers correlates with clinico-pathological parameters: A study of the TGRbetaR2, BAX, hMSH3, hMSH6, IGF1R and BLM genes. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2000;89:230-5.
148. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterology clinics of North America* 2008;37:1-24, v.
149. Jaspersen KW, Vu TM, Schwab AL, et al. Evaluating Lynch syndrome in very early onset colorectal cancer probands without apparent polyposis. *Familial cancer* 2010;9:99-107.
150. Pucciarelli S, Agostini M, Viel A, et al. Early-age-at-onset colorectal cancer and microsatellite instability as markers of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Diseases of the colon and rectum* 2003;46:305-12.
151. Steinhagen E, Shia J, Markowitz AJ, et al. Systematic immunohistochemistry screening for Lynch syndrome in early age-of-onset colorectal cancer patients undergoing surgical resection. *Journal of the American College of Surgeons* 2012;214:61-7.

152. Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003;21:1174-9.
153. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer metastasis reviews* 2004;23:11-27.
154. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:5783-8.
155. Perez-Carbonell L, Ruiz-Ponte C, Guarinos C, 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;61:865-72.
156. Durno C, Aronson M, Bapat B, Cohen Z, Gallinger S. Family history and molecular features of children, adolescents, and young adults with colorectal carcinoma. *Gut* 2005;54:1146-50.
157. Antelo M, Balaguer F, Shia J, et al. A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PloS one* 2012;7:e45357.
158. Limburg PJ, Harmsen WS, Chen HH, et al. Prevalence of alterations in DNA mismatch repair genes in patients with young-onset colorectal cancer. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2011;9:497-502.
159. Niessen RC, Berends MJ, Wu Y, 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 cancer. *Gut* 2006;55:1781-8.
160. Rashid A, Issa JP. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology* 2004;127:1578-88.

161. van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* 2002;51:797-802.
162. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2005;129:837-45.
163. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2012;5:19-27.
164. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS. CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2006;8:582-8.
165. Ogino S, Odze RD, Kawasaki T, et al. Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma. *The American journal of surgical pathology* 2006;30:1175-83.
166. Kambara T, Matsubara N, Nakagawa H, et al. High frequency of low-level microsatellite instability in early colorectal cancer. *Cancer research* 2001;61:7743-6.
167. Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, et al. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004;22:4584-94.
168. Giraldez MD, Balaguer F, Bujanda L, et al. MSH6 and MUTYH deficiency is a frequent event in early-onset colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:5402-13.
169. Moran A, Ortega P, de Juan C, et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2010;2:151-8.

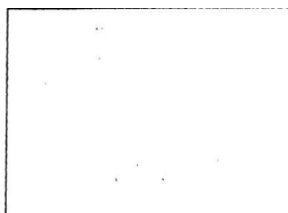
170. da Fonseca LM, da Luz MM, Lacerda-Filho A, Cabral MM, da Silva RG. Colorectal carcinoma in different age groups : a histopathological analysis. *International journal of colorectal disease* 2012;27:249-55.
171. Silver A, Sengupta N, Propper D, et al. A distinct DNA methylation profile associated with microsatellite and chromosomal stable sporadic colorectal cancers. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2012;130:1082-92.
172. 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. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2008;132:958-64.
173. Baba Y, Huttenhower C, Nosho K, et al. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. *Molecular cancer* 2010;9:125.
174. Goel A, Xicola RM, Nguyen TP, et al. Aberrant DNA methylation in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency. *Gastroenterology* 2010;138:1854-62.
175. Ogino S, Nishihara R, Lochhead P, et al. Prospective study of family history and colorectal cancer risk by tumor LINE-1 methylation level. *Journal of the National Cancer Institute* 2013;105:130-40.

ANEXO

CONSENTIMIENTO INFORMADO



CONSENTIMIENTO INFORMADO



D.N.I. del paciente: _____

Fecha: ____/____/____

Nombre del Médico que informa: _____

Nº Colegiado: _____

UNIDAD DE CÁNCER FAMILIAR. ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS PREDISPONENTES A CÁNCER DE COLÓN NO ASOCIADO A POLIPOSIS (CÁNCER DE COLÓN 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 el 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: _____ Firma tutor (caso de menor o incapacitado legalmente): _____
Fecha: _____ 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. /Dª _____ Fecha: _____

REVOCACIÓN

En ejercicio del derecho que tengo de anular el consentimiento prestado manifiesto mi voluntad de revocarlo y solicito se proceda a la destrucción de las muestras sanguíneas extraídas y de la información de ellas obtenida.

Firma: _____ Fecha: _____