

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Cirugía**



**ANÁLISIS DE LAS VÍAS DE CARCINOGENÉISIS DEL  
CÁNCER COLORRECTAL DE APARICIÓN PRECOZ**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Irene Osorio Silla

Bajo la dirección de los doctores

José Perea García  
Felipe de la Cruz Vigo  
Miguel Urioste Azcorra

**Madrid, 2014**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Cirugía

**ANÁLISIS DE LAS VÍAS DE CARCINOGENESIS DEL CÁNCER  
COLORRECTAL DE APARICIÓN PRECOZ.**

TESIS DOCTORAL

**IRENE OSORIO SILLA**

**MADRID, 2013**







A mi familia



ÍNDICE

|  |      |
|--|------|
| AGRADECIMIENTOS .....  | ix   |
| ABREVIATURAS .....   | xiii |
| RELACIÓN DE TABLAS .....   | xvii |
| RELACIÓN DE FIGURAS .....  | xix  |
| RESUMEN .....  | xxi  |
| SUMMARY .....  | xxix |
| <br>   |      |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 3    |
| <b>1. EL CÁNCER, UNA ENFERMEDAD GENÉTICA. EL CÁNCER FAMILIAR</b> .....               | 3    |
| <b>2. EL CÁNCER COLORRECTAL. GENERALIDADES</b> .....                                 | 7    |
| <b>2.1. Epidemiología</b> .....  | 7    |
| <b>2.2. Etiología</b> .....  | 10   |
| <b>2.3. Fisiopatología del Cáncer Colorrectal</b> .....                              | 12   |
| <u>2.3.1. Anatomía e histología del colon</u> .....                                  | 12   |
| <u>2.3.2. Mecanismo de generación del Cáncer Colorrectal</u> .....                   | 13   |
| <b>2.4. Lesiones precancerosas. Pólipos colónicos</b> .....                          | 18   |
| <b>2.5. Diagnóstico</b> .....  | 23   |
| <u>2.5.1. Diagnóstico en sujeto con sospecha clínica de cáncer colorrectal</u> ..... | 23   |
| <u>2.5.2. Cribado del cáncer colorrectal en nuestro medio</u> .....                  | 25   |
| <b>2.6. Clasificación por estadios. Definiciones</b> .....                           | 27   |
| <b>2.7. Tratamiento</b> .....  | 32   |
| <u>2.7.1. Tratamiento quirúrgico</u> .....   | 32   |
| <u>2.7.2. Tratamiento adyuvante</u> .....  | 37   |
| <u>2.7.3 Tratamiento paliativo</u> .....   | 39   |
| <b>2.8. Seguimiento</b> .....  | 40   |
| <b>3. EL CÁNCER COLORRECTAL FAMILIAR</b> .....                                       | 42   |
| <b>3.1. Síndrome de Lynch</b> .....  | 43   |
| <u>3.1.1. Concepto y variantes</u> .....   | 43   |
| <u>3.1.2. Cribado del Síndrome de Lynch</u> .....                                    | 46   |
| <u>3.1.3. Tratamiento quirúrgico</u> .....   | 47   |
| <b>3.2. Poliposis Adenomatosa Familiar</b> .....                                     | 48   |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.1. Concepto y variantes.....   | 48        |
| 3.2.2. Cribado de la Poliposis Adenomatosa Familiar.....   | 51        |
| 3.2.3. Tratamiento de la afectación colorrectal.....   | 51        |
| <b>3.3 Otros síndromes.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>4. CÁNCER COLORRECTAL EN EL ADULTO JOVEN.....</b>   | <b>53</b> |
| <b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>  | <b>59</b> |
| <b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>1. SUJETO DE ESTUDIO.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>1.1. Procedencia.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>1.2. Información recogida.....</b>  | <b>65</b> |
| 1.2.1. Información clínica.....  | 66        |
| 1.2.2. Información familiar.....   | 67        |
| <b>2. MUESTRAS.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>2.1. Líquidos biológicos.....</b>   | <b>68</b> |
| 2.1.1. Sangre periférica.....  | 68        |
| 2.1.1.1. Extracción manual.....  | 69        |
| 2.1.1.2. Extracción automática.....  | 70        |
| <b>2.2. Tejido incluido en parafina.....</b>   | <b>71</b> |
| 2.2.1. Tinción hematoxilina-eosina.....  | 72        |
| 2.2.2. Extracción de ADN.....  | 72        |
| <b>3. VALORACIÓN DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN.....</b>   | <b>74</b> |
| <b>4. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TEJIDO NORMAL.....</b>   | <b>76</b> |
| <b>4.1. Panel de Bethesda.....</b>   | <b>76</b> |
| <b>5. ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES DE REPARACIÓN DE LOS ERRORES DE EMPAREJAMIENTO DEL ADN (MLH1, MSH2 Y MSH6).....</b> | <b>80</b> |
| <b>5.1. Análisis de mutaciones en MLH1 y MSH2.....</b>   | <b>80</b> |
| <b>5.2. Análisis de grandes deleciones genómicas.....</b>  | <b>84</b> |
| <b>5.3. MSH6.....</b>  | <b>88</b> |
| 5.3.1. Amplificación de los exones y regiones intrónicas adyacentes.....   | 88        |
| 5.3.2. Cromatografía líquida de alto rendimiento (dHPLC).....  | 91        |
| 5.3.3. Secuenciación.....  | 94        |
| <b>5.4. Estudio de hipermetilación del promotor del gen MLH1.....</b>  | <b>95</b> |
| 5.4.1. Controles.....  | 95        |

|   |     |
|---|-----|
| 5.4.2. <u>Modificación con bisulfito sódico</u> .....   | 96  |
| 5.4.3. <u>PCR específicas de presencia y ausencia de metilación</u> .....   | 98  |
| 5.4.4. <u>PCR independiente del estado de metilación</u> .....  | 100 |
| 5.4.4.1. <i>Digestión con enzima de restricción BstUI</i> .....   | 101 |
| 5.4.4.2. <i>Secuenciación</i> .....   | 103 |
| 6. <b>INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS DEL SISTEMA DE REPARACIÓN: Mlh1, Msh2, Msh6</b> .....                     | 103 |
| 7. <b>ANÁLISIS DEL FENOTIPO METILADOR DE ISLOTES CpG</b> .....  | 105 |
| 8. <b>ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA MEDIANTE ARRAYS DE CGH (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDISATION)</b> ..... | 106 |
| <b>8.1. Cuantificación de ADN</b> .....   | 106 |
| <b>8.2. Hibridación genómica comparada mediante array</b> .....   | 107 |
| 9. <b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</b> .....   | 108 |
| <b>IV. RESULTADOS</b> .....   | 111 |
| 1. <b>RESULTADOS GLOBALES</b> .....   | 111 |
| <b>1.1. Características anatómo-clínicas</b> .....  | 111 |
| <b>1.2. Características familiares</b> .....  | 118 |
| <b>1.3. Características moleculares</b> .....   | 120 |
| <u>1.3.1. Vía mutadora o de Inestabilidad de microsatélites</u> .....   | 120 |
| 1.3.1.1. <i>Inestabilidad de microsatélites</i> .....   | 120 |
| 1.3.1.2. <i>Análisis inmunohistoquímico de las Proteínas del sistema de reparación</i> .....                        | 121 |
| 1.3.1.3. <i>Análisis genético</i> .....   | 122 |
| <u>1.3.2. Vía serrada o Fenotipo metilador</u> .....  | 123 |
| <u>1.3.3. Vía supresora o Inestabilidad cromosómica</u> .....   | 124 |
| 2. <b>ESTUDIO COMPARATIVO</b> .....   | 124 |
| <b>2.1. Estudio comparativo de la vía supresora. Tumores estables (EMS) e inestables (IMS)</b> .....                | 124 |
| <u>2.1.1. Características anatómo-clínicas</u> .....  | 124 |
| <u>2.1.2. Características familiares</u> .....  | 128 |
| <u>2.1.3. Características moleculares</u> .....   | 132 |
| 2.1.3.1. <i>Análisis de las proteínas del sistema de reparación</i> .....   | 132 |
| 2.1.3.2. <i>Análisis de la metilación de islas de CpG</i> .....   | 133 |
| <b>2.2. Estudio comparativo de la vía serrada o Fenotipo Metilador</b> .....  | 133 |
| <u>2.2.1. Características anatómo-clínicas</u> .....  | 134 |
| <u>2.2.2. Características familiares</u> .....  | 134 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>2.3. Estudio comparativo de la vía mutadora o inestabilidad de microsatélites. Tumores con Inestabilidad de microsatélites, Inestabilidad de cromosomas y MACS.</b> ..... | 136 |
| <u>2.3.1. Características anatómo-clínicas.</u> .....  | 136 |
| <u>2.3.2. Características familiares.</u> .....  | 140 |
| <u>2.3.3. Características moleculares.</u> .....   | 140 |
| <b>3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR.</b> .....   | 141 |
| <b>4. ESTUDIO COMPARATIVO DEL CCR DE APARICIÓN PRECOZ SEGÚN SU LOCALIZACIÓN EN EL COLON.</b> .....   | 144 |
| <b>4.1. Características anatomoclínicas.</b> .....   | 144 |
| <b>4.2. Características familiares.</b> .....  | 146 |
| <b>4.3. Características moleculares.</b> .....   | 147 |
| <u>4.3.1. Inestabilidad de Microsatélites.</u> .....   | 147 |
| <u>4.3.2. Análisis de la metilación de islas de CpG.</u> .....   | 147 |
| <u>4.3.3. Análisis de la inestabilidad cromosómica.</u> .....  | 148 |
| <b>V. DISCUSIÓN.</b> .....   | 153 |
| <b>1. EL CÁNCER COLORRECTAL EN EL ADULTO JOVEN.</b> .....  | 153 |
| <b>2. CARACTERÍSTICAS GLOBALES DEL CCR EN MENORES DE 45 AÑOS.</b> ...  | 155 |
| <b>2.1. Características anatómo-clínicas.</b> .....  | 155 |
| <b>2.2. Características familiares.</b> .....  | 162 |
| <b>2.3. Características moleculares</b> .....  | 166 |
| <u>2.3.1. Vía mutadora o de Inestabilidad de microsatélites.</u> .....   | 166 |
| <i>2.3.1.1. Inestabilidad de microsatélites.</i> .....   | 166 |
| <i>2.3.1.2. Análisis inmunohistoquímico de las Proteínas del sistema de reparación.</i> ....   | 168 |
| <i>2.3.1.3. Análisis genético.</i> .....   | 169 |
| <u>2.3.2. Vía serrada o Fenotipo metilador.</u> .....  | 170 |
| <u>2.3.3. Vía supresora o Inestabilidad cromosómica.</u> .....   | 172 |
| <b>3. ESTUDIO COMPARATIVO</b> .....  | 173 |
| <b>3.1. Estudio comparativo de la vía mutadora. Tumores estables (EMS) e inestables (IMS).</b> .....   | 173 |
| <u>3.1.1. Características anatómo-clínicas.</u> .....  | 174 |
| <u>3.1.2. Características familiares.</u> .....  | 176 |
| <u>3.1.3. Características moleculares.</u> .....   | 177 |
| <b>3.2. Estudio comparativo de la vía serrada o Fenotipo Metilador.</b> .....  | 178 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>3.3. Estudio comparativo de la vía mutadora o inestabilidad de microsatélites. Tumores con Inestabilidad de microsatélites, Inestabilidad de cromosomas y MACS.</b> ..... | 179 |
| <u>3.3.1. Características anatómo-clínicas.</u> .....  | 179 |
| <u>3.3.2. Características familiares.</u> .....  | 183 |
| <u>3.3.3 Características moleculares.</u> .....  | 184 |
| <b>4. CLASIFICACIÓN MOLECULAR.</b> .....   | 185 |
| <b>5. ESTUDIO COMPARATIVO DEL CCR DE APARICIÓN PRECOZ SEGÚN SU LOCALIZACIÓN EN EL COLON.</b> .....   | 187 |
| <u>5.1. Características anatómo-clínicas.</u> .....  | 188 |
| <u>5.2. Características familiares.</u> .....  | 190 |
| <u>5.3. Características moleculares.</u> .....   | 191 |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b> .....  | 195 |
| <b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....   | 201 |
| <b>ANEXO</b> .....   | 221 |
| <b>ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO.</b> .....  | 221 |
| <b>ANEXO 2. PUBLICACIONES.</b> .....   | 227 |



## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis:

Al Dr. 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 despertar mi interés por la investigación, por su infinita paciencia y ayuda. Por su entusiasmo y dedicación en la dirección de este proyecto.

Al Dr. Felipe de la Cruz Vigo, Jefe de Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo “A” del Hospital Universitario 12 de Octubre y Profesor Titular de Cirugía, Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por sus recomendaciones y buenos consejos. Gracias por el apoyo e interés mostrado en el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al Dr. Miguel Urioste, Jefe de la Unidad Clínica de Cáncer Familiar en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, por su orientación y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

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 los cirujanos del Servicio de Cirugía general y Aparato digestivo del Hospital Universitario 12 de octubre, por preocuparse en mi formación, enseñarme la elegancia de la cirugía. Por su confianza y por caminar a mi lado en mis primeros pasos en la profesión.

A mis compañeros y a mis amigos, por su cariño, paciencia y comprensión durante estos años de estudio y trabajo.

Y especialmente agradecer a mis padres, mi hermano y mi abuela Emilia, el apoyo recibido y sus constantes palabras de ánimo. Sin vuestra ayuda nada de lo logrado hubiera sido posible. Gracias por recordarme que con voluntad, esfuerzo e ilusión se alcanzan todas las metas.





**ABREVIATURAS**

- **A:** Adenosina
- **AAS:** Acido Acetilsalicílico.
- **AAP:** Amputación abdominoperineal.
- **A-C:** clasificación de la estadificación tumoral de Astler-Coller.
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AINES:** Antiinflamatorios No Esteroides.
- **AJCC:** Comité Americano Conjunto del Cáncer. *American Joint Committee on Cancer.*
- **APC:** Gen causal de la poliposis adenomatosa familiar. *Adenomatous Polyposis Coli.*
- **ASCO:** American Society of Clinical Oncology.
- **C:** Citosina.
- **°C:** grados Celsius.
- **cc:** centímetro cúbico.
- **CCR:** cáncer colorrectal.
- **CEA:** Antígeno Carcinoembrionario.
- **CGH array:** Hibridación Genómica Comparada.
- **cm:** Centímetro.
- **CNIO:** Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.
- **DCC:** gen Delecionado en Cáncer de Colon.
- **DE:** Desviación estándar.
- **dHPLC** Cromatografía líquida de alto rendimiento. *Denaturing high performance liquid chromatography.*
- **Dr.:** Doctor.
- **Dra.:** Doctora.
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- **EEUU:** Estados Unidos de América
- **EMS:** Estabilidad de microsatélites.
- **ESMO:** European Society of Medical Oncology.
- **FM:** Fenotipo Metilador.
- **G:** Guanina.
- **HE:** Hematoxilina-eosina.
- **HNPPC:** Cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP). *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer.*
- **IHQ:** Inmunohistoquímica.
- **INC:** Inestabilidad Cromosómica.
- **IMS:** Inestabilidad de microsatélites.
- **LV:** Leucovorín.

- **LOH:** Loss of Heterozygosity.
- **M:** Molar.
- **mA:** miliamperios
- **MACS:** microsatellite and chromosomal stable sporadic colorrectal cancer.
- **mg:** miligramos
- **mM:** Milimolar.
- **ml:** Mililitro.
- **MLPA:** PCR *multiplex* dependiente de ligación. *Multiplex ligation-dependent probe amplification.*
- **MMR:** Reparación de los errores de emparejamiento. *Mismatch Repair.*
- **μl:** Microlitro.
- **μm:** micrómetros.
- **N:** número de casos.
- **ng:** Nanogramo.
- **nm:** Nanómetro.
- **NS:** No estadísticamente significativo.
- **ORL:** Otorrinolaringología
- **PAF:** Poliposis Adenomatosa Familiar.
- **PAFA:** Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada.
- **pb:** Pares de bases.
- **PBS:** Tampón fosfato salino. *Phosphate Buffered Saline.*
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa. *Polymerase chain reaction.*
- **PET:** Tomografía por Emisión de Positrones.
- **PH:** Pólipo Hiperplásico.
- **RNM:** Resonancia Nuclear Magnética.
- **rpm:** Revoluciones por minuto.
- **RTx:** Radiografía de tórax.
- **SEER:** Surveillance, Epidemiology and End Results.
- **SL:** Síndrome de Lynch
- **SLE:** Supervivencia Libre de Enfermedad.
- **SNC:** Sistema nervioso central.
- **SOH:** Sangre Oculta en Heces.
- **SOHi:** Sangre Oculta en Heces ( inmunohistoquímica)
- **ST:** supervivencia Total.
- **T:** Timina.
- **TAC:** Tomografía Axial Computerizada.
- **TBE:** Tris, ácido bórico y EDTA.
- **TE:** Tris-EDTA.
- **TEAA:** Acetato de trietilamonio.

- **TEMS**: cirugía microscópica endoscópica transanal.
- **U**: Uracilo.
- **UE**: Unión Europea.
- **UV**: ultravioleta.
- **5-FU**: 5-Fluorouracilo.
- $\chi^2$ : Chi cuadrado de Pearson



## RELACIÓN DE TABLAS

|   |       |
|---|-------|
| <b>Tabla I.1.</b> Diferencias entre la secuencia adenoma- carcinoma convencional y la teoría adenoma serrado-carcinoma.   | p.14  |
| <b>Tabla I.2.</b> Características diferenciadores entre los CCR que presentan inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites y fenotipo metilador.  | p.15  |
| <b>Tabla I.3.</b> Clasificación anatomopatológica y características clínicas de las lesiones serradas en el colon.  | p.20  |
| <b>Tabla I.4:</b> Clasificaciones por estadios para el CCR  | p.30  |
| <b>Tabla I.5.</b> Protocolo de seguimiento del CCR.   | p.42. |
| <b>Tabla III.1.</b> 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).  | p.77  |
| <b>Tabla III.2.</b> 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.                                      | p.81  |
| <b>Tabla III.3.</b> Estudio de mutaciones del gen MSH2. Cebadores empleados para la amplificación de los exones y regiones intrónicas adyacentes, tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases y condiciones desnaturalizantes de los geles.                                       | p.82  |
| <b>Tabla III.4.</b> Sondas utilizadas en el producto comercial de MLPA SALSA P003 MLH1/MSH2, para la detección de grandes reordenamientos de los genes MLH1 y MSH2.   | p.85  |
| <b>Tabla III 5.</b> 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.   | p.91  |
| <b>Tabla IV.1.</b> Edad media al diagnóstico del CCR y distribución de sexos.   | p.112 |
| <b>Tabla IV.2.</b> Localización del CCR y técnicas quirúrgicas utilizadas.  | p.113 |
| <b>Tabla IV.3.</b> Características histológicas de los CCR.   | p.114 |
| <b>Tabla IV.4.</b> Estadificación tumoral. Afectación ganglionar y a distancia.   | p.114 |
| <b>Tabla IV.5.</b> Seguimiento de los pacientes: supervivencia, recidiva tumoral, tipo de recidiva, localización de la metástasis y mortalidad global.  | p.116 |
| <b>Tabla IV.6.</b> Tabla resumen de las características generales y anatómo-clínicas.   | p.118 |
| <b>Tabla IV.7.</b> Relación de los diferentes tumores relacionados con el síndrome de Lynch, y su frecuencia de aparición en las diferentes familias. No se incluyen los CCR de los probandi. El porcentaje se refiere al número de familias con dicho tumor respecto al total de cada grupo. | p.119 |
| <b>Tabla IV.8.</b> Relación de los diferentes tumores no asociados con el síndrome de Lynch, y su distribución en los diferentes tipos de familias. El porcentaje se refiere al número de familias con dicho tumor respecto al total de cada grupo.   | p.120 |
| <b>Tabla IV.9.</b> Distribución de los pacientes según la presencia de inestabilidad de microsatélites en el CCR.   | p.121 |

|   |       |
|---|-------|
| <b>Tabla IV.10.</b> Resultados del análisis inmunohistoquímico de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento.                                 | p.121 |
| <b>Tabla IV.11.</b> Resultados del estudio genético en los pacientes con tumores IMS.   | p.122 |
| <b>Tabla IV.12.</b> Mutaciones identificadas en los genes MMR.  | p.123 |
| <b>Tabla IV.13.</b> Edad media al diagnóstico del CCR y distribución por sexos.   | p.125 |
| <b>Tabla IV.14.</b> Localización del CCR e intención quirúrgica en los tumores IMS y EMS.   | p.125 |
| <b>Tabla IV.15.</b> Comparación de las características histopatológicas de los IMS y EMS.   | p.126 |
| <b>Tabla IV.16.</b> Estadificación tumoral de los tumores IMS y EMS.  | p.127 |
| <b>Tabla IV.17.</b> Seguimiento de los pacientes: Supervivencia, mortalidad, recidiva y tipo de recidiva.   | p.128 |
| <b>Tabla IV.18.</b> Antecedentes oncológicos familiares de los tumores IMS y EMS.   | p.129 |
| <b>Tabla IV.19.</b> Relación de los tumores relacionados con el síndrome de Lynch aparecidos en familiares de los probandi con tumores IMS y EMS.                           | p.130 |
| <b>Tabla IV.20.</b> Relación de los tumores no asociados con el síndrome de Lynch que presentaron los familiares de los probandi con tumores IMS y EMS.                     | p.130 |
| <b>Tabla IV.21.</b> Resumen de los datos anatómo-clínicos y familiares en los grupos IMS y EMS.   | p.131 |
| <b>Tabla IV.22.</b> Resultados del análisis de la expresión inmunohistoquímica de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento (proteínas MMR). | p.132 |
| <b>Tabla IV.23.</b> Resultados del análisis de la metilación de islas de CpG.   | p.135 |
| <b>Tabla IV. 24.</b> Edad y distribución por sexo.  | p.137 |
| <b>Tabla IV.25.</b> Distribución por localización del CCR e intención de la cirugía.  | p.137 |
| <b>Tabla IV.26.</b> Características histológicas.   | p.138 |
| <b>Tabla IV.27.</b> Estadificación tumoral.   | p.139 |
| <b>Tabla IV.28.</b> SLE, ST y Mortalidad.   | p.139 |
| <b>Tabla IV.29.</b> Características familiares.   | p.140 |
| <b>Tabla IV. 30.</b> Comparación de las características moleculares (análisis del estado de metilación de islas de CpG.)  | p.141 |
| <b>Tabla IV.31.</b> Resumen datos anatómo-clínicos y familiares según la clasificación molecular.   | p.143 |
| <b>Tabla IV.32.</b> Comparación de las características histopatológicas según la localización tumoral.  | p.145 |
| <b>Tabla IV.33.</b> Comparación de estadificación tumoral, ST, SLE y mortalidad según la localización tumoral.  | p.146 |
| <b>Tabla IV. 34.</b> Comparación de las características familiares en función de la localización tumoral.   | p.147 |
| <b>Tabla. IV. 35.</b> Diferencias en la clasificación molecular según la localización tumoral   | p.148 |
| <b>Tabla IV. 36.</b> Características principales de los CCR en función de su localización en el colon.  | p.149 |

## RELACIÓN DE FIGURAS

- Figura I.1.** Secuencia adenoma- carcinoma. Principales procesos moleculares que intervienen en la carcinogénesis. p.5
- Figura I.2.** Representación de los diferentes grupos de CCR según las distintas vías de carcinogénesis, así como los correspondientes solapamientos. p.6
- Figura I.3.** Incidencia específica por edad de CRC entre los años 2002- 2006 en hombres y mujeres de todas las razas. p.7
- Figura I.4.** Cáncer más frecuente en Europa en 2008.Hombres. p.8
- Figura I.5.** Cáncer más frecuente en Europa en 2008.Mujeres. p.8
- Figura I.6.** Incidencia y mortalidad para el cáncer colorrectal. Estimación 1981-2012.Tasa en hombres y mujeres ajustada por edad (pobl.UE)/100.000 personas-año. p.9
- Figura I.7.** Esquema simplificado de la secuencia adenoma-carcinoma y de la acumulación de mutaciones más importantes. En negro las relaciones con la inestabilidad cromosómica y en rosa con la inestabilidad de microsatélites. p.15
- Figura I.8.** Imágenes de colonoscopia de lesiones seradas sesiles. (Las fechas indican la lesión). p.20
- Figura I.9.** Clasificación para pólipos con cáncer invasor propuesta por Haggitt. Nivel 0: confinado a la mucosa del pólipo. Nivel 1: invade la submucosa de la cabeza del pólipo. Nivel 2: invade la submucosa del cuello del pólipo. Nivel 3: invade la submucosa del tallo del pólipo. Nivel 4: invade la submucosa de la pared del colon. p.21
- Figura I.10.** Estadificación sucesiva mediante ecografía endorrectal preoperatoria de diferentes cánceres de recto según el crecimiento en el espesor de la pared, desde uT0 hasta uT4, en que hay infiltración prostática. p.25
- Figura I.11.** Cáncer colorrectal: Sistemas de estadificación. (Imagen tomada de <http://www.cirugest.com/htm/revisiones/cir15-14/15-14-08.pdf>) p.28
- Figura I.12.** Clasificación por estadios del CCR según la afectación de la pared del colon; ganglios y órganos a distancia. p.31
- Figura I.13.** Pieza quirúrgica de una resección anterior baja. Se muestra consideraciones especiales de la cirugía del cáncer de recto como la escisión del mesorrecto. p.36
- Figura III.1.** Resultado de la amplificación del ADN normal (A) y de un tumor (B) que muestra IMS en todos los marcadores microsatélites analizados. p.79
- Figura III.2.** 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 detrietilamonio y posteriormente los fragmentos de ADN. La columna se encuentra incluida en un horno que permite trabajar en condiciones desnaturalizantes p.93
- Figura III.3.** 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. p.94
- Figura III.4.** 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 p.102

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

p.112

**RESUMEN**

El cáncer colorrectal (CCR) es un tumor de gran impacto en la población mundial. Se estima una incidencia de 1,2 millones de casos nuevos por año y se considera la tercera neoplasia más común y la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados. El CCR de aparición precoz tiene una incidencia de 2-8% de todos los CCR. Sin embargo, cada vez es mayor, aumentando la tasa de incidencia en 1,5 % por año en el hombre y 1,6% en la mujer.

El modelo clásico de carcinogénesis de la secuencia adenoma-carcinoma ha ido evolucionando. Cada vez con mayor frecuencia se describe al CCR según su fenotipo basado en las características moleculares. Hasta el momento se han descrito tres vías principales implicadas en la producción y desarrollo del CCR: la inestabilidad cromosómica (INC) o vía supresora, la inestabilidad de microsatélites (IMS) o vía mutadora, o la vía del Fenotipo Metilador de islas de CPG. Cada una de ellas muestra diferencias desde el punto de vista clinicopatológico, familiar y pronóstico. Pueden solaparse entre sí, aunque el mecanismo dominante es lo que determina el fenotipo final.

La mayor parte de los CCR esporádico (80-85%) siguen la vía de la INC, que se caracteriza por la aneuploidía y la alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad (LOH, *Loss of Heterozygosity*). También aquellos casos de Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) con mutaciones a nivel germinal del gen *APC*. Este tipo de tumores también se denominan Tumores con Estabilidad de microsatélites (EMS). Los tumores con IMS representan el 10-15% de todos los CCR y se pueden producir de dos formas diferentes: en las formas hereditarias como el Síndrome de Lynch (SL), cuya base molecular son

mutaciones a nivel germinal; y en casos esporádicos, en los que el mecanismo de IMS es debido a la hipermetilación de *MLH1*. Este tipo de tumores se caracterizan por mayor preferencia por el colon derecho, mayor producción de mucina, presencia de células en anillo de sello y bajo grado diferenciación tumoral. El FM o vía serrada es la vía de más reciente identificación y ocurre aproximadamente en el 35 % de los CCR. En los tumores con FM alto se pueden identificar ciertas características diferenciadoras. Parece que son mas frecuentes en las mujeres, se localizan principalmente en el colon proximal y son tumores pobremente diferenciados. Desde el punto de vista molecular, presentan mayor tasa de mutación del gen *BRAF*, y menor de *P53*.

Como se ha señalado previamente, las vías de carcinogénesis no son mutuamente excluyentes, si no que existen solapamientos entre ellas. La clasificación del CCR según sus alteraciones genéticas y/o epigenéticas tiene importancia a la hora de estudiar su correlación con las bases moleculares del CCR, el resultado de los pacientes, así como permitir la individualización del tratamiento. Por este motivo, en base a las tres principales vías de carcinogénesis colorrectal, se puede clasificar el CCR en cuatro grupos según el estado de IMS y FM, encontrando una correlación con ciertas características anatomo-patológicas y moleculares.

El CCR de aparición precoz es un grupo heterogéneo, que incluye desde casos con un importante componente familiar hasta otros que son esporádicos. Debido a la edad de aparición precoz, en principio varios trabajos se centraron en el estudio del componente hereditario en este subgrupo de CCR. Sin embargo, hoy en día se sabe que las formas hereditarias de CCR explican un pequeño porcentaje de casos en la población joven. Las diferentes alteraciones moleculares parecen contribuir en la aparente

heterogenicidad del CCR en la población joven y se pueden diferenciar distintos subgrupos con distintas características histopatológicas y familiares.

Desde el punto de vista molecular, se han descrito dos grupos de este tipo de neoplasias. Por un lado, los tumores con IMS, que presentan mayor componente hereditario y se caracterizan por presentar características clínicas y patológicas similares a las descritas para el SL. Por otro lado, los tumores con EMS, que se caracterizan por una edad más tardía de inicio, menor predominio por colon derecho y menor porcentaje de CCRs sincrónicos y metacrónicos, así como un diagnóstico en estadios extremos. Dentro de los tumores con EMS, recientemente se ha identificado algunos tumores que debiendo presentar INC no lo hacen. Además no pertenecen estrictamente a la vía serrada. Este subgrupo de CCR ha sido definido por las siglas MACS (microsatellite and chromosomal stable sporadic colorectal cancer), y se identifica con más frecuencia en CCRs en jóvenes. Se caracteriza por presentar mayor predilección por el colon distal y recto y presentar características histológicas asociadas a peor pronóstico. Desde el punto de vista molecular, se conocen pocos datos de los MACS, aunque sin existir unanimidad, parece que los MACS se asocian con un perfil de metilación diferente en el pueden estar implicados genes poco habituales.

En resumen, el conocimiento sobre el CCR en la población joven aún no está claro, siendo necesaria la realización de estudios que permitan identificar las bases moleculares, así como su correlación fenotípica en este subgrupo de CCR.

El objetivo de nuestro trabajo es analizar desde el punto de vista anatomoclínico, familiar y molecular el CCR de aparición precoz. De acuerdo con las tres vías principales de carcinogénesis, se identifican, de una muestra de CCR de edad

mencionada, las características clínicas, anatómo-patológicas, familiares del CCR de aparición precoz, y posteriormente se analizan en dicho grupo las diferentes vías de carcinogénesis (INC, IMS y FM), comparando los diferentes grupos entre sí, así como los grupos resultantes para cada una de las vías. De igual forma se aplica la clasificación molecular para este grupo de población, así como se analizan los resultados según la localización del tumor en el colon.

El presente trabajo consiste en un estudio retrospectivo descriptivo de 88 pacientes consecutivos con diagnóstico de CCR a una edad igual o inferior a 45 años, durante los años 2002-2008. Se identifican las características anatómo-patológicas, familiares y moleculares y se comparan según criterios moleculares y de localización tumoral. Para ello, se realiza el análisis inmunohistoquímico (IHQ) para las proteínas del sistema de reparación de ADN y la inestabilidad de microsatélites (IMS) utilizando el panel de Bethesda, clasificando los casos como IMS o EMS. En los casos inestables se completa el estudio de los genes de reparación de errores de emparejamiento del ADN (MMR). Se estudian patrones de metilación de genes promotores en 68 pacientes del total, considerando que menos de dos genes metilados son FM cero, entre 2- 5 son FM bajo, y con más de 5 FM alto. Finalmente, en 59 casos del total, se analiza la inestabilidad cromosómica mediante técnica de CGH array. Se clasifican en cromosomas estables aquellos con menos de un 20% de segmentos alterados, definiendo como MACS aquellos con 1-4 cromosomas inestables (ganancias y/o pérdidas).

Del análisis global del CCR en jóvenes destacan las siguientes características: predominio de los hombres (60,2%), con importante proporción de tumores localizados en el colon izquierdo (43,2%) y con bajo grado de diferenciación (55,4%), pero con un

porcentaje de tumores productores de moco de 28%. El diagnóstico de la enfermedad se realiza en estadios iniciales en el 59% de los casos; y más de la mitad desarrollan pólipos en su evolución, siendo en el 55% adenomas. El 41,4% de los casos muestra agregación familiar de CCR o neoplasias asociadas al SL, y 16 casos cumplen criterios de Ámsterdam II. Desde el punto de vista molecular, el 14,81 % de los tumores presentó IMS, siendo el 83% de estos, consecuencia de mutaciones germinales en genes MMR. Respecto al estado de metilación, el 19,1% presentan FM alto, 41,7% FM bajo y 39,7% FM cero. Y en cuanto al estudio de la INC, destaca que el 57,6% de los tumores son MACS.

En el estudio comparativo según las vías de carcinogénesis se observan los siguientes resultados. Por un lado, los tumores con IMS se diferencian de los tumores con EMS en que son tumores que se diagnostican a una edad media más precoz (34 años), se distribuyen en el colon derecho e izquierdo, sin identificar ningún caso en recto y presentan con mayor porcentaje de alto grado de diferenciación. La presencia de células en anillo de sello, así como producción de mucina son características más frecuentes en los tumores con IMS sin alcanzar la significación estadística. Las neoplasias que presentan IMS se diagnostican en estadios iniciales en el 83,3%, siendo esta diferencia significativa. Los casos con SL predominan en los tumores con IMS y destaca la mayor presencia de agregación familiar de neoplasias asociadas con el SL. En la vía del FM, las principales características que diferencian los casos con FM alto respecto al resto fueron: la localización del tumor, con mayor predominio por el colon proximal (61,5%), mayor porcentaje de tumores con bajo grado de diferenciación (22,2%) y productores de mucina (44,4%), así como mayor frecuencia de pólipos de tipo mixto durante el seguimiento (77%). Otras características con tendencia a la

significación fueron la presencia de neoplasias primarias múltiples, y más casos de SL (30,8%). Destaca que el porcentaje mayor de agregación familiar para el CCR ocurre en los tumores que presentan FM cero (44%). Por otro lado, cuando se compara la vía de INC encontramos que las principales características que diferencian los tumores MACS respecto a los IMS e INC son: localización del tumor, con un predominio por el colon izquierdo (41,17%), mayor producción de tumores productores de mucina respecto a los INC, pero menor que en los IMS; y mayor afectación ganglionar y presencia de metástasis en el momento del diagnóstico, similar a los INC. La estadificación tumoral muestra diferencias significativas, con un predominio por los estadios iniciales. Los tumores MACS presentaron muy baja asociación con la vía fenotipo metilador (21%).

En cuanto a la clasificación molecular, las principales características diferenciales entre los cuatro grupos son: los tumores con IMS y FM alto se diagnostican a una edad media más precoz (29 años), se localizan en el colon derecho en el 75% de los casos y presentan mayor porcentaje de casos con SL. Los tumores con IMS y FM bajo/cero se diferencian por ser tumores con predilección por el colon izquierdo (66,7%), mayor porcentaje de tumores productores de mucina (66,7%) y células en anillo de sello (16,7%), y una importante agregación familiar con el SL. Respecto a los tumores con EMS, aquellos con FM alto se diagnostican a una edad media más avanzada (40,1 años) y se relacionan con casos esporádicos en un 56%. Destaca que el 56% se originan en el colon proximal, mientras que los que presentan FM bajo/cero presentan una mayor preferencia por el colon izquierdo y recto, estadios más avanzados (22,4%) y mayor frecuencia agregación familiar para el CCR (45%).

Finalmente, la comparación según criterios de localización muestra que los CCR localizados en el colon derecho asocian SL en un 28,6%, presentando antecedentes

familiares del mismo en un 73%. Asocian CCR sincrónico y/o metacrónico en un 27,3% y un mayor número de pólipos, diagnosticándose mas de la mitad en estadio II. La mitad expresan un FM alto y un tercio IMS. Los tumores localizados en el colon izquierdo escasamente asocian SL, igual que CCR sincrónico y/o metacrónico, ni tampoco FM alto e IMS solo en el 15%. El 66% se diagnostican es estadios precoces y el 60% son esporádicos. Los tumores localizados en el recto no asocian SL, ni FM alto, ninguno IMS y escasamente tumores sincrónicos y/o metacrónicos, igual que raramente pólipos en su evolución, el 36 % se diagnostican en estadio IV aunque más de la mitad tienen antecedentes familiares de neoplasias asociadas al SL. En relación al pronóstico, existen diferencias significativas en la mortalidad y supervivencia media total de los tumores derecho, izquierdos y de recto, siendo esta última de 95,4%, 68,4% y 53,5 % respectivamente.

Aunque el CCR de aparición precoz es un criterio de componente hereditario dentro del CCR, nuestros resultados muestran un importante porcentaje de casos con EMS, de igual forma que otro, igual de valorable, de MACS. Las características propias de estos grupos, en especial de componente familiar que muestran, hace necesaria la caracterización de sus bases moleculares. La visión integrada de las alteraciones moleculares, su correlación fenotípica, así como su importancia en la progresión y desarrollo tumoral, permitirán una mejor comprensión de la fisiopatología del CCR, identificar dianas terapéuticas y un manejo individualizado según el perfil molecular de cada CCR.



**SUMMARY**

Colorectal cancer (CRC) is a tumor of great impact on the world population. The estimated incidence is 1.2 million new cases per year. It is considered the third most common malignancy and the second leading cause of death in developed countries. Early-onset CRC has an incidence of 2-8% of all CRCs. Furthermore, there is an increasing incidence rate of 1.5% per year in men and 1.6% in women.

The classical model of carcinogenesis of adenoma-carcinoma sequence has evolved. Nowadays, CRC is often described according to the phenotype based on the molecular characteristics. So far, three main pathways involved, in the production and development of CRC have been described. These are: chromosomal instability (CIN) or suppressor pathway, microsatellite instability (MSI) or mutator pathway, and the third one, the pathway CpG island methylator phenotype (CIMP). Each one of the above referenced pathways show differences from the clinicopathologic, familial and prognostic point of view. That overlap each other, even though the dominant mechanism that determines the final phenotype.

The majority of sporadic CRC (80-85%) follows the CIN pathway, which is characterized by aneuploidy along with the high frequency of loss of heterozygosity (LOH). Also, cases of familial adenomatous polyposis (FAP) with germline mutations at the APC gene show CIN. These types of tumours are also called tumours with microsatellite stability (MSS). MSI tumours represent 10-15% of all CRCs and can be produced in two different ways: in the hereditary forms as Lynch syndrome (LS), which the molecular basis is a germline mutations, and other sporadic cases, in which the mechanism of IMS is due to hypermethylation of MLH1. Such tumours are

characterized by greater preference for the right colon, increased mucin production, presence of signet ring cells and low-grade tumor differentiation. The CIMP or serrated pathway is the most recently identified and occurs in approximately 35% of RCCs. In tumours with CIMP-High certain distinguishing characteristics can be identified. They appear to be more common in women, where they are mainly located in the proximal colon and are poorly differentiated tumours. From the molecular point of view, they have a higher rate of BRAF mutation, and less P53.

As previously mentioned, carcinogenesis pathways are not mutually exclusive, but rather there are overlaps between them. The classification of CRC according to their genetic and / or epigenetic profiles, is important when it comes to studying their correlation with the molecular basis of CRC, patient outcomes as well as allowing individualization of treatment. For this reason, based on the three main routes of colorectal carcinogenesis, the CRC can be classified into four groups according to the MSI and CIMP state, finding a correlation with certain anatomical and pathological features as well as molecular features.

Early-onset CRC is a heterogeneous group, that ranges from cases with significant familial component to others that are sporadic. Due to the early onset age historically several works were focused on the study of the hereditary component in this subset of CRC. However, nowadays it is known that hereditary forms of CRC account for a small percentage of cases in younger population. Different molecular alterations appear to contribute to the apparent heterogeneity of CRC in young people and, can distinguish different subgroups with different histopathological and familial characteristics.

From the molecular point of view, two groups have described this type of neoplasm. On one hand, there are tumours with MSI, which have higher hereditary component and are characterized by clinical and pathological features similar to those described for the SL. On the other hand, there are tumours with MSS, characterized by a later age of onset, lower predominance within right colon and lower percentage of synchronous and metachronous CCR. This case is diagnosed at late stages. Within tumors with MSS, there has recently been identified some that should have CIN but they do not have. In addition, they do not strictly belong to the serrated pathway. This subgroup of CCR has been defined as MACS (microsatellite and stable chromosomal sporadic colorectal cancer), and it is identified most frequently in young CCRs. It is characterized by greater predilection for the distal colon and rectum and it shows histological features associated with poor prognosis. From the molecular point of view, little is known of the MACS, but it seems that MACS are associated with different methylation profile that may be involved in the unusual genes.

In short, the knowledge of CRC in young people is not completely clear yet. Therefore it is necessary to conduct studies to identify the molecular basis and their phenotypic correlation in this subgroup of CRC.

The aim of our work is to analyse early-onset CRC from an anatomoclinical, family and molecular point of view. According to the three main routes of carcinogenesis, the clinical, anatomo-clinical, familial and molecular features are identified from a CRC sample of a specific age. These are correlated with the different routes of carcinogenesis (MSI, CIN and CIMP). Similarly we compared the features according to the locations of the tumours. Finally we characterize the CCR in this subset

of population by molecular classification, based on their state of instability and methylation.

This study is a retrospective analysis of 88 consecutive patients diagnosed with CRC at an age below 45 years, during the years 2002-2008. We identified both anatomo-clinical, and familial characteristics. To this end, Immunohistochemistry was performed for MMR proteins, and the MSI using the Bethesda panel, classifying cases as unstable MMR genes. We studied patterns CIMP in 68 patients of the total, considering that less than two methylated genes were CIMP-0; between 2-5, CIMP-low, and CIMP-High over 5. Finally, in 59 cases of the total, CIN was analysed by CGH-array technique. Stable chromosomes are classified into those with less than 20% of altered segments, and defined as those with 1-4 unstable chromosomes as MACS (gains and / or losses).

Global analysis of CRC in young MSI people includes the following characteristics: predominance of men (60.2%), with a significant proportion of tumours located in the left colon (43.2%) and low degree of differentiation tumours (55.4%), but with a percentage of mucus-producing tumours of 28%. Diagnosing the disease in early stages is performed in 59% of cases and more than half developed polyps in evolution, being at 55% adenomas. The 41.4% of the cases show familial aggregation for CRC or malignancies associated with LS, and 16 cases fulfilled the Amsterdam II criteria. From a molecular standpoint, the 14.81% of tumors presented MSI, and 83% of these were due to germline mutations in MMR genes. Regarding the methylation status, 19.1% have CIMP-high, CIMP-low 41.7% and 39.7% CIMP-0. And for the study of the CIN, highlights that 57.6% of tumors are MACS.

In the comparative study as carcinogenesis pathways the following results are worth underlining: On one hand, tumours with MSI differ from MSS tumours that are diagnosed earlier mean age (34 years), are distributed in the left and right colon, without identifying any straight case and present highest percentage of high degree of differentiation in the presence of signet ring cells and mucin production are features more common in tumours with MSI without reaching statistical significance. MSI presenting neoplasms are diagnosed at early stages in 83.3%. Cases with LS, predominate in MSI tumours and highlight the increased presence of familial aggregation of malignancies associated with SL. In CIMP pathway, the main features that differentiate CIMP-High cases were: the location of the tumour, with greater prevalence of proximal colon (61.5%), higher percentage of tumours with a low degree of differentiation (22.2%) and mucin-production (44.4%), and and increased frequency of mixed type polyps during follow-up (77%). Other important features were the presence of multiple primary neoplasms, and LS cases (30.8%). There is a high percentage of familial aggregation for CRC in tumours with CIMP-0 (44%).

Furthermore, when comparing the CIN, we found that the main features which distinguish tumours MACS regarding MSI and INC are tumour site, predominantly by the left colon (41.17%), increased mucin production tumours compared with the CIN subset, but lower than within MSI ones, greater nodal metastasis at the time of diagnosis, similar to the CIN. The tumour staging shows significant differences, with a predominance of the initial stages. MACS tumours showed very low association with CIMP (21%).

According to the molecular classification, the main differential characteristics between the four groups are: tumors with MSI-CIMP High are diagnosed at an earlier

mean-age (29 years), they are located in the right colon in 75% of the cases and have a higher percentage of cases with SL. Tumours with MSI and CIMP low/0 differentiated by tumours with a predilection for the left colon (66.7%), higher percentage of mucin-producing tumours (66.7%) and signet ring cells tumours (16.7%) , and a significant familial aggregation for SL. Regarding MSS tumours, those with CIMP- high are diagnosed at more advanced age of onset (40.1 years) and are associated with sporadic cases by 56%. Fifty-six percent of them originate in the proximal colon, whereas those with CIMP-Low-0 have a greater preference for the left colon and rectum, more advanced stages (22.4%) and more frequently familial aggregation for CRC (45%).

Finally, the comparison according to the location of tumours criteria shows that the CRC located in the right colon is associated with SL by 28.6%, with a family history of it by 73%. The comparison also shows that the CRC located in the right colon associates synchronous and / or metachronous CRC by 27.3%, along with an increased number of polyps. More than half were diagnosed at stage II; half on the sample demonstrated CIMP-High and a third of the sample shows MSI. Tumours in the left colon sparingly associate SL, as well as synchronous CCR and / or metachronous. They do not associate high CIMP either. The sample also demonstrated that only 15% do show MSI. 66% is diagnosed at early stages and 60% are sporadic. Tumours in the rectum do not associate with SL, or CIMP, and hardly show IMS or synchronous and / or metachronous CRC, 36% are diagnosed at stage IV but more than half have a family history of tumours associated with SL. According with prognosis, there are significant differences in mortality and overall survival average of right, left and rectum tumours, being the percentage 95.4%, 68.4% and 53.5% respectively.

Although early-onset RCC is a criterion for a CRC hereditary component, our results show a significant percentage of cases with MSS, the same way that other equally valuable fact for MACS. The characteristics of these groups, especially the family component, require the characterization of its molecular basis. Despite advances in the understanding of early onset CRC, the three carcinogenesis pathways have not been yet fully studied within this subgroup. The integrated view of the molecular alterations, the phenotypic correlation and its importance in tumor progression and development, will allow a better understanding of the physio-pathology of RCC, identifying therapeutic targets and individualized managements according to the molecular profile of each CRC.



# I. INTRODUCCIÓN

---



### I. INTRODUCCIÓN.

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

El cáncer se caracteriza por una proliferación excesiva y descontrolada de células formando un tumor o neoplasia y la adquisición por parte de éstas de la capacidad invasiva, lo que les permite emigrar desde su lugar de origen a otras partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Es una de las causas más frecuentes de mortalidad, ocupando el segundo lugar en los países desarrollados detrás de las enfermedades cardiovasculares.

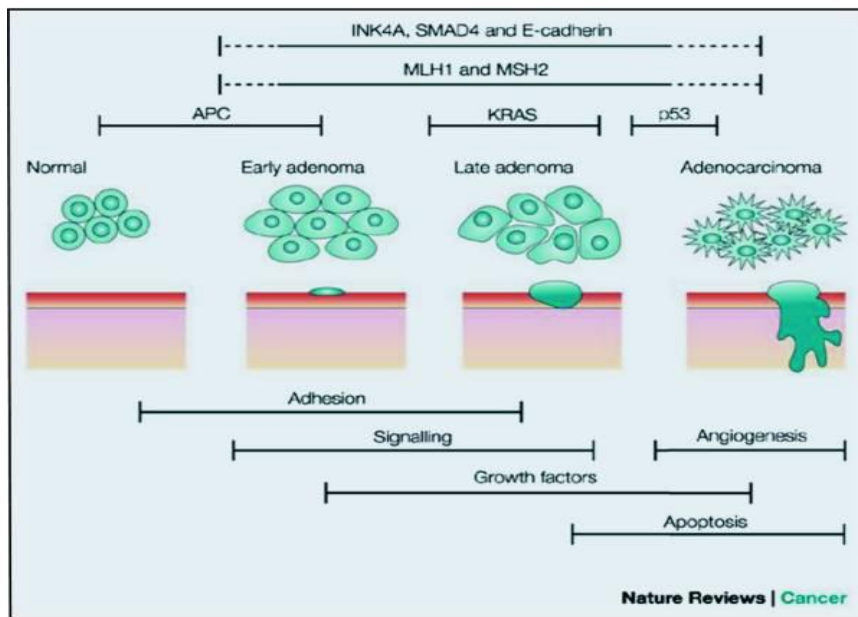
La carcinogénesis es un proceso complejo consecuencia de alteraciones moleculares (genéticas y epigenéticas), que determinan la transformación de una célula normal en una maligna, dando lugar a la gran heterogeneidad y variabilidad morfológica

y pronóstica de los tumores (Pharoah P y Caldas C 1999, Fukushima T 2001). El mayor conocimiento de las bases moleculares de la carcinogénesis tiene importantes implicaciones tanto en el pronóstico como en el tratamiento del cáncer.

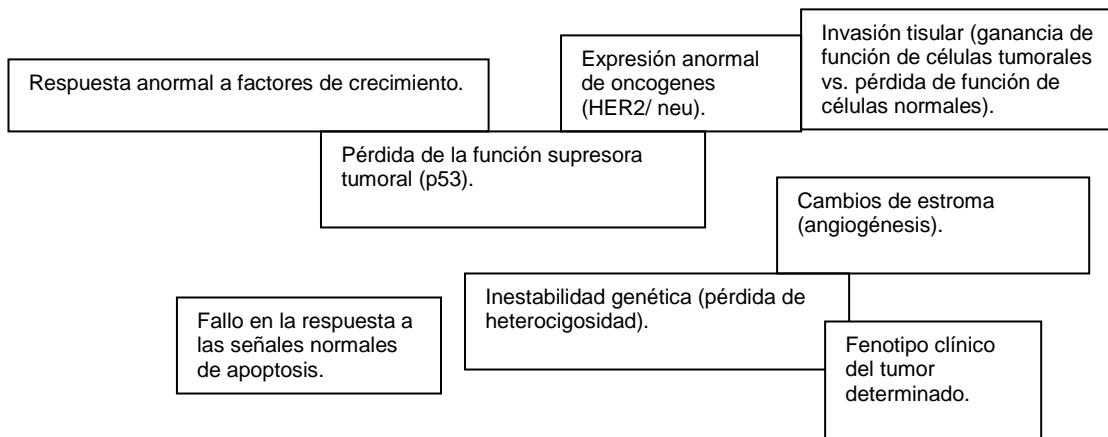
Desde una perspectiva general, la formación de un tumor es consecuencia de la inestabilidad genómica secundaria a la acumulación de múltiples alteraciones (Al-Sohaily S et al 2012). Las alteraciones genéticas o a nivel de la secuencia de ADN implican deleciones, amplificaciones, mutaciones génicas que pueden activar o inactiva distintas proteínas; e incluso pérdidas o ganancias de cromosomas enteros. Los cambios epigenéticos afectan, no a los propios genes, sino a la expresión de los mismos. En relación a estas alteraciones epigenéticas se encuentran, entre otros, el silenciamiento de genes debido a hipermetilación de las islas CpG localizadas en sus promotores, como en casos del gen *MLH1* o el gen *BRAF* (Snover DC. 2011 ).

En el caso particular del CCR, desde la formulación del modelo de carcinogénesis por Fearon y Vogelstein en 1990 (Fearon y Vogelstein 1990), hasta hoy, se han identificado tres grandes vías de carcinogénesis en el desarrollo del CCR: la vía supresora o de la inestabilidad cromosómica (INC), la vía mutadora o de la inestabilidad de microsatélites (IMS), y la vía metiladora o del Fenotipo Metilador de islas de 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 los cambios mutacionales, que darán el fenotipo final (Goel A et al. 2003).

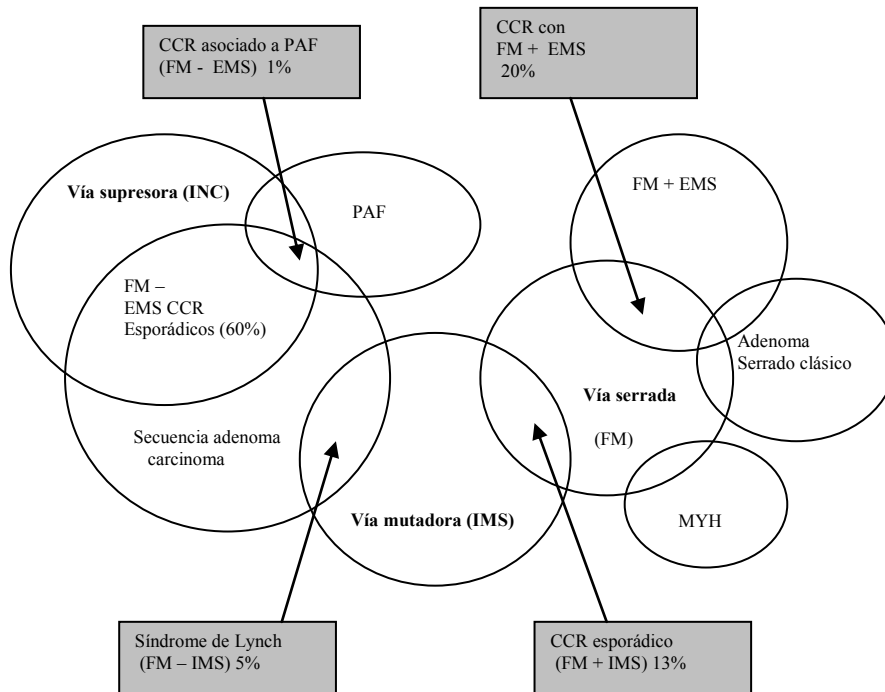
En la figura I.1 y I.2 se representan algunos de los mecanismos moleculares asociados a la formación y progresión tumoral; así como los diferentes grupos de CCR según las distintas vías de carcinogénesis y los correspondientes solapamientos.



Acumulación de cambios genéticos y epigénéticos



**Figura I.1.** Secuencia adenoma-carcinoma. Principales procesos moleculares que intervienen en la carcinogénesis (Armaghany T et al. 2012).



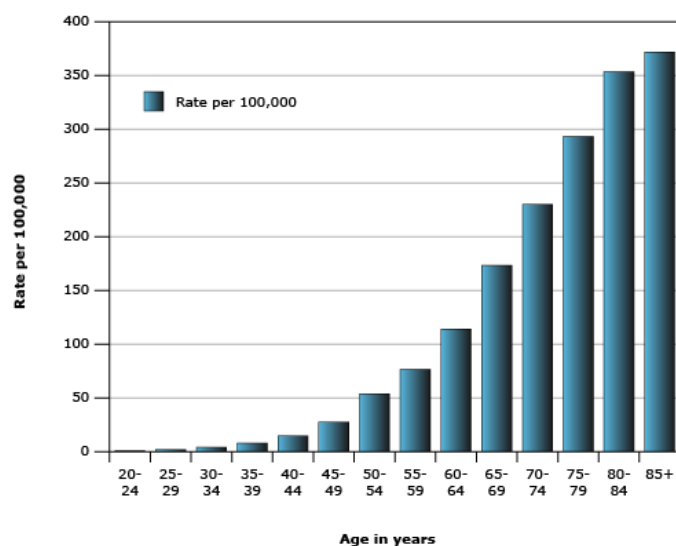
**Figura I.2:** Representación de los diferentes grupos de CCR según las distintas vías de carcinogénesis, así como los correspondientes solapamientos. Modificado de Snover DC, 2011.

La mayoría de los cánceres son esporádicos, como consecuencia de mutaciones a nivel somático. Sin embargo, entre un 5-10% de todos los cánceres tienen un componente hereditario cuyo origen son mutaciones germinales. Los síndromes de cáncer hereditario presentan una serie de características bien definidas, que les diferencian de los casos esporádicos, como son: edad de aparición temprana, multifocalidad de los tumores, antecedentes familiares de la misma neoplasia, etc. La identificación de las características mencionadas ha de servir para sospechar y remitir posibles casos de cáncer hereditario a un servicio de genética especializado en cáncer familiar.

## 2. EL CÁNCER COLORRECTAL. GENERALIDADES

### 2.1. Epidemiología.

El CCR es la tercera neoplasia más común y la segunda causa de mortalidad por cáncer en los países desarrollados. En el hombre ocupa el cuarto lugar en cuanto a frecuencia; mientras en la mujer es el tercer cáncer más diagnosticado. Su incidencia entre países oscila entre los 0,5 casos/ 100000 habitantes/año en la India hasta los 51,3 casos/100000 habitantes/año en Nueva Zelanda. Las diferencias geográficas se puedan atribuir a factores ambientales y culturales junto con una determinada susceptibilidad genética. El CCR afecta prácticamente igual a hombres y a mujeres. El riesgo de CCR aumenta con la edad. Es poco frecuente antes de los 40 años de edad, mientras que su incidencia comienza a aumentar de manera significativa a partir de entonces (Figura I.3)



**Figura I.3.** Incidencia específica por edad de CRC entre los años 2002-2006 en hombres y mujeres de todas las razas. Datos de: Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, 2002-2006.

Datos más recientes de la base de datos de Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) de los Estados Unidos y otros registros de cáncer occidentales sugieren

que las tasas de incidencia están aumentando en el grupo de edad de 40-44, mientras que están disminuyendo en los grupos de mayor edad (Davis DM et al.2011).

El riesgo acumulado de desarrollar CCR es de un 2-6% en la población general. Según los últimos datos registrados, en Estados Unidos, 1 de cada 20 serán diagnosticadas de CCR a lo largo de su vida. Este riesgo es mayor en personas con historia familiar de CCR, en especial en aquellos que forman parte de síndromes hereditarios (Pinol V et al. 2004).

A nivel mundial, se estima una incidencia de 1.2 millones de casos nuevos y 608.700 muertes durante el año 2008 (Jemal A et al 2011). En las Figuras I.4 y I.5, se presenta la incidencia en 2008, en Europa, de los distintos tipos de cáncer y la mortalidad estimada por cáncer, respectivamente. Los últimos datos publicados, recogen en Europa una incidencia de 1631000 en hombres y 1341000 en mujeres, ocupando el segundo lugar tanto en incidencia como en mortalidad por cáncer (Ferlay J et al 2010).

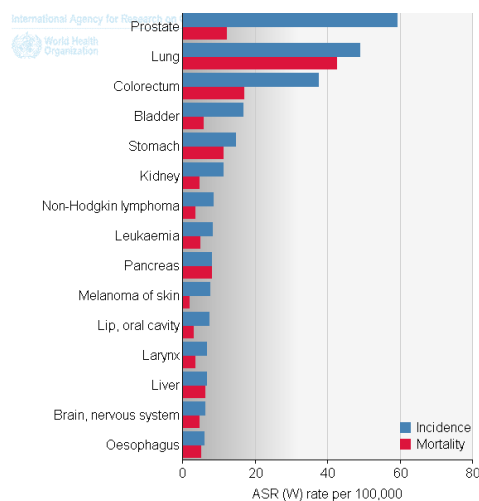


Fig I.4

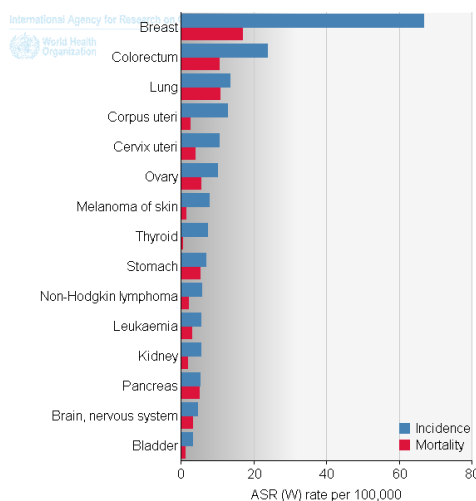


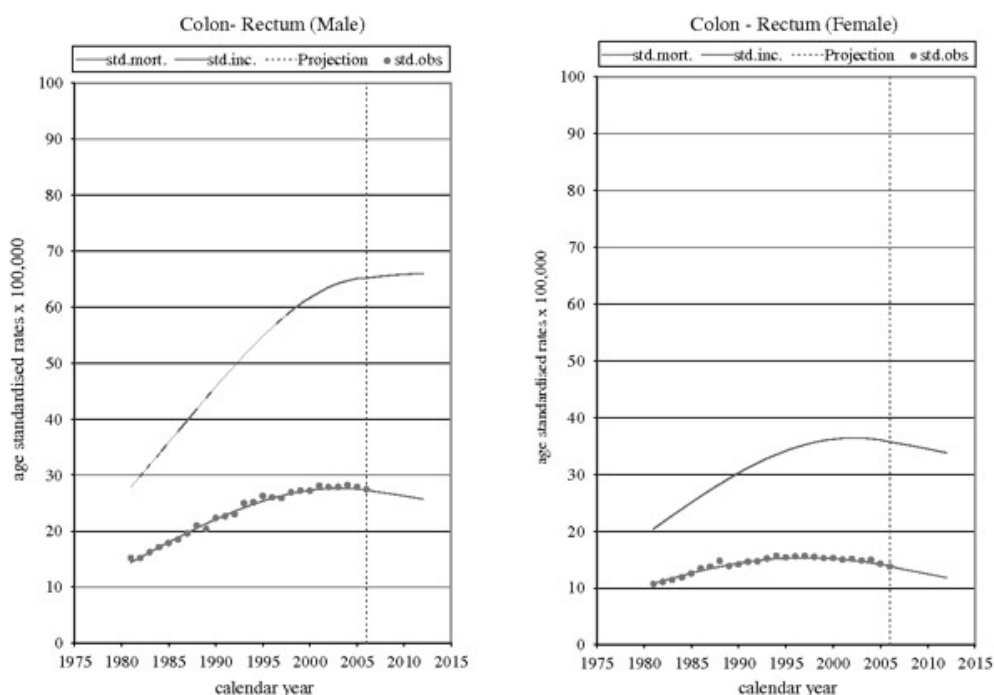
Fig.I.5

**Figura I.4:** Cánceres más frecuentes en hombres en Europa 2008 (Ferlay J et al. 2010)

**Figura I.5:** Cánceres más frecuentes en mujeres en Europa 2008 (Ferlay J et al. 2010)

En España, el CCR es el tumor más frecuente si consideramos ambos sexos de forma conjunta. En las estimaciones realizadas a partir de los datos de los distintos

registros existentes, se puede estimar que en el año 2012 se diagnosticarán 19.700 nuevos casos en hombres y 14.000 en mujeres. En comparación con otros países europeos, España ocupa una posición intermedia en cuanto a incidencia y mortalidad por CCR. La evolución de la incidencia, tras un periodo de incremento, es hacia la estabilización, hecho que sucede también con la mortalidad (López-Abente G et al. 2010). El progresivo envejecimiento de la población influye de forma muy marcada en la evolución del número de casos observados en este tumor (Sánchez MJ et al. 2010) (Figura I.6).



**Figura I.6:** Incidencia y mortalidad para el cáncer colorrectal. Estimación 1981-2012. Tasa en hombres y mujeres ajustada por edad/ 100000 personas-año (Sánchez MJ et al 2010)

El análisis de la supervivencia en los pacientes diagnosticados en el periodo de 2000-2002 a partir de los datos provenientes del estudio EURO CARE 4, muestra que la supervivencia media a los cinco años ajustada por edad para el CCR en España es del 61,5% situándose por encima de la media europea, que es del 56,2% (Castells y Marzo

2009). En la Unión Europea (UE) las tasas más bajas de mortalidad corresponden a Grecia, Finlandia, Suecia, Italia y España y las más altas a Dinamarca, Alemania, Irlanda y Austria.

En conclusión, el CCR seguirá siendo un tumor de gran impacto en la población mundial. Tanto la tasa de incidencia como la de mortalidad tienden hacia el descenso, aumentando la supervivencia, debido a una mejor prevención, con técnicas de diagnóstico precoz e identificación de grupos de alto riesgo para el CCR, y la mejora de las estrategias terapéuticas.

### **2.2. Etiología.**

El CCR es el resultado de la combinación de factores ambientales y genéticos. Las diferencias en la incidencia del CCR entre países, el incremento del número de casos de la enfermedad en inmigrantes de zonas de baja incidencia hacia otras donde es más alta, como consecuencia de la occidentalización de su estilo de vida, sugiere un impacto de factores ambientales.

Las personas con historia personal o familiar de CCR tienen mayor riesgo que la población general. En el caso de historia familiar, es más marcada la asociación en individuos que pertenecen a familias con síndromes hereditarios asociados al desarrollo de este tipo de neoplasias, como pueden ser la PAF, el SL, el síndrome de Peutz-Jeghers, o la Poliposis juvenil.

Dentro de los factores ambientales, poseen cierta relevancia los dietéticos. El colon es un órgano expuesto de forma constante a sustancias ingeridas o producidas por la digestión; sin embargo es difícil determinar con certeza cuáles son los componentes de la dieta que modifican el riesgo de CCR. El incremento de éste también

se asocia con el consumo de tabaco y alcohol, el escaso ejercicio físico y la obesidad, entre otros factores.

Sin embargo, los datos acerca de los factores ambientales como causa directa del CCR no tienen la suficiente consistencia como para fijar unas directrices claras sobre la prevención primaria del mismo. No obstante, se ha recomendado moderar el consumo de carne roja, procesada o cocinada muy hecha o en contacto con el fuego. Por otra parte, una dieta rica en leche y otros productos lácteos pueden servir para la prevención del CCR; y las dietas ricas en fibra, vegetales y fruta actúan en la misma dirección. Sin embargo, no ha sido confirmado en estudios prospectivos el efecto protector de la administración de folatos, calcio y vitamina D, ni tampoco betacarotenos, selenio, ni vitaminas A, B, C o E. En cuanto a los estilos de vida, se recomienda la realización de ejercicio físico, y evitar el sobrepeso y la obesidad, así como el consumo de alcohol y tabaco. Aunque es posible que los AINES, o la AAS a dosis baja, puedan contribuir a reducir el riesgo de CCR, la evidencia actual no apoya su uso como forma de prevención primaria del CCR (Lee JE et al. 2011, Renehan AG et al. 2008, Fedirko V et al. 2011, Melisa M et al. 2009)

La enfermedad inflamatoria intestinal en sus dos variantes, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, también aumentan el riesgo de desarrollar CCR. El riesgo aumenta con la duración (2% a los 10 años hasta 18% a los 30 años), con la severidad y con la extensión de la enfermedad (Cunningham D et al. 2010).

Los mecanismos que participan en el desarrollo y progresión del CCR son complejos. Sin embargo, en las últimas décadas se ha llevado a cabo un avance muy significativo en su conocimiento. Este avance engloba tanto la identificación de diversos factores genéticos o moleculares, como la caracterización de múltiples aspectos

epidemiológicos implicados en la fisiopatología de esta neoplasia (Castells A y Marzo 2009).

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

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

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

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

Las células madre o progenitores de las criptas se dividen a un ritmo muy alto, llegando a generar hasta 200 células al día. Al poseer un fenotipo indiferenciado, son

capaces de producir de forma continuada todas las estirpes celulares así como mantener la capacidad de regeneración del intestino ante una lesión.

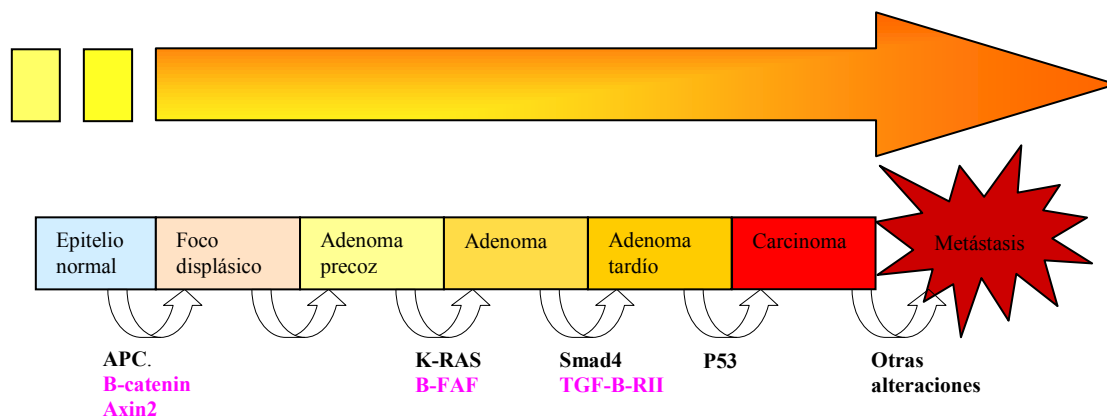
### 2.3.2 Mecanismo de generación del Cáncer Colorrectal.

El CCR es uno de los tumores más estudiados desde el punto de vista genético. Resulta de un proceso secuencial de alteraciones genéticas, que se acumulan a lo largo del tiempo, dando lugar tanto a la activación de oncogenes como a la inactivación de genes supresores de tumores, que generan cambios en la replicación de DNA y en el ciclo celular. La inestabilidad genética de la mucosa colorrectal da como resultado que ésta pase a hiperplasia, adenoma, carcinoma *in situ* y, finalmente, carcinoma invasor (Figura I.7.). La mayoría de los cánceres de colon surgen a partir de adenomas siguiendo el modelo de tumorigénesis que fue postulado por Fearon y Volgestein (Fearon y Volgestein 1990). Recientemente surgen los denominados adenomas serrados, previamente clasificados dentro de los pólipos hiperplásicos, pero con ciertas características histológicas y genéticas propias. Los adenomas serrados parece que se transforman en cáncer de colon siguiendo una vía distinta a la secuencia adenoma-carcinoma convencional, lo que les confiere una serie de características diferentes. En la tabla I.1 se muestran las diferencias entre las dos secuencias de carcinogénesis mencionadas (Cappell. 2008, Al-Sohaily S et al. 2012 ).

| Características                     | Secuencia adenoma- carcinoma                              | Teoría adenoma serrado- carcinoma       |
|-------------------------------------|---|---|
| Lesión precursora                   | Adenoma convencional                                      | Adenoma serrado                         |
| Localización                        | A lo largo de todo el colon                               | Predilección colon derecho              |
| Morfología                          | Pedunculado ( adenoma tubular)<br>Sesil (adenoma vellosa) | Sesil, plano                            |
| Displasia / transformación a cáncer | Menos frecuente   | Más frecuente                           |
| Alteración genética                 | Mutación gen <i>APC,p53</i>                               | Mutación gen <i>BRAF</i>                |
| Hipermetilación de DNA              | Infrecuente   | Frecuente                               |
| IMS                                 | Raro  | Típico ( inactivación de <i>hMLH1</i> ) |
| Síndromes genéticos relacionados    | Poliposis Adenomatosa Familiar                            | Poliposis hiperplásica                  |
| % de CCR esporádico                 | 85%   | 15%                                     |

**Tabla I.1:** Diferencias entre la secuencia adenoma-carcinoma convencional y la teoría adenoma serrado-carcinoma. Modificado de Cappell 2008.

Diferentes mutaciones genéticas se han relacionado con la carcinogénesis del CRC, pero la función exacta de muchos de estos genes en la iniciación y progresión de la enfermedad aún no se ha confirmado. Las alteraciones más contrastadas en el CCR son de dos tipos: la activación de oncogenes, como *K-RAS* y *c-MYC*, por una parte, y por otra, la inactivación de genes supresores del crecimiento tumoral, que se expresan mediante deleciones de los cromosomas 5q (donde está situado el gen *APC*), 18q (gen *DCC* o “deleciónado en cáncer de colon”) y 17q (donde se localiza el gen *p53*) (Lledó 2000, Morán A et al. 2010, Al-Sohaily S et al. 2012). El fallo del sistema de reparación de ADN (*genes-MMR*), también contribuye al desarrollo de tumores de colon. Las mutaciones en estos genes inducen a errores de replicación de ADN, originando lo que se conoce como IMS.



**Figura I.7:** Esquema simplificado de la secuencia adenoma-carcinoma y de la acumulación de mutaciones más importantes. En negro las relaciones con la inestabilidad cromosómica y en rosa con la inestabilidad de microsatélite Modificado de Morán A et al 2010.

Hasta el momento, se han descrito tres vías principales implicadas en la producción y progresión del CCR: la INC o vía supresora, la IMS o vía mutadora y la vía metiladora o del FM de islas de CpG. Cada una de ellas muestra diferencias, tanto desde el punto de vista molecular e histopatológico, como incluso del pronóstico, como se aprecia en la Tabla I.2. Puede haber solapamiento de las diferentes vías de carcinogénesis, sin embargo el mecanismo dominante será el que determine diferentes asociaciones clínicas, e incluso el tipo de lesión precursora.

| <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                                       |  |

**Tabla I.2:** Características diferenciadoras entre los CCR que presentan inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites y fenotipo metilador. Modificado de la Chapelle 2003.

La INC es la alteración más frecuente; se encuentra en la mayor parte de los casos de CCR esporádicos (80-85%), pero también en aquellos casos de PAF con mutaciones a nivel germinal del gen *APC*. Este tipo de tumores se caracterizan por el desequilibrio cromosómico (aneuploidía), con deleciones, amplificaciones y una alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad (LOH, *Loss of Heterozygosity*). Se produce una progresión predecible de cambios genéticos, con los correspondientes cambios histológicos. Los cambios genéticos incluyen la activación de pro-oncogenes, como *KRAS* y *c-myc*, y la inactivación de varios genes supresores de tumores, a saber, *APC*, *p53* y la pérdida de la heterocigosidad para el brazo largo del cromosoma 18 (*DCC*). Recientemente, se han descrito mutaciones en otros genes como *TGFBR* y *PIK3CA*, que están implicados en la secuencia adenoma-carcinoma (Armaghany T et al. 2012, Pino MS et al. 2010).

La IMS se debe a una alteración del sistema de reparación MMR. Éste se encarga de corregir los errores que se producen durante la replicación del ADN, y es controlado por varios genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, entre otros). La alteración del sistema conduce a la acumulación de alteraciones de los microsatélites, que están distribuidos por todo el genoma (Peltomaki P et al. 2003). Dentro de los genes que se ven implicados, se encuentran además, distintos genes supresores tumorales, como son *TGF-βRII*, *IGFIIR*, *MSH3* y *BAX* (Raut CP et al. 2004). Los tumores con IMS representan el 10-15% de todos los CCR, y es habitual en las formas hereditarias como el SL, cuya base molecular serían mutaciones a nivel germinal. Mientras, en los casos esporádicos, el mecanismo de IMS sería debido a la hipermetilación a nivel de la región promotora de cualquiera de los genes relacionados con el sistema de reparación del ADN (Grady WM 2004).

El FM o vía serrada es la vía de carcinogénesis de más reciente identificación, y se caracteriza por la metilación de islas *CpG* promotoras de genes supresores de tumores. Los tumores que surgen de esta vía representan aproximadamente el 35 % de los CCR, y surgirían de una lesión precursora serrada. Las lesiones serradas son muy propensas a la metilación de islotes *CpG* de regiones promotoras de múltiples genes, lo que provoca un silenciamiento epigenético (inactivación) de varios genes, en principio de forma aleatoria. Los mecanismos más comunes son la activación del gen *BRAF*, que supone la inhibición de la apoptosis fisiológica a nivel de las células epiteliales del colon, y la metilación del promotor de *MLH1*, originando los casos de CCR esporádicos con IMS (van Rinjsoever M et al. 2002, Samowitz W et al. 2005, Snover DC 2011, Armaghany T et al. 2012).

Recientemente, varios estudios han descrito la presencia de un porcentaje de casos de CCR que no presentan INC ni IMS, y además no pertenecen estrictamente a la vía serrada. Este subgrupo de CCR, conocido como MACS, presenta características clinicopatológicas y moleculares diferentes a otros CCRs; lo que sugiere que podrían seguir una vía de carcinogénesis diferente. Los MACS se identifican con más frecuencia en CCRs en jóvenes. Además presentan una mayor predilección por el colon izquierdo y recto, y parecen asociarse a peor pronóstico, detectando metástasis en el momento del diagnóstico. Otras características clinicopatológicas, sin embargo, son similares a las descritas para el CCR con IMS (Hawkins NJ et al. 2001, Chan TL et al. 2001).

Desde el punto de vista molecular, son pocos datos los que se conocen de los MACS. Varios estudios han observado que se asocian con un genotipo bajo de metilación (FM bajo), no siendo común la presencia de mutaciones del gen *BRAF* ni la ausencia de expresión del gen *MLH1*. Además presentan un patrón de hipometilación al

compararlos con CCRs con IMS o INC. Diferentes autores muestran interés en caracterizar a este subgrupo de CCRs, tanto desde el punto de vista clinicopatológico como de los aspectos moleculares. Por el momento, no hay unanimidad de la información obtenida, aunque parece claro que los MACS se asocian con un perfil de metilación de ADN diferente en el que están implicados genes poco habituales (Silver A et al. 2012, Tang R et al. 2004, Cai G et al 2008, Kakar S et al 2008, Banerjea A et al.2009).

Por último, señalar que en los últimos años está adquiriendo importancia la aparición de una clasificación molecular, basada en los tres eventos moleculares principales descritos con anterioridad (INC, IMS y FM), siendo un reflejo de los mecanismos subyacentes de carcinogénesis, y presentando una correlación con algunos aspectos y características anatomoclínicas. Globalmente, y tras varias aproximaciones, los CCR se podrían clasificar en cuatro grupo principales: dos referidos al estado de IMS (alta frente a la baja o nula) y dos referidos al estado del FM (alto frente a bajo/nulo), con diferentes correlatos moleculares, así como características anatomopatológicas y clínicas (Ogino S and Goel A 2008).

### **2.4 Lesiones precancerosas. Pólipos colónicos.**

El origen del CCR viene determinado por las secuencias antes mencionadas. El primer paso en la carcinogénesis es el desarrollo de tipos específicos de pólipos en la mucosa colónica sana, cuya histología es crucial para determinar el potencial de malignidad. Por ello, es importante tener en cuenta esta fase previa al cáncer, tanto desde el punto de vista morfológico como clínico.

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

Los pólipos adenomatosos son los más frecuentes. Por definición son displásicos y los que tienen mayor potencialidad maligna, dependiendo ésta de la morfología, tamaño y grado de diferenciación histológica. Los pólipos adenomatosos se clasifican morfológicamente en sesiles, pediculados, planos o deprimidos, e histológicamente en alto o bajo grado de displasia, así como en tubulares, vellosos o tubulovellosos. Entre el 65-80% de los pólipos extirpados son adenomas tubulares, y del 10-15% son adenomas tubulovellosos, mientras que solo el 5-10% son adenomas vellosos. Los adenomas más frecuentes son los pediculados. La incidencia del cáncer invasor está relacionada directamente con el tamaño del pólipo, la proporción del componente velloso, el grado de displasia y el número de pólipos. La incidencia está entre el 2.7-5%, mientras que en los adenomas vellosos mayores de 5 cm. dicha incidencia se eleva hasta el 40% (O'Brien MJ et al.1990, Heitman SJ et al. 2009).

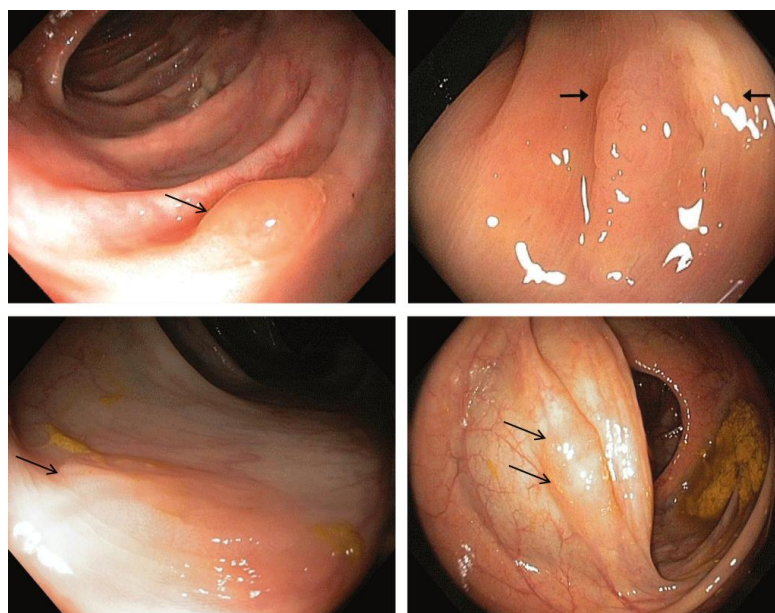
Las lesiones serradas son lesiones que se han establecido recientemente como precursoras de un grupo de CCR, aproximadamente una tercera parte del global. Hasta hace años se incluían dentro de los pólipos hiperplásicos y se pensaba que no tenían potencial maligno. Estas lesiones se caracterizan desde el punto de vista histológico por un aspecto dentado (o en dientes de sierra) del epitelio de las criptas y surgen principalmente en el colon proximal (Figura I.8). Se presume que resultan de alteraciones epigenéticas en los genes responsables de la proliferación y diferenciación celular (causadas por la hipermetilación de promotores de DNA), así como alteraciones genéticas como mutaciones en el gen *BRAF*. Los subtipos de lesiones serradas tienen

diferentes perfiles moleculares y potencial variable para convertirse en CCR, como se resume en la Tabla I.3 (Minoo P et al. 2006, Cappell 2008, Rex DK et al. 2012).

|   | Aspecto           | Tamaño                    | Prevalencia            | Localización    | Precanceroso |
|---|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------|--------------|
| <b>Pólipo hiperplásico (PH)</b>                 | Plano, sesil      | Pequeño<br>< 5 mm         | Muy frecuente          | Colon izquierdo | No           |
| <b>Adenoma/pólipo serrado/sesil<sup>1</sup></b> | Plano, sesil      | Mayor que PH <sup>2</sup> | Frecuente <sup>3</sup> | Colon derecho   | Si           |
| <b>Adenoma serrado tradicional</b>              | Sesil, pediculado | Mayor que PH              | Poco frecuente         | Colon izquierdo | Si           |

<sup>1</sup> El término adenoma serrado sesil y pólipo serrado sesil son sinónimos.  
<sup>2</sup> puede ser < 1 cm de tamaño, pero la media de tamaño de es mayor que la media de tamaño del pólipo hiperplásico. La mayoría de las lesiones serradas >1 cm pertenecen a esta categoría.  
<sup>3</sup> Prevalencia promedio < 2%.

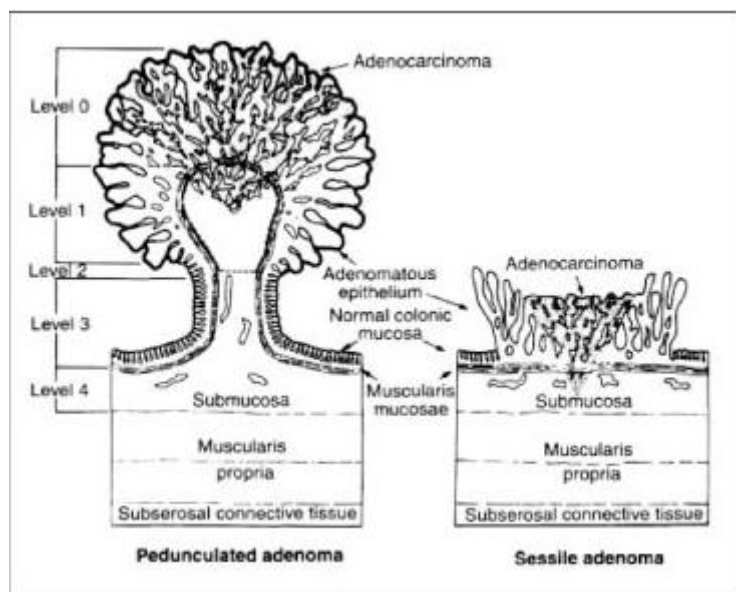
**Tabla I.3.** Clasificación anatomopatológica y características clínicas de las lesiones serradas en el colon. Modificado de Rex et al. 2012.



**Figura I.8:** Imágenes de colonoscopia de lesiones serradas sesiles. (Las flechas indican la lesión).

Un problema relativamente común en la práctica clínica es el hallazgo de focos de carcinoma en el pólipo. El término carcinoma *in situ* o displasia severa define cualquier lesión en la que las células neoplásicas se encuentran contenidas en la mucosa,

sin penetrar en la *muscularis mucosae*. Estas lesiones no tienen riesgo de metástasis a distancia, puesto que la mucosa no contiene linfáticos. Haggitt propuso un esquema para clasificar los pólipos con carcinoma invasor en función de la afectación de la pared del colon y linfáticos regionales (Haggitt RC et al. 1985) (Figura I.9).



**Figura I.9:** Clasificación para pólipos propuesta por Haggitt. Nivel 0: confinado a la mucosa del pólipo. Nivel 1: invade la submucosa de la cabeza del pólipo. Nivel 2: invade la submucosa del cuello del pólipo. Nivel 3: invade la submucosa del tallo del pólipo. Nivel 4: invade la submucosa de la pared del colon.

La colonoscopia completa permite realizar simultáneamente la toma de biopsias y la polipectomía. Hoy en día se considera que es el método más seguro y fiable para la detección de los pólipos colorrectales. Al no distinguir el tipo histológico, todos ellos deben ser candidatos a la extirpación. Las limitaciones para esto son de la propia técnica, y en función del tamaño y la forma del pólipo, en especial en los sessiles. Se indica la cirugía en los casos con criterios endoscópicos y anatómo-patológicos de malignidad y/o resección incompleta. El riesgo de cáncer residual en la pared del intestino o en ganglios linfáticos regionales en un paciente con un pólipo con focos de carcinoma extirpado endoscópicamente, depende del nivel de invasión de Haggitt. Para

las lesiones con niveles 1, 2 y 3, el riesgo es menor al 1%. Para lesiones nivel 4, varía entre el 12 y el 25 % (Rex DK et al. 2012, Atkin WS et al. 2002).

Como se ha mencionado, el tratamiento quirúrgico se indica si la resección endoscópica es incompleta y en función de las características histológicas de la lesión. La decisión terapéutica debe de individualizarse teniendo en cuenta la morbilidad asociada a la cirugía y la localización del pólipo. En el colon consistirá en una colotomía y polipectomía quirúrgica, o bien, la resección cólica con criterios oncológicos, si hay alto riesgo de malignidad. Si los pólipos son múltiples, exceptuando la PAF, a la resección quirúrgica se le pueden asociar extirpaciones endoscópicas o endoanales, y si existen criterios de malignidad en más de un pólipo se pueden llevar a cabo colectomías ampliadas o llegar a la proctocolectomía con reservorio ileal. En los pólipos localizados en el recto, aparte de la endoscopia y la biopsia, para el tratamiento quirúrgico la ecografía endoluminal ayudará a localizar y estadificar preoperatoriamente las posibles lesiones malignas. Con sospecha de benignidad o malignidad sin infiltración de la submucosa, las técnicas serán de resección local, mientras que si la biopsia informa de un cáncer invasor se debe proceder a una técnica más radical.

El seguimiento postpolipectomía permite la detección tanto de lesiones residuales o sincrónicas que pasaron desapercibidas en la exploración basal, como de lesiones metacrónicas. El intervalo de las sucesivas exploraciones de seguimiento dependerá de los hallazgos de la colonoscopia previa (número, tamaño e histología) (Castells y Marzo 2009).

### 2.5. Diagnóstico.

El mayor conocimiento de la historia natural y de los factores patogénicos implicados en el CCR ha permitido que se implanten programas preventivos dirigidos a evitar su aparición (prevención primaria), detectarlo precozmente (prevención secundaria) o minimizar su impacto en el pronóstico una vez que el tumor ya se ha presentado (prevención terciaria).

El diagnóstico de CCR en fases muy tempranas conlleva un beneficio considerable, puesto que es cuando el tratamiento es más efectivo. Estas consideraciones han llevado a sugerir exploraciones en la población general adulta a partir de los 50 años, y antes de esa edad en personas con mayor riesgo, bien por historia familiar, bien por otros factores de predisposición (Castells y Marzo 2009, Borràs JM 2011).

#### 2.5.1. Diagnóstico en sujeto con sospecha clínica de Cáncer colorrectal.

El diagnóstico del tumor permite conocer tanto la localización del mismo, como la presencia de lesiones sincrónicas en el colon y, si existen, metástasis o invasión de órganos vecinos.

La determinación de sangre oculta en heces (SOH) es la prueba inicial que se emplea en el cribado. Sin embargo, la técnica de elección para el diagnóstico de CCR es la colonoscopia completa con una sensibilidad del 90-95% para detectar tumores y un índice de complicaciones de 0,1% en pruebas diagnósticas (del 2% en pruebas terapéuticas), siendo la hemorragia y la perforación las principales complicaciones.

Cuando se identifica una lesión, es obligatoria la toma de biopsias para su estudio patológico. Una vez diagnosticado un CCR, es necesaria la realización de una

colonoscopia completa para descartar la presencia de lesiones sincrónicas (3-5%) o pólipos asociadas al tumor (30%). En caso de no poder visualizar todo el colon se puede practicar un enema opaco, una colonografía o una colonoscopia intraoperatoria (Codina A et al. 2003, Cunningham D et al. 2010 ).

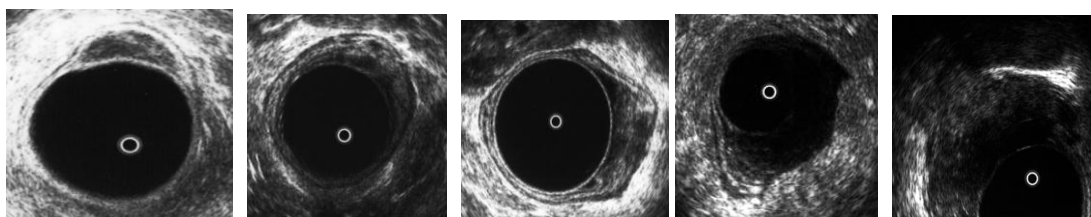
La evaluación preoperatorio incluye la realización de una evaluación clínica, radiológica y anatomopatológica, con el objetivo de determinar la extensión anatómica del tumor y así poder para planificar el tratamiento, establecer el pronóstico y evaluar los resultados (Lledó 2000). Para ello, se dispone de diferentes pruebas entre las que destacan la ecografía, la Tomografía computerizada (TAC) o Resonancia magnética nuclear (RMN). La Tomografía con emisión de positrones (PET-*scan*) no se recomienda en el momento inicial del diagnóstico.

Otros métodos diagnósticos se están empezando a introducir en el manejo del CCR, como la colonografía o colonoscopia virtual. Esta técnica aporta una mayor precisión en la localización de los tumores, lo que puede ser de ayuda en el tratamiento quirúrgico, principalmente cuando el abordaje es por vía laparoscópica. También, puede ser utilizado para la identificación de otras lesiones que no se detectan en la colonoscopia; por ejemplo, debido a una lesión obstructiva (Cunningham D et al.2010 ).

Los marcadores tumorales no sólo son útiles desde el punto de vista pronóstico sino también como método de diagnóstico precoz de recidivas. Su determinación debe de ser preoperatoria.

En el caso del cáncer de recto, el examen digital permite localizar y conocer la distancia respecto al margen anal, tamaño y número de cuadrantes afectados, grado de movilidad y aspecto macroscópico. Del mismo modo permite conocer el estado de los

esfínteres y orienta sobre el tipo de cirugía. En la evaluación del cáncer de recto, aparte de las pruebas complementarias referidas para el cáncer de colon, es importante la realización de una rectoscopia rígida para determinar la distancia del tumor respecto al margen anal. Las pruebas de imagen permiten determinar la extensión del tumor, tanto a nivel locoregional como a distancia. Estos datos son esenciales para poder plantear el tratamiento óptimo. Las pruebas de imagen son la ecografía endorrectal, TAC y RMN. La ecografía endorrectal y la RMN son pruebas diagnósticas que permiten determinar el grado de invasión del tumor a través de la pared rectal y la afectación de los ganglios (Figura I.10). Cada una de estas pruebas tiene sus ventajas y limitaciones, por lo tanto deben considerarse como exploraciones que ofrecen una información complementaria para definir la posibilidad de llevar a cabo un tratamiento neoadyuvante.



**Figura I.10:** Estadificación sucesiva mediante ecografía endorrectal preoperatoria de diferentes cánceres de recto según el crecimiento en el espesor de la pared, desde uT0 hasta uT4, en que hay infiltración prostática.

### 2.5.2. Cribado del Cáncer colorrectal en nuestro medio.

Las estrategias de cribado tienen como objetivo identificar individuos asintomáticos con lesiones precancerosas o en una fase inicial de la progresión tumoral.

Las recomendaciones establecidas por la Sociedad Española de Gastroenterología son (Castells y Marzo 2009 ):

1.- El cribado de CCR debe de ofrecerse a todos los individuos sin factores de riesgo a partir de los 50 años de edad.

2.- La detección de sangre oculta en heces (SOH) en varones y mujeres de 50-74 años con periodicidad anual o bienal es eficaz. Con un intervalo de un año aumenta la sensibilidad. La prueba de cribado en los programas poblacionales debería ser sangre oculta en heces (inmunológico) (SOHi) cuantitativa con un punto de corte que garantice un balance óptimo entre sensibilidad y especificidad, teniendo en cuenta la disponibilidad de la colonoscopia.

3.- La sigmoidoscopia es eficaz en el cribado del CCR, siendo el intervalo recomendado de 5 años. Si el resultado es positivo es obligado explorar endoscópicamente el resto del colon, dada la mayor incidencia de lesiones sincrónicas proximales al trayecto explorado. Se estima que después de una sigmoidoscopia se realiza un 5-16% de colonoscopias. La suma de esta prueba con la SOH no ha evidenciado mayor eficacia que ambas por separado.

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

5.- La colonoscopia es una prueba de cribado eficaz siendo el intervalo recomendado de 10 años.

Las nuevas pruebas de cribado incluyen el análisis de ADN fecal y la colonografía por tomografía computarizada. El análisis de ADN fecal permite rastrear la presencia de células tumorales en las heces mediante técnicas de biología molecular; su sensibilidad es mayor que las pruebas de SOH, con una especificidad similar. La colonografía por tomografía computarizada o colonoscopia virtual consiste en la obtención de imágenes de tomografía tras insuflar el colon con aire o CO<sub>2</sub> y su posterior

reconstrucción. Por el momento no deben ser consideradas en el cribado de CCR mientras que no se realicen más evaluaciones sobre los beneficios, costes y aceptabilidad.

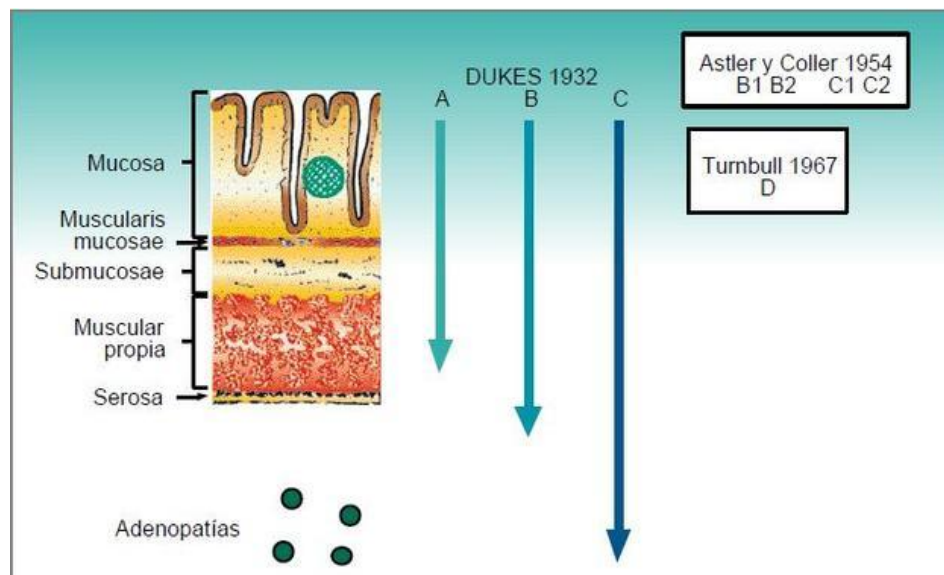
El cribado del CCR es coste-efectivo, con independencia de la estrategia empleada. La elección del método depende, entre otros factores, de la aceptación por el paciente y la disponibilidad de los recursos.

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

La clasificación por estadios o estadificación de los tumores colorrectales es el proceso de determinar hasta dónde se ha extendido el cáncer. Ello viene determinado por el grado de diseminación locorregional, tanto a nivel de la pared del colon como por vía linfática en los ganglios de drenaje del propio órgano, como por la posible extensión hematológica, alcanzando órganos a distancia. La estadificación del CCR es necesaria para planificar el tratamiento, establecer el pronóstico y evaluar los resultados del tratamiento.

Se utilizan varios sistemas de clasificación, aunque los más frecuentes y más recomendados son los de Dukes, Astler-Coller y AJCC/TNM. En 1932, Dukes propuso su clasificación, que se caracteriza por su sencillez y por su correspondencia con el pronóstico, en la que definía tres estadios, A, B y C, según el tumor invadiera la pared, sin alcanzar la subserosa; la rebasara; o hubiera afectación de ganglios locorregionales, respectivamente. Posteriormente, de las múltiples modificaciones, sólo son válidas, por una parte, aquella que añadía la “D” en caso de presencia de metástasis a distancia (Turnbull 1967), y más importante todavía, la llevada a cabo por Astler y Coller, en

1954, que diferenciaba los estadios B1 y B2, así como C1 y C2, según la afectación del espesor de la pared del colon. En el mismo año fue introducida la clasificación TNM.



**Figura I.11:** Cáncer colorrectal: Sistemas de estadificación. (Imagen tomada de <http://www.cirugest.com/htm/revisiones/cir15-14/15-14-08.pdf>)

El Comité Americano Conjunto en Cáncer (AJCC) designó la estadificación mediante la clasificación TNM para definir el cáncer de colon, y es actualmente la clasificación más utilizada (<http://www.cancerstaging.org>). El sistema AJCC/TNM describe la extensión del tumor primario (T), la ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales (N), y la ausencia o presencia de metástasis a distancia (M). La misma clasificación se usa tanto para la estadificación clínica como patológica (Edge SB et al 2010).

#### Tumor primario (T):

Tx: El tumor primario no se puede evaluar.

T0: No hay evidencia de tumor primario.

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

T1: El tumor invade la submucosa.

T2: El tumor invade la muscular propia.

T3: El tumor invade la subserosa o tejidos pericorrectales.

T4a: El tumor penetra la superficie del peritoneo visceral.

T4b: El tumor invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras.

### Ganglios linfáticos regionales (N):

NX: Los ganglios regionales no pueden ser evaluados.

N0: No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales.

N1: Metástasis en uno a tres ganglios linfáticos regionales.

N1a: Metástasis en un ganglio linfático regional

N1b: Metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales.

N1c: Depósito(s) tumoral(es) en la subserosa o en los tejidos mesentéricos o pericorónicos no peritonealizados, o en los tejidos pericorrectales, sin metástasis ganglionar regional.

N2: Metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos regionales.

N2a: Metástasis en 4 a 6 ganglios linfáticos regionales.

N2b: Metástasis en  $\geq 7$  ganglios linfáticos regionales.

### Metástasis a distancia (M):

MX: No se puede valorar la metástasis a distancia.

M0: No hay metástasis a distancia.

M1: Metástasis a distancia.

M1a: La metástasis está confinada a un órgano o sitio (es decir, hígado, pulmón, ovario, ganglio no regional).

M1b: Hay metástasis en  $>1$  órgano o sitio, o el peritoneo.

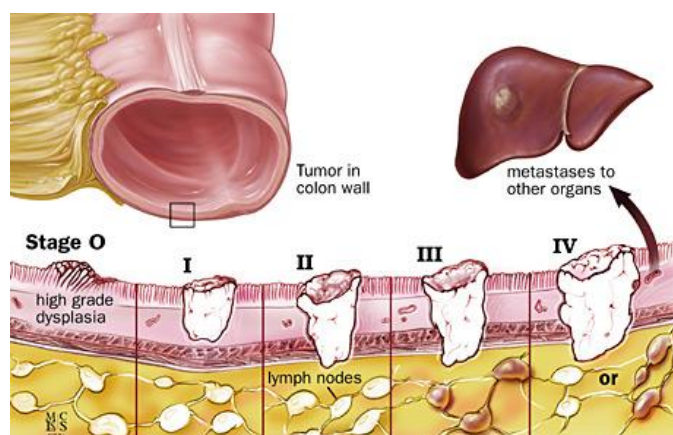
La etapa o estadio en la que se encuentra el tumor, que va desde el “0” hasta el “4” en números romanos, viene determinada por la combinación de las categorías T, N

y M del paciente, como se observa en la Figura I.12 y en la Tabla I.4, en la que también se relacionan con la clasificación de Dukes y la modificada de Astler Coller.

| Estadio | T           | N           | M   | Dukes | MAC <sup>a</sup> |
|---------|-------------|-------------|-----|-------|------------------|
| 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 Coller.

**Tabla I.4.** Clasificaciones por estadios para el CCR (Imagen tomada del Nacional Cancer Institute: [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).



**Figura I.12:** Clasificación por estadios del CCR según la afectación de la pared del colon; ganglios y órganos a distancia. (Imagen tomada de [www.hopkinscoloncancercenter.org](http://www.hopkinscoloncancercenter.org) )

Varios estudios evalúan la importancia pronóstica de diferentes características histológicas, moleculares y clínicas; sin embargo el estadio del tumor sigue siendo el mejor indicador de pronóstico a largo plazo en el CCR. Como se ha descrito anteriormente, éste viene determinado por el grado de penetración del tumor en la pared del colon y la afectación ganglionar. La tasa de supervivencia global a los 5 años se representa a continuación (O'Connell JB et al. 2004).

Estadio I (T1-T2 N0): 93%

Estadio IIA (T3N0): 85%

Estadio IIB (T4N0): 72%

Estadio IIIA (T1-T2 N1): 83%

Estadio IIIB (T3-T4 N1): 64%

Estadio IIIC (N2): 44%

Estadio IV: 8,1%

### **2.7. Tratamiento.**

El tratamiento del CCR depende de la localización de la neoplasia y de la estadificación de la misma. El tratamiento quirúrgico es, actualmente, el tratamiento curativo para el CCR localizado. La cirugía también ofrece una opción potencialmente curativa en pacientes seleccionados con enfermedad metastásica limitada. Además, incluso los pacientes que no son candidatos para la resección curativa se pueden beneficiar del tratamiento quirúrgico para solucionar complicaciones como la obstrucción o sangrado del tumor primario. El tratamiento quirúrgico se puede complementar con tratamiento oncológico (quimioterapia y/o radioterapia) según los casos.

#### 2.7.1 Tratamiento quirúrgico.

El objetivo del tratamiento quirúrgico del CCR es la resección completa del tumor con márgenes de seguridad, la extirpación de todo el territorio ganglionar correspondiente con ligadura de los vasos principales en su origen. La cirugía oncológica radical previene la recidiva local en la mayor parte de los casos (Harris GJ et al 2002). A la hora de definir la extensión de la resección cólica hay que tener en cuenta tanto los márgenes proximales y distales, que deben ser de al menos 5 cm. del tumor, como realizar una linfadenectomía adecuada. Las recomendaciones actuales son la exéresis de al menos 12 ganglios para una correcta estadificación; ello es de importancia puesto que proporciona información pronóstica que guía el tratamiento adyuvante. La resección en bloque de los órganos adheridos podría ser necesaria en tumores avanzados para realizar una resección R0 (Cunningham D et al. 2010).

El análisis patológico de la pieza quirúrgica también ha de realizarse de una forma sistemática con unos parámetros mínimos. De esta manera se puede establecer el pronóstico correcto de los pacientes, determinar la necesidad de tratamiento complementario y mejorar la supervivencia (Roig JV et al. 2003).

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

La *hemicolectomia derecha* se realiza generalmente para tumores que asientan desde el ciego hasta la parte proximal del colon transverso. Se realiza una *hemicolectomia derecha ampliada* para tumores del colon transverso o a nivel de ángulo esplénico del colon.

La *hemicolectomia izquierda* es apropiada para tumores localizados en la parte distal del colon transverso o colon descendente. Se realiza la *sigmoidectomía* en el caso de cáncer de colon sigmoide.

La *colectomía total o subtotal* está indicada cuando existen lesiones o neoplasias sincrónicas en el lado derecho e izquierdo del colon. En ocasiones, se realiza esta técnica en pacientes que presentan un cuadro de obstrucción intestinal secundario a un tumor estenosante en el lado izquierdo del colon.

La cirugía laparoscópica es una opción aceptada en el tratamiento del CCR. En manos expertas, y en pacientes adecuadamente seleccionados se ha demostrado que los resultados oncológicos, la morbilidad y mortalidad perioperatoria son comparables con la cirugía abierta, mientras que la recuperación postoperatoria es relativamente más rápida (Targarona EM et al. 2004, Patel SS et al. 2012, Lacy AM et al. 2008).

En los síndromes hereditarios, como es el caso de la PAF, queda establecida la necesidad de colectomía profiláctica para evitar el desarrollo de CCR. En el caso del SL, dado que presentan un riesgo incrementado de desarrollar tumores metacrónicos y una progresión más rápida desde adenoma a carcinoma, se recomienda la realización de una resección extensa (colectomía o proctocolectomía total) para el tratamiento de las neoplasias colorrectales (de Jong AE et al. 2004, Castells y Marzo 2009, Jasperson KW et al. 2010).

El tratamiento quirúrgico del Cáncer de Recto presenta consideraciones especiales. Con intención curativa, actualmente se contemplan cuatro opciones: resección local, resección anterior con anastomosis, intervención de Hartmann y la amputación abdominoperineal. La elección de la técnica depende de diferentes variables.

1.- Resección local. La resección local transanal consiste en la escisión del tumor por vía anal, con un margen de seguridad de un centímetro alrededor del mismo. Es una técnica que surge como alternativa a procedimientos radicales. Sin embargo, dada la baja frecuencia de tumores subsidiarios de esta técnica (el 5% de los tumores de recto) su empleo es escaso. Se debe de emplear en tumores rectales poco avanzados localmente (pT1), sin evidencia de afectación ganglionar, moderadamente o bien diferenciados, menores de 3 cm de diámetro, limitados a un cuadrante de la circunferencia rectal y situados por debajo de 8-10 cm del margen anal (Chang AJ et al. 2008). La pared del recto se reseca incluyendo la grasa perirectal para intentar detectar la presencia de ganglios linfáticos y estadificar el tumor. Si el estudio anatomopatológico indica un estadio mayor del diagnosticado con las pruebas de imagen, se debe realizar una operación radical.

En determinados pacientes, como son aquellos de edad avanzada o con enfermedades asociadas y alto riesgo quirúrgico para procedimientos radicales, se puede plantear la resección local, aunque no cumplan todos los criterios.

La resección local también se puede realizar mediante cirugía microscópica endoscópica transanal (TEMS). Fue diseñado por Buess et al en 1980, y es una técnica mínimamente invasiva que permite el acceso quirúrgico al recto superior y medio (Buess G et al. 1985). Los estudios publicados sugieren que es un procedimiento seguro, con menor morbilidad que la cirugía radical y con tasas de recurrencia menores y mejores resultados que la resección local transanal (Christoforidis D et al. 2009, Qi Y et al. 2011).

2.- Resección anterior. La cirugía radical implica la resección del recto y del mesorrecto, para conseguir el control local de la enfermedad. La resección anterior es una técnica que se puede emplear en tumores avanzados localizados en el tercio superior o medio del recto. Actualmente, se considera que el margen distal es suficiente con 2 cm, adquiriendo una mayor importancia el margen de resección circunferencial y el concepto de escisión total del mesorrecto. En los tumores que están situados a diez centímetros o menos del margen anal se realiza resección de la pieza con márgenes distales y proximales adecuados, y exéresis completa del mesorrecto; mientras que tumores localizados por encima de esta distancia se realiza una resección parcial que exige la exéresis del recto y mesorrecto al menos 5 cm distales al tumor (Meredith KL et al. 2009).

Las tasas más bajas de recurrencia (4%) y los mejores resultados de supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con cáncer de recto, se observan tras

introducir la técnica de exéresis completa del mesorrecto. Se ha comprobado que es una técnica factible, segura y su abordaje laparoscópico no parece implicar ninguna desventaja oncológica (Leroy J et al. 2004, Leroy J et al. 2004a, Piso P et al.2004).

En la resección anterior ultrabaja, la asociación de un reservorio cólico disminuye las secuelas funcionales de la técnica y mejora la calidad de vida de los pacientes sometidos a la misma. También puede ser conveniente asociar una ileostomía de protección en casos de anastomosis muy bajas o en pacientes con importante comorbilidad asociada, evitando las fugas y sus consecuencias. Una alternativa novedosa para proteger anastomosis de alto riesgo es la ileostomía virtual descrita por Sacchi et al (Sacchi M et al. 2011, Galler AS et al 2011).



**Figura I.13:** Pieza quirúrgica de una resección anterior baja. Se muestra consideraciones especiales de la cirugía del cáncer de recto como la escisión del mesorrecto.

3.- Amputación abdominoperineal. La Amputación abdominoperineal (AAP) fue desarrollada por Miles en los países anglosajones a comienzos del siglo XX (Galler AS et al. 2011). Está indicada en los cánceres de la porción baja del recto en los que una exéresis curativa no permite conservar el aparato esfinteriano, así como para ciertos cánceres del conducto anal. Se considera una técnica en regresión, puesto que un

porcentaje elevado de pacientes con cáncer de recto pueden someterse a una cirugía preservadora de esfínteres. La intervención consiste en la resección del sigma, recto y ano y la confección de una colostomía permanente.

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

4.- Intervención de Hartmann. Consiste en realizar una resección colorrectal sin restablecer la continuidad intestinal, y confeccionar una colostomía terminal con extremo cólico proximal. Es una intervención que se puede realizar con intención curativa en casos de cáncer complicado con una obstrucción o perforación, en pacientes ancianos para evitar una herida perianal o en casos de incontinencia fecal. También puede realizarse en el curso de una exéresis paliativa.

Todas las intervenciones descritas previamente se pueden abordar por vía laparoscópica, siendo una técnica segura y eficaz y obteniendo los mismo resultados oncológicos en comparación con la cirugía abierta (Hotta T y Yamaue H 2011).

### 2.7.2 Tratamiento adyuvante.

En los pacientes que han sido sometidos a un tratamiento quirúrgico con intención curativa, se cree que la recurrencia de la enfermedad deriva de micrometástasis clínicamente ocultas que están presentes en el momento de la cirugía. El objetivo del tratamiento adyuvante es la erradicación de estas micrometástasis, aumentando así la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) y la Supervivencia Total

(ST). El estadio I del CCR presenta un excelente pronóstico con una supervivencia a los cinco años del 95% y el tratamiento quirúrgico es suficiente sin necesidad de adjuvancia. En contraste, el tratamiento adyuvante ha demostrado claros beneficios en el estadio III de la enfermedad (una reducción del 30% en el riesgo de recurrencia y del 22 al 32% en la mortalidad), mientras que su indicación para el estadio II es controvertida, salvo en pacientes de alto riesgo (Dunn KB y Trudel JL 2011, Cunningham D et al. 2010 ).

Actualmente las combinaciones con Oxaliplatino se consideran las más adecuadas. El régimen más recomendado es la asociación de Oxaliplatino con Leucovorina (LV) e infusión de 5-fluorouracilo (5- FU) (FOLFOX). Este régimen se ha ido modificando, y muchos oncólogos usan FOLFOX7, que elimina la infusión de 5-fluorouracilo siendo significativamente menos mielosupresor. La combinación de Oxaliplatino oral y Capecitabina (XELOX) es una opción aceptable, aunque es potencialmente más tóxica que FOLFOX. En pacientes con contraindicación para el Oxaliplatino, es adecuado el régimen de 5-FU y LV administrado por vía intravenosa durante seis meses. Otra alternativa aceptada es el uso de fluoropirimidinas orales (UFT, capecitabina) durante seis meses. En cuanto al cáncer de recto, el estudio alemán CAO/ARO/AIO 94, demostró una incidencia significativamente menor de recurrencia local y toxicidad, y una mayor incidencia de preservación de esfínteres con tratamiento neoadyuvante en comparación con quimiorradioterapia postoperatoria. Desde entonces, el tratamiento neoadyuvante se considera el tratamiento de elección en el cáncer de recto estadio II y III (Cunningham D et al. 2010 ).

El mayor conocimiento de las bases moleculares y alteraciones genéticas implicadas en la carcinogénesis que hoy se tiene, permite identificar un fenotipo

concreto de CCR, que en muchas ocasiones viene acompañado de diferentes comportamientos de los tumores, desde el punto de vista pronóstico o diferente respuesta ante ciertos tratamientos.

La mejor manera de combinar y secuenciar los diferentes fármacos activos de los que disponemos aún no se ha establecido, y debido a la heterogeneidad de los CCRs, se debe de escoger la estrategia mas adecuada para cada individuo. En algunos casos, el análisis de biomarcadores está influyendo en la elección del tratamiento. Por ejemplo, es bien conocido que la presencia tanto de mutación en *KRAS* como *BRAF* se asocia a una mayor resistencia al tratamiento con antiEGFR, y que tumores con IMS presentan peor respuesta al tratamiento con 5-FU (Di Nicolantonio F et al. 2008, Tejpar S et al. 2009).

### 2.7.3 Tratamiento paliativo.

La mayoría de los pacientes con CCR y enfermedad metastásica no pueden ser curados y la intención del tratamiento es paliativa. La quimioterapia paliativa ha demostrado aumentar la supervivencia en al menos el doble, controlar la aparición de enfermedad sintomática y mantener la calidad de vida durante el mayor tiempo posible. Además, en ocasiones, permite la resección quirúrgica de las metástasis (Macedo LT et al. 2012, Konopke R et al. 2012, Bartlett DL et al. 2012).

Las recomendaciones de las principales sociedades, son el uso de FOLFIRI o FOLFOX asociado a fármacos dirigidos a los receptores de factores de crecimiento epidérmico (Cetuximab, Bevacizumab o Panitumumab) como primera línea de tratamiento. En pacientes que no son candidatos a un tratamiento intensivo, es válido el régimen de 5FU y LV, asociado a bevacizumab. Otra alternativa, igualmente válida, es

el uso de fluoropiridinas orales, como capecitabina con o sin bevacizumab (Bartlett DL et al. 2012, Macedo LT et al. 2012, Giacchetti S et al. 2000, Saltz LB et al. 2000).

Al menos el 70% de los pacientes con CCR desarrollan metástasis hepáticas en el curso de su enfermedad. La resección hepática es el tratamiento potencialmente curativo, alcanzando índices de supervivencia del 58% a los 5 años. Hoy en día la única premisa necesaria para indicar la cirugía es poder extirpar toda la enfermedad macroscópica con márgenes libres de enfermedad. Sin embargo, hay que tener en cuenta el tejido hepático residual, la presencia de enfermedad extrahepática, y comorbilidades del paciente. La alternativa al tratamiento quirúrgico son los procedimientos locales como la radiofrecuencia, la quimioembolización, etc (Bartlett DL et al. 2012, Konopke R et al. 2012).

El objetivo de mejorar los índices de supervivencia ha de basarse en un tratamiento multidisciplinario: oncológico, quirúrgico, radiológico, anatomopatológico, etc.

### **2.8. Seguimiento.**

A pesar de un tratamiento quirúrgico con intención curativa y el uso de tratamiento oncológico asociado, un 40 % de los pacientes con enfermedad en estadio II o III tendrá una recurrencia de la enfermedad después del tratamiento inicial. El seguimiento estricto de estos pacientes tras la cirugía durante los primeros años, ha demostrado descubrir las recidivas en un estadio potencialmente curable y por tanto mejorar la supervivencia (Scheer A et al. 2009, Baca B et al 2011).

Existen diversas sociedades nacionales e internacionales (American Society of Clinical Oncology, European Society of Medical Oncology, etc) que publican periódicamente recomendaciones para el seguimiento del CCR intervenido.

Las recomendaciones de la American Society of Clinical Oncology (ASCO), actualizadas en el 2005 se exponen a continuación: se recomienda una entrevista clínica y exploración física con el fin de llevar a cabo tareas de medicina preventiva, cada tres a seis meses para los tres primeros años, cada seis meses durante los años cuarto y quinto, y anualmente a partir de entonces. El análisis de antígeno carcinoembrionario (CEA) es capaz de detectar de manera precoz la recidiva local o a distancia de la enfermedad, incluso antes de que aparezcan los síntomas. Su determinación para pacientes en estadio II y III debería de realizarse cada 2-3 meses durante, como mínimo, los dos primeros años de diagnóstico y anualmente hasta los cinco años. El examen endoscópico se recomienda repetir al año de la resección primaria del cáncer de colon o recto para excluir lesiones nuevas o recidivas en la anastomosis. Si es normal, se repite a los tres años, y si es normal, en los subsiguientes intervalos de cinco años. Se recomienda la realización de TAC torácico y abdominal anual durante al menos los tres primeros años. En el cáncer de recto, se recomienda la realización de TAC pélvico anual si no se administró radioterapia pélvica. La realización tanto del hemograma, como el test de sangre oculta en heces, la radiografía de tórax o el PET no se justifican de forma habitual (Desch CE et al. 2005).

En la tabla I.5. Se presenta un protocolo válido de seguimiento para el CCR intervenido en nuestro medio (Navarro y Piulets 2003).

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

**Tabla 1.5:** Protocolo de seguimiento del CCR. \* Localización rectal. CEA: antígeno carcinoembrionario; RxT: radiografía de tórax; TC: tomografía computarizada. T (m): tiempo en meses (Navarro y Piulats 2003).

### 3. EL CÁNCER COLORRECTAL FAMILIAR.

El CCR presenta una de las proporciones más importantes de casos familiares dentro de las neoplasias malignas más comunes. Hasta el 30% aproximadamente tienen un componente familiar. Dentro de éstos, el 5% se debe a mutaciones conocidas a nivel germinal y su expresión clínica está bien caracterizada; son formas de CCR hereditario, donde se incluyen el SL (2-5%) y la PAF, entre otros. El 20-30% restante, son casos que presentan agregación para este tipo de tumores, pero desde el punto de vista genético no

son bien conocidos ni se identifica claramente su modelo de herencia. Dentro de este grupo se puede situar el síndrome familiar tipo X (Lindor et al. 2005, Valle et al. 2007).

### **3.1. Síndrome de Lynch.**

#### 3.1.1. Concepto y variantes.

El SL es la forma más común de CCR hereditario y supone del 1-6% del total de CCR. Es un síndrome de herencia autosómica dominante, con la aparición de CCR a una edad más temprana que en la población general, siendo la edad media al diagnóstico de 44 años. En el SL es más frecuente que la neoplasia se localice a nivel proximal del colon. Además hay una mayor incidencia de CCR múltiples, sincrónicos (18%) y /o metacrónicos (24%).

Desde el punto de vista microscópico, es común la presencia de tumores mucinosos o pobremente diferenciados. Otras características anatomopatológicas son la presencia de células en anillo de sello, patrón de infiltración Crohn like o la infiltración linfoide tumoral.

El SL no solo predispone al desarrollo de CCR, sino también al desarrollo de neoplasias en otras localizaciones. El cáncer de endometrio es la neoplasia extracolónica más frecuente asociada al Lynch, con un riesgo de desarrollo del 40-60%. Se diagnostica también a una edad más precoz respecto a los esporádicos y la mayoría son de tipo endometriode. Otras neoplasias asociadas son gástricas, ovario, intestino delgado, epitelio hepatobiliar y urotelial, cerebro, páncreas, etc (Jasperson KW et al. 2010, Valle et al. 2007, Balmaña J et al. 2010).

Los individuos afectados por el SL pueden desarrollar pólipos con más frecuencia que la población general, sin embargo la poliposis es infrecuente. Éstos

presentan ciertos rasgos diferenciadores: aparecen a edad más temprana, tienen mayor tamaño, y presentan características histopatológicas asociadas a alto riesgo de degeneración (alto índice de displasia y más vellosos). Además se ha observado que la progresión a la malignización es mucho más rápida (Jasperson KW et al. 2010, Cappell. 2008, Kastrinos F et al. 2013, Vasen et al. 2007).

Dentro del SL se han descrito variantes como son, el síndrome de Muir- Torre, en el que, aparte del CCR, aparecen tumores sebáceos de piel (adenomas sebáceos, epitelomas y carcinomas). La mayoría de las mutaciones encontradas se hallan en el gen *MSH2*; y el síndrome de Turcot, en el que se asocia la presencia de CCR con tumores del sistema nervioso central, principalmente gliomas. En relación a sus bases genéticas, se pueden distinguir dos tipos de síndrome: el causado por mutaciones en el gen *APC*, que se comentará más adelante; y el causado por mutaciones en *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* (Balmaña J et al. 2010).

El SL resulta de una mutación a nivel germinal en los genes de reparación de bases desapareadas (Mismatch Repair Genes MMR) del ADN: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*. El 90% se debe a *MLH1* y *MSH2*, y el 10% a *MSH6*. Estas alteraciones dan lugar a la acumulación de secuencias genéticas llamadas microsatélites y mutaciones en genes supresores (*TGF*, *BRII* y *BAX*). Su expresión molecular es la inestabilidad de microsatélites o ausencia de expresión de proteínas del sistema de reparación.

Se ha observado que existe una correlación genotipo-fenotipo de las mutaciones de los genes de reparación. La mutación de *MLH1* se asocia con mayor riesgo de desarrollar CCR a una edad más precoz, *MSH2* se asocia con mayor riesgo de tumores extracolónicos, y *MSH6* con mayor riesgo de cáncer de endometrio; mientras que

mutaciones en *PMS2* se relacionan con menor riesgo de desarrollar tanto CCR como endometrial (15- 20%) en comparación con portadores de otras mutaciones (Balmaña J et al. 2010).

La identificación de sujetos portadores de mutaciones asociadas al SL es esencial. Su diagnóstico se realiza siguiendo los criterios clínicos de Ámsterdam y, actualmente más utilizados, los criterios de Bethesda. A partir de ellos, se lleva a cabo el análisis de la IMS o de la IHQ de las proteínas del sistema de reparación del ADN previo al estudio genético.

Los criterios de Ámsterdam son criterios clínicos más estrictos y por tanto presentan mayor especificidad, mientras que los criterios de Bethesda son más generales y tienen mayor sensibilidad. La ausencia de unos criterios clínicos que combinen alta sensibilidad y especificidad, y el conocimiento de que más del 90% de los SL muestran IMS, hacen que algunos autores recomienden la realización de IHQ de las proteínas del sistema MMR o IMS en todos los pacientes con diagnóstico de CCR a la hora de seleccionar pacientes a los que se debe realizar el análisis de mutaciones asociadas con el SL, independientemente de las características clínicas o familiares (Balmaña J et al. 2010, Vasen et al. 2007, Kuppermann M et al. 2013, Byfield y Syngal 2008).

La IMS se utiliza como marcador de la deficiencia del sistema MMR. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un 15% de los CCR esporádicos presentan IMS. En estos casos hay que descartar que no sea debido a una mutación somática del gen *BRAF* o a hipermetilación del promotor de *MLH1*, que ocasiona su silenciamiento (Balmaña J et al. 2010, Byfield y Syngal 2008, Kuismanen SA et al. 2000).

### 3.1.2. Cribado del Síndrome de Lynch.

El cribado del CCR en el SL es eficaz y va dirigido a la identificación y la resección de pólipos, así como a la detección de carcinomas en las fases iniciales de su desarrollo (Castells y Marzo 2009). Varios estudios han demostrado que el cribado del CCR se asocia a una disminución del 60% en la incidencia de cáncer y a un descenso significativo de la mortalidad global en relación con la no realización de cribado (Vasen 2007, 2010).

El seguimiento se propone para casos en los que se ha identificado mutaciones en *MLH1*, *MSH2* o *MSH6*, o con una evidencia familiar y clínica muy clara de SL (de la Chapelle 2003).

Se recomienda la colonoscopia completa anual a partir de los 20-25 años, o 10 años antes de la edad de diagnóstico del CCR en el familiar afecto más joven, escogiendo la opción que primero ocurra. El límite superior no queda establecido, continuando el seguimiento según el estado de salud del individuo.

La mayoría de las lesiones (62%) que se detectan durante el seguimiento se localizan en el colon derecho; y aproximadamente el 30% son relativamente pequeñas (< 3 cm). Por ello, estudios recientes sugieren que la realización de la colonoscopia con técnicas de imagen avanzadas, como la cromoendoscopia y las imágenes de banda estrecha, podrían incrementar la tasa de detección de adenomas (Vasen et al. 2010).

Las familias con mutación identificada o con alta sospecha de SL, presentan un riesgo mayor de desarrollar neoplasias extracolónicas. Se recomienda el cribado sistemático de cáncer de endometrio y ovario, a partir de los 25-35 años, mediante la realización de un examen ginecológico, una ecografía transvaginal anual, aspirado

endometrial y CA-125 (Balmaña J et al. 2010). El cribado de cáncer de endometrio es especialmente importante en las familiares portadoras de mutación en el gen *MSH6*, puesto que presentan una mayor frecuencia de este tipo de neoplasia (Castells y Marzo 2009). Para el resto de órganos, el cribado dependerá de la incidencia de cada tipo de neoplasia en cada familia, o a la aparición de sintomatología.

### 3.1.3. Tratamiento quirúrgico.

Debido al riesgo de desarrollar CCR sincrónicos y metacrónicos, la progresión más rápida de adenoma a carcinoma y la posibilidad de lesiones planas precursoras difíciles de tratar endoscópicamente, algunos autores recomiendan realizar una cirugía más extensa (colectomía total o proctocolectomía) para el tratamiento de CCR en pacientes pertenecientes al SL (Vasen et al. 2007, Castells y Marzo 2009, Balmaña J et al. 2010). Se ha visto que la colectomía subtotal, llevada a cabo en individuos jóvenes aumenta la expectativa de vida hasta en 2,3 años, en comparación con la resección segmentaria. Por tanto, actualmente se considera la realización de colectomía subtotal en casos de SL con diagnóstico de CCR. Aunque tanto la edad, la comorbilidad, la opinión del paciente, como la localización del tumor son, entre otros, factores que se deben de tener en cuenta en la decisión terapéutica definitiva (De Vos tot Nederveen Cappel WH 2003, Haanstra JF et al. 2012).

La colectomía profiláctica en individuos con riesgo o portadores asintomáticos no se recomienda; aunque se puede plantear sólo en casos donde el seguimiento endoscópico no se va a cumplir. El tratamiento habitual en mujeres que desarrollan carcinoma de endometrio es la histerectomía y doble anexectomía. Este tipo de cirugía de forma profiláctica, puede ser una opción en mujeres portadoras de mutación de los

genes de reparación (en especial *MSH6*), después de cumplir las expectativas de natalidad, o en la menopausia (Castells y Marzo 2009, Balmaña J et al. 2010).

En el SL existe un riesgo elevado de desarrollar lesiones sincrónicas o metacrónicas. El riesgo de desarrollar una segunda neoplasia colorrectal a los 10 años de seguimiento en los pacientes que han sido sometidos a cirugía es del 16% (Balmaña J et al. 2010). Por otra parte, el riesgo de desarrollar un carcinoma de recto en los pacientes que se ha preservado este segmento es del 12%, tras un periodo de seguimiento de 12 años. Todo ello, justifica una vigilancia endoscópica con un intervalo de 1 a 3 años, según la edad, patología asociada y tipo de intervención realizada. (Balmaña J et al. 2010, Castells y Marzo 2009, Jasperson KW et al. 2010).

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

#### 3.2.1. Concepto y variantes.

La PAF es el segundo síndrome hereditario más frecuente y representa menos del 1% del total de CCRs. Es una enfermedad hereditaria autonómica dominante causada por mutaciones germinales en uno de los alelos del gen supresor *APC* (*adenomatous polyposis coli*) localizado en 5q21, con una penetrancia del 100%. Aproximadamente un tercio de los casos de PAF no presentan antecedentes familiares de la enfermedad, y por tanto representan casos *de novo*, pudiendo transmitir la enfermedad a su descendencia (Jasperson KW et al. 2010, Laurent S et al. 2011). Su incidencia es de un caso por 10.000-20.000 habitantes (Castells y Marzo 2009).

La PAF se define por el desarrollo de cientos a miles de adenomas a nivel de colon y recto, iniciándose en la adolescencia y con un potencial de malignización muy alto. Ello supone su progresión inevitable a CCR a una edad de 35-40 años,

significativamente más precoz que los cánceres esporádicos. La localización más frecuente de los tumores es el colon izquierdo (70-80%) (Laurent S et al. 2011). Además puede asociarse a ella un amplio espectro de alteraciones en otros órganos, como la afectación del tracto digestivo superior (pólipos gástricos o en duodeno en un 90%), tumores desmoides, quistes epidérmicos, cáncer de tiroides, meduloblastomas, hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina o hepatoblastomas (Perea J et al. 2009, Jaspersen KW et al. 2010, Balmaña J et al. 2010).

Numerosos estudios han establecido que existe una correlación genotipo-fenotipo de las mutaciones a nivel del gen *APC*, que condicionan el espectro clínico de la enfermedad. Los portadores de mutaciones a nivel del codon 1309 se relacionan con un fenotipo más severo, con el desarrollo de mayor número de pólipos, mayor riesgo de pólipos rectales y a una edad más precoz; mientras que mutaciones en el extremo 5' del gen *APC* se asocia a menor número de pólipos, menor riesgo de pólipos rectales y a una edad más tardía de inicio (Bertario L et al. 2003, Castells y Marzo 2009).

En la PAF el riesgo de malignización es del 100%. Por ello, se requieren estrategias de manejo diferente, no solo en el seguimiento de los pacientes, también respecto a la posibilidad de quimioprotección (sulindac) y de tratamiento quirúrgico. La cirugía profiláctica es necesaria en estos pacientes por tanto, para prevenir el desarrollo de CCR.

La Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada (PAFA) es una variante menos severa. Se describe por la presencia de una media de 30 pólipos adenomatosos en el colon (siempre menos de 100), con mayor tendencia de desarrollar neoplasias en colon derecho y a una edad de presentación del CCR más tardía que en la PAF clásica (edad media de 50-52 años). Las manifestaciones del tracto digestivo superior suelen ser

equivalentes a la PAF, mientras que las restantes son menos frecuentes. Solo en alrededor del 10% de los casos se identifica mutación a nivel de *APC*, localizándose con mayor frecuencia en los extremos 3' y 5' del gen, y en exon 9 (Jasperson KW et al. 2010).

Un 30% aproximadamente de las familias con adenomas múltiples (15-100) que no presentan mutación en el gen *APC* sí lo hacen en el gen *MYH*. Este síndrome se conoce como Poliposis asociada a MYH. La Poliposis asociada a MYH es una enfermedad autonómica recesiva debida a la presencia de mutaciones bialélicas germinales en el gen *MYH*. Desde el punto de vista clínico, pueden aparecer tanto pólipos adenomatosos como hiperplásicos, con un riesgo aumentado de CCR y sin una predilección especial por alguna localización del colon. Las manifestaciones extracolónicas son similares a las relacionadas con la PAF. Debido a su similitud con la PAFA desde el punto de vista fenotípico, se debe de llevar a cabo el test genético en todos los individuos con más de 10 adenomas colorrectales sin mutación en el gen *APC* (Balmaña J et al. 2010, Jasperson KW et al. 2010).

El síndrome de Gardner también es una variante de la PAF en la que, además de la aparición de los pólipos colorrectales, también aparecen una variedad de manifestaciones extraclónicas, entre las que se encuentran los osteomas (sobre todo en cráneo y mandíbula), alteraciones dentales, quistes epidérmicos, fibromatosis retroperitoneal o mesentérica, etc.

Por último, el síndrome de Turcot es otra variante de la PAF en la cual se desarrollan tumores del sistema nervioso central, generalmente gliomas malignos o meduloblastomas. Es debido a mutaciones en *APC*, aunque también se han descrito

casos asociados a mutaciones en los genes reparadores del ADN, relacionados con el SL.

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

El cribado de los casos de PAF asintomática en comparación con aquellos en que el diagnóstico del CCR se efectúa en fase sintomática reduce la mortalidad por la neoplasia (Dunlop 2002, Giardiello FM et al. 2001, Grady et al. 2003). A los familiares con riesgo (individuos portadores de mutaciones y los pertenecientes a familias con PAF en la que no ha sido posible identificar la mutación causal) se debe de realizar una sigmoidoscopia cada 1-2 años a partir de los 13-15 años y hasta los 40 años de edad, y cada 5 años, hasta los 50-60 años. Si se sospecha PAFA, el cribado debe de iniciarse alrededor de los 15- 25 años, en función de la edad de presentación de la enfermedad en los familiares afectos. En este caso la colonoscopia debe ser completa, por la tendencia a localizarse en el colon derecho. Tanto en la PAF como en la PAFA, una vez detectada la presencia de adenomas, debe de realizarse una colonoscopia anual hasta la realización de tratamiento definitivo (Castells y Marzo 2009).

El análisis genético de *APC* permite el diagnóstico presintomático de familiares en riesgo; ello ayuda a racionalizar el cribado familiar, y realizar seguimiento endoscópico únicamente en los miembros portadores de mutaciones.

### 3.2.3. Tratamiento de la afectación colorrectal.

Ya se ha señalado que la PAF es el único síndrome en el que queda establecido la necesidad de realizar tratamiento profiláctico. La elección de la técnica quirúrgica (proctocolectomía con reservorio ileal y anastomosis ileoanal o colectomía con anastomosis ileorrectal) dependerá de variables del individuo, enfermedad, o por las

complicaciones e impacto en la calidad de vida (Jasperson KW et al. 2010) (Perea J et al. 2009). La técnica quirúrgica que se ha utilizado más frecuentemente es la proctocolectomía total con anastomosis ileoanal con reservorio. El mayor conocimiento genético de la enfermedad permite que, actualmente, se empiece a dirigir el tratamiento hacia un manejo individualizado, basado en la correlación entre el genotipo y el fenotipo (Friedl W et al. 2001, Nieuwenhuis MH et al. 2007).

En los pacientes que se han sometido a cirugías que no han extirpado por completo la mucosa del colon, se debe mantener un seguimiento periódico de la misma cada 6 meses. Para los reservorios ileoanales, puesto que existe también cierto riesgo, siempre menor, de aparición de nuevos pólipos, se realizará a intervalos de 1-3 años.

La administración de AINES (sulindac, celecoxib) en la PAF sólo está aceptada como terapia adyuvante a la cirugía en pacientes con pólipos residuales y nunca como alternativa a ésta (Castells y Marzo 2009).

### **3.3 Otros síndromes.**

Existen otros síndromes de CCR hereditario, como el Síndrome de Peutz-Jeghers, autosómico dominante, que se caracteriza por el desarrollo de pólipos hamartomatosos, pigmentación mucocutánea y un riesgo mayor de presentar diferentes tumores. También, la Poliposis Juvenil Familiar y la Poliposis hiperplásica, con un riesgo incrementado de desarrollar CCR, así como otras manifestaciones extracolónicas.

El Cáncer colorrectal familiar tipo X, es un grupo de casos que cumplen los criterios clínicos de Ámsterdam pero no presentan alteraciones en el sistema de reparación del ADN. Presentan agregación familiar, un riesgo aumentado de CCR y una serie de características clínicas que le diferencian del SL, como son ausencia de

aumento de riesgo para otro tipo de neoplasia, una edad mayor al diagnóstico, mayor preferencia por el colon izquierdo, y una mayor aparición de pólipos durante el seguimiento, con una transformación maligna más lenta. Su componente hereditario aún se desconoce.

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

El CCR de aparición precoz es infrecuente, con una incidencia de 2- 8% de todos los CCR. Sin embargo, cada vez es mayor, como muestran las tasas de incidencia de CCR entre los 20-49 años de edad, alcanzando 1,5% por año en los hombres y 1,6 % en las mujeres desde 1992 a 2005. La creciente incidencia del CCR en adultos jóvenes contrasta con la progresiva disminución entre las personas mayores; ello sugiere la importancia de una evaluación precoz en aquellos casos de adultos jóvenes con una sintomatología compatible (Boyle y Ferlay. 2005, Siegel RL et al. 2009).

El CCR de aparición precoz es un grupo heterogéneo, que incluye desde casos con un importante componente familiar hasta otros que son esporádicos. Se conoce que son diferentes alteraciones moleculares las que contribuyen a esta aparente características clinicopatológicas, familiares y pronósticas (Perea J et al. 2011).

Actualmente, hay algunos aspectos controvertidos en la historia natural y el pronóstico del CCR de inicio precoz. Además, diferentes estudios insisten en la existencia de diferencias clínicas y patológicas cuando se compara con el CCR en el anciano (Losi L et al. 2005, Fairley TL et al. 2006).

De forma global, el CCR de aparición precoz se caracteriza clínica y patológicamente por un predominio de tumores de bajo grado de diferenciación, mucinosos o con mayor porcentaje de células en anillo de sello. Asocian un mayor

porcentaje de tumores sincrónicos y/o metacrónicos; mayor desarrollo de pólipos durante el seguimiento y mayor agregación familiar. En cuanto a la localización del tumor, las series publicadas difieren en su ubicación. Mientras que unas muestran un predominio por el colon izquierdo y recto, otras series destacan una mayor proporción de tumores a nivel del colon derecho (Issa JP et al. 2004, Goel A et al. 2010).

Desde el punto de vista molecular, se han descrito dos grupos de este tipo de neoplasias. Por un lado, la proporción de casos que presentan IMS y se relacionan con el SL; y por otro lado, los casos que presentan alteraciones moleculares que se relacionan con la vía de carcinogénesis asociada a la INC, y presentan EMS.

En el primer grupo, relacionado con la vía de carcinogénesis de la IMS, como corresponde, la frecuencia de casos de CCR con componente familiar o hereditario es mayor. La proporción de tumores de aparición precoz con IMS varía entre 19,7% y 41%, dependiendo de la edad de inicio (Losi L et al. 2005, Liang JT et al. 2003), y se estima que el SL causa un tercio de los casos (Samowitz WS et al. 2001). La edad precoz de desarrollo de CCR se considera un marcador de componente hereditario potencial; y por ello, junto con otras características, se propone como herramienta efectiva para identificar el SL (Perea J et al. 2011). En un porcentaje menor de casos, la IMS es consecuencia de la hipermetilación del promotor del gen *MLH1*, y se relaciona con la vía de carcinogénesis conocida como FM.

El CCR de edad precoz con IMS presenta unas características clínicas y patológicas similares a las descritas para el SL: inicio precoz, predominio por el colon derecho, mayor frecuencia de tumores sincrónicos y metacrónicos, y mayor proporción de CCR pobremente diferenciados, mucinosos y con células en “anillo de sello”. El pronóstico de estos es mejor respecto a los estables. Hasta hace pocos años, el estudio

del CCR de aparición precoz se centraba en este tipo de tumores, al centrarse los estudios en el componente hereditario que presentan estos tumores de este rango de edad.

Sin embargo, en dichos estudios llamaba la atención la alta proporción de casos que no presentaban características clínicas y moleculares relacionadas con el SL. En este otro extremo se encuentran aquellos CCRs de inicio precoz que presentan predominio de la vía de la INC, con EMS en el CCR. Este grupo presentaría una edad más tardía de inicio, menor predominio por colon derecho y menor porcentaje de CCRs sincrónicos y metacrónicos, así como un diagnóstico en estadios extremos. En comparación con los CCR con EMS en ancianos, presentan mayor predominio por el colon izquierdo y recto, mayor frecuencia de tumores mucinosos o con células en anillo de sello; y mayor agregación familiar y con tumores tipo Lynch.

De igual forma que recientemente para el CCR en general, se ha encontrado que algunos de los tumores con EMS no presentan INC, también parece que existiría dicha categoría en los jóvenes. Este subgrupo que se asocia con peor pronóstico, fenotipo invasivo, metástasis temprana y mayor agregación familiar, podría estar en relación, además, con nuevos síndromes de CCR hereditarios (como el síndrome de CCR familiar tipo X), y con otras alteraciones moleculares como la mutación del gen *KRAS*, fenotipo metilador y la mutación en *BRAF* (Hawkins NJ et al. 2001, Chan TL et al. 2001, Banerjee A et al. 2009).

En resumen, existe la necesidad de llevar a cabo un estudio más exhaustivo del CCR en el adulto joven, para identificar las bases moleculares del CCR en este rango de edad, con el fin de identificar, entre otros elementos, posibles características propias de esta categoría dentro del CCR. Se trataría de definir características anatómico-clínicas y

moleculares del CCR en este grupo de población, y además, poder contestar las cuestiones que surgen, por tanto, de lo antes descrito: ¿Las características del CCR en el adulto joven son semejantes al CCR esporádico, o al relacionado con el síndrome de Lynch? ¿O en realidad existen dos grupos bien diferenciados? Más aún: ¿Es posible que al compararlos con un grupo más amplio de CCR, tal vez de diferente edad de aparición, existieran características diferenciadoras del CCR de inicio precoz? Ante estos últimos desafíos, se hace indispensable el primer paso, que no es otro que el de caracterizar adecuadamente las diferentes vías de carcinogénesis dentro del CCR de aparición precoz, así como su correlato anatomoclínico y familiar.

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---



### II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La incidencia del CCR en el adulto joven está en aumento, lo que supone un impacto notable en la población a la que afecta. En un principio, la edad de aparición precoz del CCR hizo que este subgrupo de neoplasias se asociara a formas hereditarias del mismo, como el SL, y todos los estudios se encaminaron a dicho componente hereditario. Sin embargo, poco a poco, se ha ido confirmando que las formas hereditarias de CCR son un pequeño porcentaje. Por tanto, partimos de la premisa de que el CCR de aparición precoz es un grupo heterogéneo, en el que no sólo se incluyen casos con importante componente familiar.

Por otro lado, tres son las vías principales de carcinogénesis colorrectal que se han identificado: la vía mutadora o de IMS, la vía de INC o vía supresora, y la más reciente, la vía del FM. Sin embargo, a pesar de la referida heterogeneidad del grupo de

aparición precoz de CCR, aún no se han analizado por completo las tres vías de carcinogénesis dentro de este subgrupo, y mucho menos su correlación fenotípica.

En el presente trabajo se han analizado los datos clínicos, anatómo-patológicos, familiares, inmunohistoquímicos y moleculares de una serie de pacientes pertenecientes al Hospital Universitario Doce de Octubre, con un diagnóstico de Cáncer Colorrectal intervenido a una edad menor o igual a 45 años. Los objetivos que nos hemos propuestos son:

1. Identificar las características clínicas, anatómo-patológicas, familiares y moleculares de este subgrupo de población en nuestro medio.
2. Valorar la implicación de cada una de las vías de carcinogénesis colorrectal dentro del grupo de aparición precoz.
3. Describir las características diferenciales clínico patológicas, familiares y moleculares del CCR de inicio precoz según su vía de carcinogénesis:
  - a. Valorar rasgos diferenciales entre los tumores que presentan IMS y EMS.
  - b. Valorar rasgos diferenciales entre los tumores según la vía del FM.
  - c. Valorar rasgos diferenciales entre los tumores que presentan IMS, INC y MACS.
4. Caracterizar los CCR en este subgrupo de población según la clasificación molecular, basándonos en su estado de inestabilidad y de metilación.

5. Identificar las diferencias anatomoclínicas y familiares en función de la localización del CCR.



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

---



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. SUJETO DE ESTUDIO.

##### **1.1. Procedencia.**

Los sujetos del estudio fueron identificados a partir del Registro de Tumores del Hospital Universitario 12 de Octubre, de Madrid, con el siguiente criterio de inclusión: intervenidos con el diagnóstico de CCR a una edad igual o inferior a 45 años. El periodo de tiempo estudiado fue desde Enero de 2002 a Diciembre de 2008.

##### **1.2. Información recogida.**

###### 1.2.1. Información clínica.

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

- Datos clínicos:

- Sexo.
- Edad al diagnóstico.
- Datos anatomo-patológicos:
  - Localización del tumor colorrectal:
    - Derecha o proximal (desde el ciego hasta el ángulo esplénico).
    - Izquierda o distal (desde el colon descendente hasta el sigma).
    - Recto o unión recto-sigmoidea.
  - Grado histológico de diferenciación: bien, moderado, pobre.
  - Producción de moco (mucinoso, con células en anillo de sello).
  - Estadío de Astler-Coller modificado.
  - Clasificación TNM.
  - Presencia de otros CCR sincrónicos o metacrónicos.
  - Presencia de pólipos en colon, asociados, antes o después del CCR; tipo y número.
- Datos evolutivos:
  - Presencia de neoplasias relacionadas con el SL.
  - Presencia de otras neoplasias no relacionadas.

#### 1.2.2. Información familiar.

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

Más adelante, en los casos en los que, como se verá posteriormente, el estudio de la IMS resultaba positivo y/o cumplía criterios clínicos de Ámsterdam II para el SL, se volvía a contactar de nuevo con ellos para obtener una muestra de sangre periférica para el estudio de posibles mutaciones de los genes de reparación de errores en el ADN más frecuentes, *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*. En el caso de que el *probandus* hubiera fallecido, se recogía la muestra del familiar más cercano que hubiera desarrollado CCR o una neoplasia relacionada con el SL a una edad más temprana, obteniendo a su vez el consentimiento para el mencionado estudio.

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

- Sospecha de SL, en aquellos casos en que se cumplen los criterios clínicos de Ámsterdam.

- Agregación familiar para neoplasias relacionadas con el SL, independientemente de la presencia o no de neoplasia no relacionadas con dicho síndrome.
- Agregación familiar para neoplasias no asociadas con el SL, cuando sólo existe agregación a 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 hay antecedentes familiares de cánceres asociados al SL.

## 2. MUESTRAS

### 2.1. Líquidos biológicos.

#### 2.1.1. Sangre periférica.

Como se ha mencionado previamente, sólo en los casos en que la muestra del tumor presentaba IMS y/o la familia cumpliera criterios de Ámsterdam II, se obtuvo una muestra de sangre periférica (15 ml en EDTA) del probando afectado por cáncer colorrectal y/o por un cáncer asociado al 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.

#### 2.1.1.1. *Extracción manual.*

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

- Se agita con el fin de disgregar el botón de células, para a continuación colocar en incubadora toda la noche a 37°C.
- Se añaden 1'33-2'33 cc de NaCl según los volúmenes usados para la lisis, con el objetivo de precipitar el ADN. Posteriormente se agita y se centrifuga, variando tan sólo el parámetro de tiempo, que de 15 minutos pasa a 30 minutos. Realizado esto, se sitúa el sobrenadante en un tubo distinto.
- Se añaden dos volúmenes de alcohol etílico absoluto respecto a la cantidad de tampón de lisis de leucocitos empleado, para luego agitar con suavidad, hasta lograr apreciar el ovillo de ADN.
- Con una pipeta Pasteur esterilizada con el extremo en forma de gancho, se coge el ovillo, y se pasa por dos tubos, uno después del otro, de etanol frío al 70%. Mediante esta maniobra se eliminan impurezas. Se deja secar unos instantes para eliminar los restos del etanol.
- Se resuspende en Tris-EDTA (TE) 1:0'1 a pH 8 (solución amortiguadora) o en agua destilada estéril. Se busca la correcta disolución del ADN, por lo que se agita con suavidad durante dos horas a 37°C.

#### 2.1.1.2. Extracción automática.

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

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

- 0'115 cc de solución de Proteinasa K, que logra la digestión de proteínas.

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

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

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

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

Con este tejido se realizó el análisis de la IMS, así como la 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 trata de separar el tejido tumoral del sano en dos bloques distintos.

#### 2.2.1. Tinción hematoxilina-eosina.

- Tomando el bloque de tejido incluido en parafina, se realiza un corte de 3  $\mu\text{m}$  con un microtomo.
- Se incuba a 70°C durante una hora.
- Se añade xilol a la muestra con objeto de desparafinar, durante 2 minutos, dos veces.
- Se hidrata la muestra con etanol en dos fases. La primera con etanol absoluto durante 2 minutos, y la segunda, al 95% durante el mismo período de tiempo.
- Se lava con agua destilada otros dos minutos.
- Durante 15 minutos se tiñe con hematoxilina de Mayer.
- Se vuelve a lavar mediante el mismo procedimiento previo.
- Se tiñe con eosina durante 2 minutos.
- Se añade etanol al 70% con el fin de eliminar los restos de eosina.
- Por medio de varios pasos sucesivos, se deshidrata la muestra, con etanol al 96% (30 segundos), absoluto (2 minutos), y xilol (2 minutos, dos veces).
- Por último, se monta el cubre con Eukitt o DPX.

#### 2.2.2. Extracción de ADN.

- Se colocan tres cortes de 10  $\mu\text{m}$  de tejido en un tubo de 1'5 cc.

- Mediante 1 cc de xilol, incubando 5 minutos a 65°C, se centrifuga a 12.000 rpm 10 minutos, con el fin de desparafinar. Después se retira el sobrenadante.
- Si todavía quedan restos, se repite el paso anterior.
- Se añade 1 cc de etanol absoluto y se incuba 5 minutos a 65°C.
- Se centrifuga con los mismos parámetros previos y se retira el sobrenadante.
- Se añade 1 cc de etanol, aunque ahora al 50%, y se incuba 5 minutos a 65°C.
- Se realiza la misma operación de centrifugado, retirando el sobrenadante, para posteriormente dejar secar hasta que no queden restos de etanol.
- Se añaden 400 µl de tampón (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 2'5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0'45% *Nonidet P40*, 4'5% *Tween 20*) y 40 µl (1/10 de volumen de tampón) de Proteinasa K (10 mg/ml).
- Se incuba a 55°C, el tiempo necesario hasta que no se observen restos de tejido.
- Si pese a los pasos previos, y tras varias horas de incubación, quedan restos sin digerir, se debe añadir cantidades equivalentes de tampón y Proteinasa K, o centrifugar brevemente y separar el sobrenadante.
- A continuación se coloca el sobrenadante en un tubo de purificación *Phase Lock Gel™ 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).

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

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

- Se aplica la fórmula siguiente para el cálculo de la concentración:

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

C: la concentración ( $\mu\text{g/ml}$ );  $\text{Abs}_{260}$ : absorbancia de la muestra a 260 nm;

L: coeficiente de extinción molar bicatenario ( $0,02 \mu\text{g/ml}$ ).

- 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

##### 4.1. 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 III.1).

| 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         |

**Tabla III.1.** 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).

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:

- *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

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

- ADN (200 ng).....X
- H<sub>2</sub>O destilada y estéril (hasta volumen final 25 µl).....Y

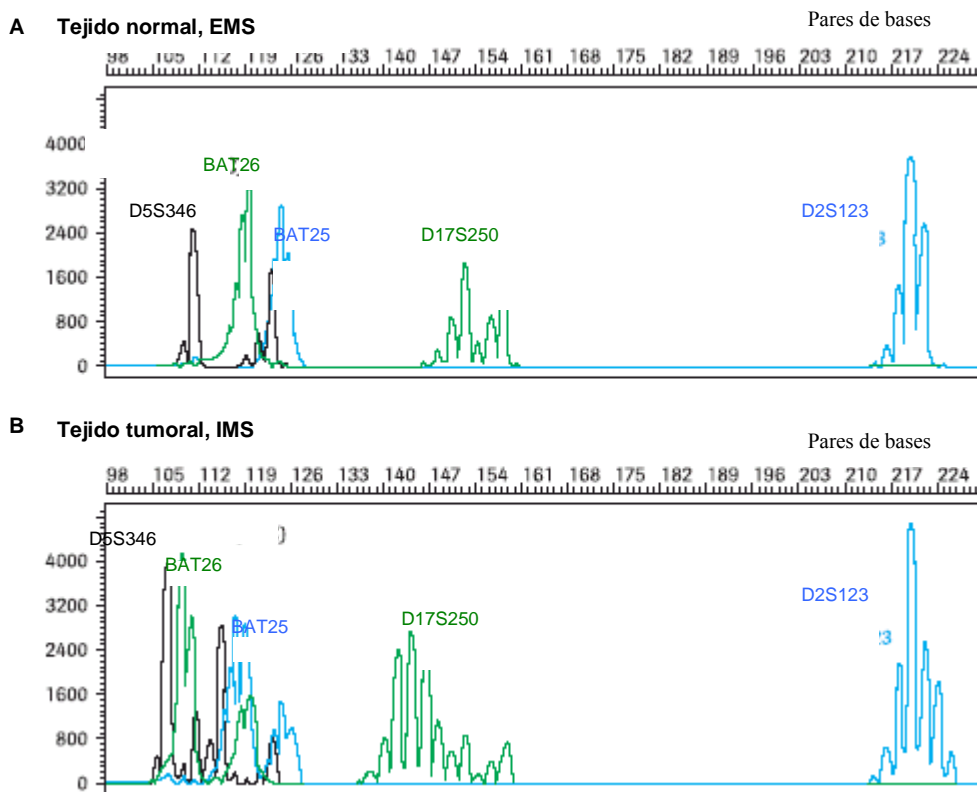
Siendo X el volumen de la dilución de ADN necesario para tener una cantidad de éste de 200 ng. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 25 µl, dependerá del valor de X.

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 III.1).



**Figura III.1.** 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  $\geq 2$  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 desnaturalizante (Guldberg P y Guttler 1993, Makec M et al.1997).

La PCR empleada es la descrita por Wijnen et al., con diversas modificaciones, tanto los cebadores y las condiciones de la PCR, como las de la electroforesis (Wijnen J 1996, Wijnen J 1995). (Tablas III.2 y III.3).

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' - GCCAGTCGACGTTGTAACGACG - 3'

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

**Tabla III.2.** Estudio de mutaciones del gen MLH1. Cebadores empleados para la amplificación de los exones y regiones intrónicas adyacentes, tamaños de los fragmentos amplificados en pares de bases y condiciones desnaturalizantes de los geles.

| Exón | Cebadores  | Tamaño (pb) | Gradiente desnaturizante |
|------|--|-------------|--------------------------|
| 1    | (M13) 5' - TCGCGCATTTTCTTCAACC - 3'<br>(Pinza CG) 5' - GTCCCTCCCCAGCACGC - 3'                | 277         | 50-70%                   |
| 2    | (Pinza CG) 5' - TTGAACATGTAATATCTCAAATCTGT - 3'<br>(M13) 5' - AAAGGAAGATAATTACCTTATATGC - 3' | 283         | 15-50%                   |
| 3    | (M13) 5' - TCAAGAGTTTGTAAATTTTAAAA - 3'<br>(Pinza CG) 5' - CTAGGCCTGGAATCTCCTCT - 3'         | 421         | 30-50%                   |
| 4    | (Pinza CG) 5' - TTCCTTTTTCATAGTAGTTTAAAC - 3'<br>(M13) 5' - TTGTAATTCACATTTATAATCCATG - 3'   | 280         | 15-50%                   |
| 5    | (M13) 5' -CCAGATGGTATAGAAATCTTCG - 3'<br>(Pinza CG) 5' - CCATTCAACATTTTTAACCCTT - 3'         | 308         | 15-30%                   |
| 6    | (M13) 5' - GCTTGCCATTCTTTCTATTTTATT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - GCAGGTTACATAAAACTAACGAAAAG - 3'  | 277         | 30-50%                   |
| 7    | (M13) 5' - CATTAATTCAGTTAATTTATTTCA - 3'<br>(Pinza CG) 5' - AAAACAAAATCACTTGTTACCTTCA - 3'   | 309         | 30-50%                   |
| 8    | (M13) 5' - TGAGATCTTTTTATTTGTTTGT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - TTTGCTTTTTAAAAATAACTACTGC - 3'     | 263         | 15-50%                   |
| 9    | (M13) 5' - GGATTTTGTCACTTTGTTCTGTT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - TCCAACCTCCAATGACCCAT - 3'         | 241         | 30-50%                   |
| 10   | (M13) 5' - TGGAATACTTTTTCTTTCTTCTT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - GCATTTAGGGAATTAATAAAGGG - 3'      | 298         | 30-40%                   |
| 11   | (Pinza CG) 5' - ATAAAACACTGTTATTTTCGATTTGCA - 3'<br>(M13) 5' - CCAGGTGACATTCAGAACATT - 3'    | 227         | 30-50%                   |
| 12   | (Pinza CG) 5' - TTATTATTCAGTATTCCTGTGTACA - 3'<br>(M13) 5' - CCCACAAAGCCCAAAAACC - 3'        | 388         | 30-50%                   |
| 13   | (Pinza CG) 5' - ATAATTTGTTTTGTAGGCCCC - 3'<br>(M13) 5' - TTTCTATCTTCAAGGGACTAGGAG - 3'       | 318         | 30-50%                   |
| 14   | (Pinza CG) 5' - CCACATTTTATGTGATGGGAA - 3'<br>(M13) 5' - CCAATAGTACATACCTTTCTTACC - 3'       | 370         | 30-50%                   |
| 15   | (M13) 5' - GTCCCTCACGCTTCCC - 3'<br>(Pinza CG) 5' - AAACATGAAAACAACTGACAAAC - 3'             | 295         | 30-50%                   |
| 16   | (M13) 5' - AATGGGACATTCACATGTGTT - 3'<br>(Pinza CG) 5' - CCATGGGCACTGACAGTTAA - 3'           | 369         | 15-30%                   |

**Tabla III.3.** 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 desnaturizantes de los geles.

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

- Tampón PCR 10X (BioTaq) 2'5 µl
- dNTPs (1'25 mM) 2 µl

- Cebador sentido (10  $\mu$ M) 2'5  $\mu$ l
- Cebador antisentido (10  $\mu$ M) 2'5  $\mu$ l
- ADN (50 ng) X
- ADN Taq polimerasa (1 U) (BioTaq) 2  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O destilada (hasta volumen final 25  $\mu$ 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  $\mu$ l, y por tanto, depende de X.

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

|                |   |
|----------------|---|
| 94°C.....5'    |   |
| 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](http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/docs//mut_nom.html).

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

El estudio de grandes deleciones genómicas de los genes *MLH1* y *MSH2* se realiza mediante la técnica de amplificación por PCR *multiplex* dependiente de ligación (*MLPA*). SALSA P003 *MLH1/MSH2* es la forma comercial de *MLPA* para el estudio completo de los exones de los genes *MLH1* y *MSH2* (MRC-Holland, Ámsterdam, Holanda). Presenta una mezcla de 42 sondas diferentes: una para cada uno de los 19 exones de *MLH1*, una para cada uno de los 16 exones de *MSH2* y 7 sondas que se utilizan como controles, y que corresponden a otros genes humanos localizados en distintos cromosomas (Tabla III.4).

| Longitud<br>(nucleótidos) | Sonda MLPA                   | Posición cromosómica |             |             |
|---------------------------|------------------------------|----------------------|-------------|-------------|
|                           |                              | Control              | <i>MLH1</i> | <i>MSH2</i> |
| 94                        | Sonda control sintética      | 2q14                 |             |             |
| 130                       | Sonda control 0797-L0463     | 5q31                 |             |             |
| 136                       | Sonda control 0981-L0566     | 10p11                |             |             |
| 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 |                      | Exon5       |             |
| 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                |             |             |

**Tabla III.4.** 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

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  $\mu$ l.
- La mezcla se desnaturaliza en un termociclador a 98°C durante 5 minutos y atemperar a 25°C.
- Se añade posteriormente 1'5  $\mu$ l de la mezcla de sondas SALSA y 1'5  $\mu$ 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  $\mu$ l de Tampón A de la Ligasa 65.
  - 3  $\mu$ l de Tampón B de la Ligasa 65.
  - 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada y estéril.
  - 1  $\mu$ l de Ligasa 65.
- La temperatura del termociclador se lleva hasta 54°C y una vez alcanzada dicha temperatura, se añaden 32  $\mu$ l de la mezcla a cada muestra.
- Por último, se incuban a 54°C durante 15 minutos y posteriormente a 98°C, tan sólo 5 minutos.

C- Reacción de PCR:

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

2 µl de Cebadores SALSA:

Sentido: 5' - \*GGGTTCCCTAAGGGTTGGA - 3'

Antisentido: 5' - GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA - 3'

\*Marcado con fluorocromo.

2 µl de Tampón de Dilución de Enzima.

5'5 µl de H<sub>2</sub>O destilada y estéril.

0'5 µl de ADN Taq Polimerasa SALSA.

- En otros tubos de 0'2µl se añade:

4 µl de Tampón SALSA de PCR 10X.

26 µl de H<sub>2</sub>O destilada y estéril.

10µl de la reacción de ligación.

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

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

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

#### D- Visualización:

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

### 5.3. *MSH6*

El estudio de mutaciones del gen *MSH6* se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (*dHPLC*) en condiciones parcialmente desnaturizantes. 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).

#### 5.3.1. 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 III.5 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
- MgCl<sub>2</sub> .....1'5 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
- H<sub>2</sub>O 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 III.5):

Tiempos “largos”:

|                               |   |           |
|-------------------------------|---|-----------|
| 95°C.....5'                   | } | 40 ciclos |
| 95°C.....30"                  |   |           |
| “T <sup>a</sup> PCR” .....30" |   |           |
| 72°C.....45"                  |   |           |
| 72°C.....7'                   |   |           |

Tiempos “intermedios”:

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| 95°C.....5’  |   |           |
| 95°C.....30” | } | 5 ciclos  |
| 50°C.....30” |   |           |
| 72°C.....30” |   |           |
| 95°C.....30” | } | 5 ciclos  |
| 52°C.....30” |   |           |
| 72°C.....30” | } | 25 ciclos |
| 95°C.....30” |   |           |
| 55°C.....30” |   |           |
| 72°C.....30” |   |           |
| 72°C.....7’  |   |           |

Tiempos “cortos”:

|                              |   |           |
|------------------------------|---|-----------|
| 95°C.....5’                  |   |           |
| 95°C.....30”                 | } | 35 ciclos |
| “T <sup>a</sup> PCR”. ...30” |   |           |
| 72°C.....45”                 |   |           |
| 72°C.....7’                  |   |           |

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

| Exón-<br>fragmento | Cebadores  | Tamaño<br>(pb) | Tiempos<br>PCR | Tª PCR<br>(°C) | Tª<br>DHPLC<br>(°C) |
|--------------------|--|----------------|----------------|----------------|---------------------|
| 1A                 | 5' - TCCGTCCGACAGAACGGTTG - 3'<br>5' - TTCGCGTGAGGCCCTGGCCGA -<br>3'         | 129            | Largo          | 55             | 66'0                |
| 1B                 | 5' - CGCTGAGTGATGCCAACAAAG - 3'<br>5' - CAACCCCCTGTGCGAGCCTC - 3'            | 300            | Largo          | 48             | 67'1                |
| 2                  | 5' - AACTAAGTTATGTATTTTCCT - 3'<br>5' - CCTGTCTGTCTGTTTCTCTC - 3'            | 300            | Intermedio     | 55             | 59'4                |
| 3 <sup>a</sup>     | 5' - GAACTGCTGGGATTACAGGC - 3'<br>5' - GTATTCAGGCTTTGCACTG - 3'              | 130            | Corto          | 63             | 59'1                |
| 3B                 | 5' - CCCAGAAGGGAGGTCATTTT - 3'<br>5' - CCCCATCACCCCTAACATAAA - 3'            | 200            | Largo          | 55             | 58'6                |
| 4 <sup>a</sup>     | 5' - CCAAATTTTGATTTGTTTTT - 3'<br>5' - CCACATCAGAGCCACCAATG - 3'             | 207            | Largo          | 55             | 58'3                |
| 4B                 | 5' - CGAAGGGTCATATCAGATTC - 3'<br>5' - ATACCAAACAGTAGGGCGAC - 3'             | 357            | Largo          | 55             | 59'0                |
| 4C                 | 5' - CGTTAGTGGAGGTGGTGATG - 3'<br>5' - ATGAATACCAGCCCCAGTTC - 3'             | 303            | Corto          | 55             | 58'4                |
| 4D                 | 5' - CTGTACCACATGGATGCTCT - 3'<br>5' - CTTCTCTTTTTCTTTGAGG - 3'              | 304            | Corto          | 48             | 58'5                |
| 4E                 | 5' - CCTCTGAGAACTACAGTAAG - 3'<br>5' - CCAAAACTGGGAGCCGGGTA - 3'             | 293            | Corto          | 50             | 57'1                |
| 4F                 | 5' - CTGTTCTTTCAGGAAGGTC - 3'<br>5' - AGCCATTGATAAAAAGCTCCT - 3'             | 271            | Corto          | 55             | 58'5                |
| 4G                 | 5' - CCTCAAAAATGCCTTATTG - 3'<br>5' - AGCCATTGCTTTAGGAGCCG - 3'              | 304            | Corto          | 55             | 56'7                |
| 4H                 | 5' - ACTTGCCATACTCCTTTTGG - 3'<br>5' - TCCAGAGCAGAAAAGAAAATC - 3'            | 299            | Corto          | 48             | 57'7                |
| 4I                 | 5' - CTACATACAGCAAGAAGAAG - 3'<br>5' - CCTGCTTTGGGAGTAATAAG - 3'             | 253            | Largo          | 55             | 56'0                |
| 4J                 | 5' - GAAAAGGCTCGAAAGACTGG - 3'<br>5' - TCGTTTACAGCCCTTCTTGG - 3'             | 230            | Corto          | 45             | 59'1                |
| 4K                 | 5' - GAAGAATACGACTTGAAATC - 3'<br>5' - GCACTACTTATCAAAGCCTG - 3'             | 244            | Corto          | 46             | 57'6                |
| 5 <sup>a</sup>     | 5' - AAAACCCCCAAACGATGAAG -<br>3'<br>5' - GTCTTCGTAATGCAAGGATG - 3'          | 220            | Corto          | 60             | 59'2                |
| 5B                 | 5' - CTTAGAGCTTAAAGGATCAC - 3'<br>5' - CTTTCTGATAACAAAACCTT - 3'             | 208            | Largo          | 54             | 57'1                |
| 6                  | 5' - CTTTATGAAACTGTTACTACC -<br>3'<br>5' - GCAAATATCTTTTATCACAT - 3'         | 237            | Corto          | 50             | 56'6                |
| 7                  | 5' - GAGTATTCATTTGTGATTTT - 3'<br>5' -<br>AAATGTTTTTAAGATAGATAGTCTTC<br>- 3' | 171            | Corto          | 50             | 53'7                |

| Exón-fragmento | Cebadores  | Tamaño (pb) | Tiempos PCR | Tª PCR (°C) | Tª DHPLC (°C) |
|----------------|--|-------------|-------------|-------------|---------------|
| 8              | 5' - CCTTTTTTGTTTTAATTCCT - 3'<br>5' - CAAGAGAAGTGCCCTCTCAA - 3' | 268         | Corto       | 50          | 56'4          |
| 9              | 5' - TTTTGAGAGGGCACTTCTCT - 3'<br>5' - CCCCTTTTACTGTTTCTTTG - 3' | 266         | Corto       | 50          | 57'0          |
| 10             | 5' - ATTTTAAGGGAAGTTTGCC - 3'<br>5' - GTTTATTAGATCATAATGTT - 3'  | 165         | Largo       | 50          | 57'4          |

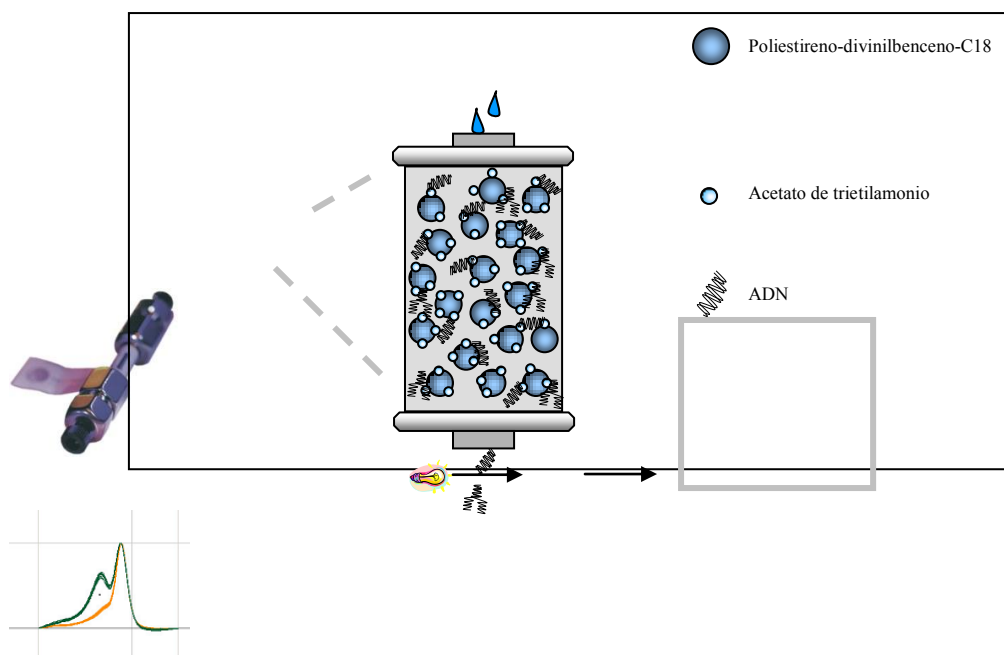
**Tabla III.5.** Cebadores, tamaños de los productos amplificados, condiciones de amplificación y temperaturas de desnaturalización para la cromatografía de alto rendimiento, de cada uno de los fragmentos del gen MSH6.

### 5.3.2. 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.

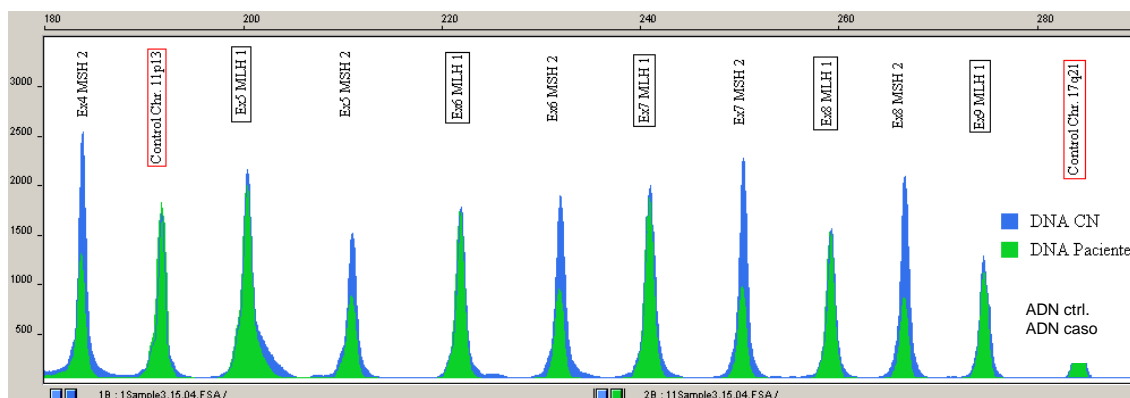
La fase móvil del sistema consiste en una combinación de tampones que extraen el ADN de la columna: TEAA 0'1 M mezclado con acetonitrilo al 25%. A concentraciones mayores de acetonitrilo, la interacción hidrofóbica entre la matriz y el ADN/TEAA se va debilitando y los fragmentos comienzan a salir de 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 III.2.** 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 III.3.** 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.

### 5.3.3 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*, 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 Dye<sup>TM</sup>* y un secuenciador multicapilar *ABI* modelo 3.700.

Se realiza una reacción de secuenciación cíclica de 20  $\mu$ l de volumen final que contiene: 10  $\mu$ M del cebador sentido o antisentido (a elección), 5% de DMSO, 4  $\mu$ l 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>).

#### **5.4. 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.

##### 5.4.1. 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.

#### 5.4.2. 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.

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 µl de ADN a concentración 100 ng/µl.

40 µl de H<sub>2</sub>O destilada.

5'7 µl 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 H<sub>2</sub>O destilada).

Bisulfito sódico 3'03 M pH 5 (3.8 g en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada y 100 µl de NaOH 10 M para ajustar el pH) y protegerlo de la luz.

- Añadir 33 µl de hidroquinona 16'4 mM y 530 µl 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.
- 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.

#### 5.4.3. PCR específicas de presencia y ausencia de metilación

Las secuencias de los cebadores utilizados han sido descritas previamente (Herman et al. 1998). 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 (+MgCl<sub>2</sub>).....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
- H<sub>2</sub>O 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'  
95°C.....5'' } 40 ciclos  
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).

5.4.4. 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'

Antisentido: 5' - AAAAACTATAAAACCCTATACCTAATCTA - 3'

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

- Tampón PCR 10X (+MgCl<sub>2</sub>).....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
- H<sub>2</sub>O 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 µl) se cargan directamente en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se visualiza directamente bajo luz UV.

#### 5.4.4.1. Digestión con enzima de restricción *BstUI*

Entre 2 y 7 µl 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.

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

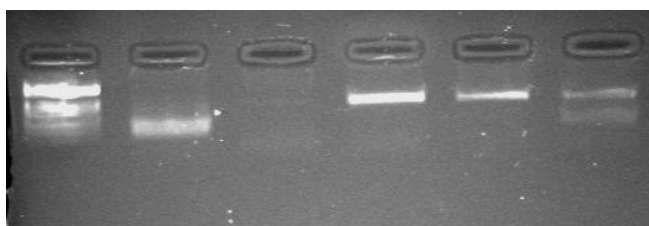
- Tampón 1X NE 2.....1'5 µl

(Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub>10 mM, ditiotretitol 1 mM)

- BstUI (10 U/µl).....0'3 µl
- Producto de PCR.....X
- H<sub>2</sub>O destilada (hasta volumen final 15 µl).....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 µl. El volumen de agua (Y) necesario para completar el volumen total a 15 µl, dependerá del valor de X.

La mezcla se digestión se incuba a 60°C durante 4 horas y se carga todo el volumen (15 µl) 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 III.4).

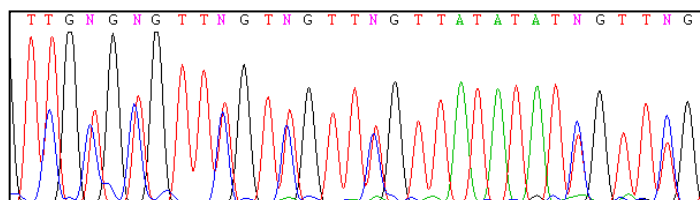


**Figura III.4.** Visualización en gel de agarosa de la técnica combinada de modificación con bisulfito y digestión con la enzima BstUI. A) Marcador de peso molecular M5. B) Control positivo de hipermetilación bialélica del promotor de MLH1: línea de cáncer

5.4.4.2. *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 III.10.** 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  $\mu\text{m}$  de tejido fijado en formol e incluido en parafina durante 12 horas en la estufa a 36°C.
- Posteriormente se hidratan con sucesivos pases de alcoholes durante periodos de tiempo variable: 10 minutos en xileno (2 veces), 5 minutos en etanol al 100%, 5 minutos en etanol al 95%, 5 minutos en etanol al 70% y 2 minutos en agua destilada.
- Se lleva a cabo el desenmascaramiento antigénico por medio de una olla a presión en tampón de citrato sódico 10mmol/l a pH 5'6, durante 3 minutos.
- Se inactiva la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% (solución bloqueante S2023, DAKO, Glostrup, Dinamarca), durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Después se incuba el anticuerpo primario a la dilución adecuada.
- La inmunodetección se realiza con inmunoglobulinas anti-ratón (anticuerpo secundario), biotiniladas, para después realizar la adición de estreptavidina marcada con peroxidasa y de diaminobenzidina como sustrato. Todas las tinciones inmunohistoquímicas fueron llevadas a cabo mediante el robot automatizado *TechMate 500* (DAKO).
- Por último se contratiñen las secciones con hematoxilina de Harry, se lavan y deshidratan a través de sucesivos pases por alcoholes: 30" en etanol al 95%, 30" en etanol al 100%, 10 minutos en xileno y 1 hora en xileno.

Las características de los anticuerpos y las diluciones utilizadas en cada caso, se presentan en la Tabla III.6.

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

**Tabla III.6.** Anticuerpos utilizados, casas comerciales, clones y diluciones utilizadas para realizar la técnica de inmunohistoquímica en cortes de tejido incluido en parafina.

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. 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).

#### 8. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA MEDIANTE ARRAYS DE CGH (*COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDISATION*).

##### **8.1. Cuantificación de ADN**

La cuantificación de ADN suficiente para llevar a cabo el análisis se realizó utilizando el Espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), y la calidad del mismo fue evaluada por la relación de 260:280, y por visualización en gel de agarosa.

#### 8.2. Hibridación genómica comparada mediante “array”.

Hibridación genómica comparada (CGH) se ha realizado mediante microarrays de oligonucleótidos (Roche NimbleGen, Inc., Reykjavik, Islandia), a fin de identificar de alteraciones en el número de copias (Copy number alterCNAS). Todos los microarrays de oligonucleótidos del genoma fueron proporcionados por NimbleGen. Éste contiene 135000000 sondas isotérmicas, 45- a 75-mer, que se extiende por el genoma de la rata a una distancia entre sondas de mediana de 12524bp 0,1 µg de gDNA de cada muestra. La muestra de referencia se marcó usando el NimbleGen. Dual-color kit de marcado de ADN, y se hibridaron a un humano NimbleGen CGH 12x135K. Se extrajeron muestras de ADNg y controles de Promega, que se desnaturalizó en presencia de un cebador marcado Cy3-(prueba) o Cy5 (control) de manera aleatoria, y se incubaron con el fragmento Klenow de ADN polimerasa, junto con dNTP (5 mM de cada dNTP), a 37 ° C durante 2 horas. La reacción concluyó mediante la adición de EDTA 0,5 M (21.5µL), antes de la precipitación con isopropanol y lavado de etanol. Tras la cuantificación, la prueba y las muestras de control emparejados por sexo se combinaron en cantidades equimolares y se aplicaron a una de las doce matrices en los dispositivos de microarrays. La hibridación se llevó a cabo en una Cámara de hibridación NimbleGen Roche por un período de 48 horas. Las láminas fueron lavadas y escaneadas usando un NimbleGen MS 200 Microarray escáner. Archivos de imagen de matriz (Tif) producidos por el 200 Software de recopilación de datos MS fueron importados en DEVA v1.2.1 (Roche NimbleGen Inc) para su análisis. Además, en todos los casos, el análisis de segmentación se realizó mediante segmentación binaria Circular disponible en el software waviCGH, un servidor web para el análisis y comparación de número de copia alteraciones genómicas en el mismo software de múltiples waviCGH

(Carro, A et al.2010). Cada región genómica que exhibía un cambio de número de copia se examinó utilizando el navegador del genoma (<http://genome.ucsc.edu/>) para determinar la ubicación y la importancia del cambio.

Se considera cromosoma estable aquellos con menos de un 20% de segmentos alterados, definiendo como MACS aquellos con 1-4 cromosomas inestables (ganancias y/o pérdidas).

#### 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, se utilizó la prueba de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) 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.

## IV. RESULTADOS

---



### IV. RESULTADOS

#### 1. RESULTADOS GLOBALES.

##### **1.1. Características anatómico-clínicas.**

En el estudio, se parte de un grupo de pacientes diagnosticados e intervenidos por CCR a una edad igual o menor de 45 años en el Hospital Universitario Doce de Octubre, de Madrid. Se han identificado un total de 88 individuos, en el periodo de tiempo comprendido entre Enero de 2002 y Diciembre de 2008.

Se recogieron los datos de las variables descritas en el apartado de Material y Métodos, revisando las historias clínicas de los distintos sujetos.

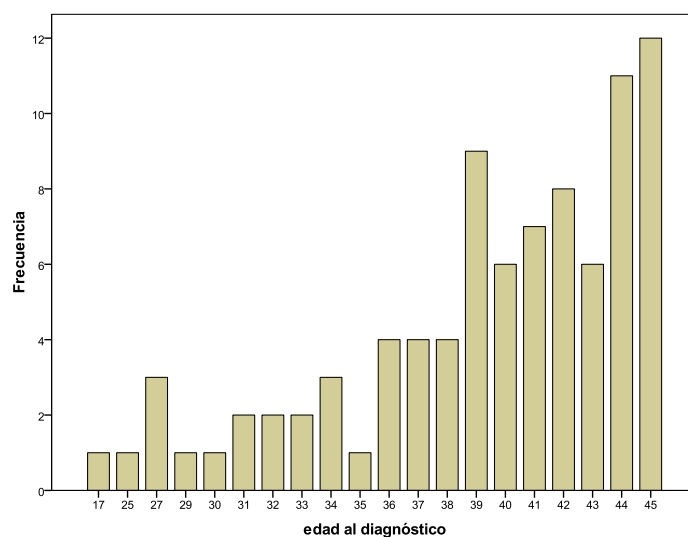
La edad media al diagnóstico es de 39 años, siendo el rango de edades desde los 17 años hasta los 45 años, en que se fija la edad de corte del estudio (Tabla IV.1). En la figura IV.1 se expresa la distribución de CCR por edades de diagnóstico. En cuanto a la

distribución por sexos, existe un predominio en el varón, 60,2% frente a 39,8% de mujeres (Tabla IV.1).

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

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>Edad media al diagnóstico</b> | 39,22 años ( DE: 5,2)                    |
| <b>(Rango)</b>                   | (17-45)                                  |
| <b>Sexo</b>                      | Mujeres: 35(39,8%) / Varones: 53 (60,2%) |

DE: Desviación estándar.



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

Las diferentes localizaciones de los CCR, así como las técnicas quirúrgicas empleadas se presentan en la tabla IV.2. El mayor porcentaje de CCR se encuentra en el colon izquierdo, dato que resulta destacable.

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

|                                       |                        |
|---------------------------------------|------------------------|
| <b><u>Localización</u></b>            |                        |
| <i>Colon derecho</i>                  | 22 (25%)               |
| <i>Colon izquierdo</i>                | 38 (43,2%)             |
| <i>Recto y unión rectosigmoidea</i>   | 28 (31,8%)             |
| <b><u>Técnica quirúrgica</u></b>      |                        |
| <i>Hemicolectomía derecha</i>         | 14 (15,9%)             |
| <i>Hemicolectomía izquierda</i>       | 12 (13,63%)            |
| <i>Sigmoidectomía</i>                 | 9 (10,22%)             |
| <i>Intervención de Hartmann</i>       | 6 (6,81%)              |
| <i>Colectomía segmentaria</i>         | 6 (6,81%)              |
| <i>Resección anterior baja</i>        | 14 (15,9%)             |
| <i>Amputación abdomino-perineal</i>   | 2 (2,27%)              |
| <i>Otras técnicas</i>                 | 25 (28,4%)             |
| <b><u>Intención de la cirugía</u></b> |                        |
| <i>Curativa / Paliativa</i>           | 70 (80,5%) /17 (19,5%) |

Respecto a las características histológicas, el 74 % de los casos fueron clasificados como adenocarcinomas y el 26 % resultaron ser pólipos malignizados. Dentro de los adenocarcinomas, el 55,4% de los casos presentan grado medio de diferenciación, y el 32,3% son tumores de alto grado de diferenciación. En cuanto a la producción de moco, se incluyen tanto los tumores mucosecretores como aquellos con presencia de células en anillo de sello. Ambas características se objetivan con mayor frecuencia en los CCR de aparición precoz. Dieciocho casos del total de las neoplasias (27,7%) son mucosecretoras, y 4 (5,2%) presentan células en anillo de sello. En la tabla IV.3 se resumen los datos histológicos.

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

|  |                        |
|--|------------------------|
| <b><u>Grado de diferenciación</u></b>      |                        |
| <i>Alto</i>                                | 21 (32,3%)             |
| <i>Medio</i>                               | 36 (55,4%)             |
| <i>Bajo</i>                                | 8 (12,3%)              |
| <b><u>Producción de moco</u></b>           |                        |
| <i>Mucosecretor ( SI/NO)</i>               | 18 (27,7%) /47 (72,3%) |
| <i>Células en anillo de sello ( SI/NO)</i> | 4 (5,2%) / 61 (94,8%)  |
| <i>Total de CCR productores de moco</i>    | 20 (30,8%)             |

En la tabla IV.4 se presenta la estadificación del CCR según el sistema AJCC/ TNM. En la presente muestra, se observa una distribución homogénea del estadio al diagnóstico, con ligero predominio de los estadios iniciales. El 33,3% de los casos presentan metástasis ganglionares y el 23,9 % metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

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

|   |            |
|---|------------|
| <b><u>Estadio</u></b>                               |            |
| <i>I</i>  | 26 (29,5%) |
| <i>II</i>   | 26 (29,5%) |
| <i>III</i>  | 15 (17%)   |
| <i>IV</i>   | 21 (23,9%) |
| <b><u>Afectación de ganglios linfáticos</u></b>     |            |
| <i>SI</i>   | 27 (33,3%) |
| <i>NO</i>   | 54 (66,7%) |
| <b><u>Metástasis a distancia al diagnóstico</u></b> |            |
| <i>SI</i>   | 21 (23,9%) |
| <i>NO</i>   | 67 (76,1%) |

La ST fue, de media, 58,51 meses, y la SLE 50,79 meses. En el momento del diagnóstico, 21 pacientes presentan enfermedad a distancia; si se excluyen éstos, la SLE

se incrementa hasta los 66,71 meses, y la ST de 71,54 meses. De los 67 pacientes, que no presentan enfermedad a distancia al diagnóstico, 10 (15,2%) presentaron recidiva tumoral. De ellos, 3 casos (30%) fue a nivel locorregional y 7 (70%) a distancia.

En la Tabla IV.5 se muestra la distribución de la localización de las metástasis a distancia, junto con los datos de seguimiento y supervivencia. De los pacientes que presentaron metástasis a distancia, 4 pacientes lo hicieron tanto en el hígado como en pulmón, 5 presentaron carcinomatosis, uno afectación a nivel de los ganglios retroperitoneales, otro en ovario y en el resto de casos fueron hepáticas exclusivamente.

La mayoría de los pacientes que presentaron recidiva tumoral fueron reintervenidos, excepto en dos casos, que no fueron candidatos a cirugía de rescate al presentar múltiples implantes peritoneales. Uno de los pacientes fue intervenido por recidiva en páncreas, con resección corporocaudal. El paciente presentó un periodo libre de enfermedad de 16 meses hasta la recidiva y una supervivencia total de 72 meses. Otra de las pacientes fue intervenida en dos ocasiones por recidiva locorregional a nivel del muñón rectal, al año de la primera cirugía, siendo necesaria la realización de AAP, y al siguiente año en la pared abdominal. Posteriormente, desarrolló metástasis pulmonares y una recidiva pélvica, no siendo subsidiaria de tratamiento quirúrgico, falleciendo a los 33 meses del primer diagnóstico. En el resto de los pacientes, se practicó una ooforectomía por recidiva en ovario, y resecciones hepáticas de las respectivas metástasis, estando todos ellos libres de enfermedad en el momento de la última revisión, excepto un caso que falleció a los 53 meses del primer diagnóstico.

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

|                                      |                     |
|--------------------------------------|---------------------|
| <i>ST</i>                            | 58,51 meses         |
| <i>SLE</i>                           | 50,79 meses         |
| <i>ST *</i>                          | 71,537 meses        |
| <i>SLE *</i>                         | 66,71 meses         |
| <b>Recidiva tumoral * ( SI/NO)</b>   | 10/56 (15,2%/84,8%) |
| <b><u>Tipo de recidiva</u></b>       |                     |
| <i>Locorregional</i>                 | 3 (30%)             |
| <i>A distancia</i>                   | 7 (70%)             |
| <b><u>Metástasis a distancia</u></b> |                     |
| <i>Hepáticas</i>                     | 9 (42,8%)           |
| <i>Hepáticas y pulmonares</i>        | 4 (19%)             |
| <i>Ovario</i>                        | 1 (4,76%)           |
| <i>Carcinomatosis peritoneal</i>     | 5 (23,8%)           |
| <i>Retroperitoneales</i>             | 1 (4,76%)           |
| <b><u>Mortalidad (SI/NO)</u></b>     | 26/62 (29,5%/70,5%) |

ST: Supervivencia Total. SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad.

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

La mortalidad global fue de un 29,54% (26 pacientes), con una edad media al fallecimiento de 43 años. En todos los casos la causa de muerte se relaciona con el CCR. Las características de los pacientes fallecidos no difieren con respecto a las descritas del grupo total, salvo lógicamente en el estadio al diagnóstico: el porcentaje de neoplasias en estadios avanzados resultó ser mayor. El 76,9% de los tumores presentaron un estadio IV, frente al 23,9 % del grupo total. También se observó una mayor presencia de metástasis a nivel ganglionar (78,9%) y a distancia (76,9%). La intención de la cirugía en dichos pacientes fue paliativa en 17 pacientes (68%) y curativa en 8 pacientes (32%), mientras que, en la muestra global de pacientes, al 80,5% se les intervino con intención curativa.

Cinco pacientes presentaron otro CCR en el seguimiento: en cuatro casos la presentación fue sincrónica y en dos metacrónica. Por otro lado, nueve pacientes presentaron neoplasias extracolónicas; de las que sólo dos casos, se asociaban a SL, destacando un paciente con presencia de modo sincrónico CCR y carcinoma de ovario. En total, 13 pacientes (14,77%) presentaron neoplasia primaria múltiple a lo largo de la evolución.

Cincuenta pacientes presentaron algún tipo de pólipo colónico a lo largo del seguimiento, siendo la mayoría adenomatosos (55%). Sólo un caso se detectó previo al diagnóstico de CCR, mientras que 18 pacientes presentaron pólipos durante el seguimiento y 16 fueron sincrónicos. Quince pacientes presentaron tanto en el momento del diagnóstico como durante el seguimiento. De los cincuenta pacientes, seis fueron diagnosticados de PAF; y si excluimos a éstos, la media de pólipos asociados al CCR fue de 1,8.

Tabla IV.6. Tabla resumen de las características generales y anatómicas.

|   | <b>Total N (%)</b> |
|---|--------------------|
| <b>Pacientes</b>                          | 88 (100)           |
| <b>Edad media de diagnóstico del CCR.</b> | 39,22              |
| <b>Sexo:</b>                              |                    |
| <i>Varones</i>                            | 53 (60,2)          |
| <i>Mujeres</i>                            | 35 (39,8)          |
| <b>Localización tumoral:</b>              |                    |
| <i>Colon derecho</i>                      | 22 (25)            |
| <i>Colon izquierdo y recto</i>            | 66 (75)            |
| <b>Diferenciación tumoral:</b>            |                    |
| <i>Alto</i>                               | 21 (32,3)          |
| <i>Moderado</i>                           | 36 (55,4)          |
| <i>Bajo</i>                               | 8 (12,3)           |
| <b>Producción de moco.</b>                | 20 (30,8)          |
| <b>Estadío TNM:</b>                       |                    |
| <i>I</i>                                  | 26 (29,5)          |
| <i>II</i>                                 | 26 (29,5)          |
| <i>III</i>                                | 15 (17)            |
| <i>IV</i>                                 | 21 (23,9)          |
| <b>Presencia de pólipos asociados.</b>    | 50 (56,8)          |
| <b>CCR sincrónicos y metacrónicos.</b>    | 5 ( 6,1)           |

## 1.2. Características familiares.

Una vez conocidas las características individuales de los sujetos del estudio, se identifican los antecedentes familiares de cada caso, como se describe en el apartado de Material y Métodos.

De los 82 casos, 34 (41,5%) se consideraron esporádicos, 33 (40,24%) presentaron agregación familiar para el CCR y 15 (18,29%) cumplían los criterios de

Ámsterdam para el SL. Se excluyeron del estudio, las seis familias diagnosticadas de PAF.

En la Tabla IV.7 se exponen los diferentes tipos de neoplasias asociadas con el SL que aparecieron en los familiares de los pacientes estudiados. La neoplasia más frecuente fue el CCR, seguida del adenocarcinoma gástrico. Las siguientes en orden de frecuencia fueron el adenocarcinoma de ovario y útero, y las neoplasias de vías urinarias y del sistema nervioso central (SNC). En un caso, existen antecedentes de adenocarcinoma de páncreas en la familia.

**Tabla IV.7.** Relación de los diferentes tumores relacionados con el Síndrome de Lynch y su frecuencia de aparición en las diferentes familias. No se incluyen los CCR de los *probandi*. El porcentaje se refiere al número de familias con dicho tumor respecto al total de cada grupo.

|                           | <i>Total</i> | <i>Esporádico</i> | <i>Agregación</i> | <i>Síndrome de Lynch</i> |
|---------------------------|--------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| <i>Número de familias</i> | 82           | 34                | 33                | 15                       |
| <i>Colorrectal</i>        | 30 (36,5%)   |                   | 15 (44,1%)        | 15 (93,7%)               |
| <i>Útero</i>              | 4 (4,87%)    |                   | 3 (8,8%)          | 1 (6,25%)                |
| <i>Gástrico</i>           | 11 (13,41%)  |                   | 6 (17,64%)        | 5 (31,25%)               |
| <i>Vías urinarias</i>     | 2 (2,43%)    |                   | 1 (2,94%)         | 1 (6,25%)                |
| <i>SNC</i>                | 2 (2,43%)    |                   | 1 (2,94%)         | 1 (6,25%)                |
| <i>Ovario</i>             | 4 (4,87%)    |                   | 2 (5,88%)         | 2 (12,5%)                |
| <i>Páncreas</i>           | 1 (1,22%)    |                   | 1 (2,94%)         |                          |

De las 33 familias que presentan agregación, 13 (38,23%) se asocian con neoplasias no relacionadas con el SL. En la Tabla IV.8 se exponen el tipo y número de neoplasias identificadas.

El cáncer de pulmón se identificó en diez familias (12,19%), y el cáncer de mama en nueve (10,97%), siendo las neoplasias más frecuentes. Los tumores otorrinolaringológicos (ORL), las leucemias y el adenocarcinoma de próstata, se

observaron en cuatro familias (4,87%). Destaca que este tipo de tumores se presentan, mayoritariamente, en las familias definidas como familias con agregación, y no en las que cumplían criterios de Ámsterdam.

**Tabla IV.8.** Relación de los diferentes tumores no asociados con el Síndrome de Lynch y su distribución en los diferentes tipos de familias. El porcentaje se refiere al número de familias con dicho tumor respecto al total de cada grupo.

|                             | <i>Total</i> | <i>Esporádicos</i> | <i>Agregación</i> | <i>Síndrome de Lynch</i> |
|-----------------------------|--------------|--------------------|-------------------|--------------------------|
| <i>Número de familias</i>   | 82           | 34                 | 33                | 15                       |
| <b><i>Tipo de tumor</i></b> |              |                    |                   |                          |
| <i>Mama</i>                 | 9 (10,97%)   | 3 (9,7%)           | 5 (14,7%)         | 1 (6,25%)                |
| <i>ORL</i>                  | 4 (4,87%)    | 1 (3,12%)          | 3 (8,82%)         |                          |
| <i>Leucemia</i>             | 4 (4,87%)    |                    | 4 (11,76%)        |                          |
| <i>Enfermedad de</i>        |              |                    |                   |                          |
| <i>Hodgkin</i>              | 2 (2,43%)    |                    | 1(2,94%)          | 1 (6,25%)                |
| <i>Esófago</i>              | 1 (1,219%)   |                    | 1(2,94%)          |                          |
| <i>Pulmón</i>               | 10(12,19%)   | 1 (3,12%)          | 7 (20,58%)        | 2 (12,5%)                |
| <i>Sarcoma</i>              | 3 (3,6%)     | 1 (3,12%)          | 1 (2,94%)         | 1 (6,25%)                |
| <i>Próstata</i>             | 4 (4,8%)     |                    | 3 (8,82%)         | 1 (6,25%)                |

### 1.3. Características moleculares.

#### 1.3.1 Vía mutadora o de Inestabilidad de microsatélites.

##### 1.3.1.1 *Inestabilidad de microsatélites.*

De los 88 pacientes, se excluyeron 6 con diagnóstico de PAF mencionados anteriormente, y uno al no obtenerse tejido tumoral suficiente para su análisis. En los 81 casos restantes se llevo a cabo el análisis de la Inestabilidad de microsatélites, cuyos resultados se describen en la Tabla IV.9. Sólo 12 casos presentaron IMS (14,81%),

mientras que la mayoría de los casos presentaron EMS (85,18%).

**Tabla IV.9.** Distribución de los pacientes según la presencia de inestabilidad de microsatélites en el CCR.

|   |             |
|---|-------------|
| <i>Inestabilidad de microsatélites (IMS).</i> | 12 (14,81%) |
| <i>Estabilidad de microsatélites (EMS).</i>   | 69 (85,18%) |

### 1.3.1.2 *Análisis inmunohistoquímico de las Proteínas del sistema de reparación.*

Los resultados obtenidos en el estudio IHQ de las proteínas correspondientes a los genes MMR se detalla en la Tabla IV.10.

**Tabla IV.10.** Resultados del análisis inmunohistoquímico de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento.

|                                     | <i>Estudio inmunohistoquímico</i> |                              |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
|                                     | <i>Normal</i>                     | <i>Ausencia de expresión</i> |
| <b><i>Sistema de reparación</i></b> |                                   |                              |
| <i>Mlh1 (n=81)</i>                  | 76 (93,8)                         | 5 (6,2)                      |
| <i>Msh2 (n=81)</i>                  | 75 (92,6)                         | 6 (7,4)                      |
| <i>Msh6 (n=81)</i>                  | 76 (93,8)                         | 5 (6,2)                      |
| <i>Pms2 (n=68)</i>                  | 67 (98,5)                         | 1 (1,5)                      |

En cinco casos de tumores IMS, se identifica ausencia de expresión de la proteína Mlh1. En cuatro de ellos se detecta mutación del gen; y sólo en un caso, la falta de expresión es secundaria a hipermetilación del promotor de *MLH1*. En uno de los casos, se acompaña de la ausencia de Pms2.

La falta de expresión de la proteína Msh2 se identifica en seis casos. Todos presentan IMS, y en cuatro casos se detecta mutación del gen correspondiente. En cuanto a la proteína Msh6, de los cinco resultados negativos, cuatro se acompañan de

pérdida de expresión de Msh2. Se identifica mutación del gen *MSH6* en un caso, mientras que en 3 a nivel de *MSH2*.

1.3.1.3 *Análisis genético.*

De las muestras de sangre periférica obtenidas de los probandos cuyos tumores presentaron IMS, se extrajo el ADN para proceder al estudio completo de los genes MMR. De los doce casos analizados, diez mostraron mutación de alguno de los principales genes implicados en la reparación del ADN, como se expone en la Tabla

IV.11. Las mutaciones a nivel de *MLH1* y *MSH2* se presentan con la misma frecuencia en nuestra muestra. Por otro lado, uno de los casos no mostró mutación genética, presentando, sin embargo, hipermetilación del gen *MLH1*, y en el otro no se encontraron alteraciones genéticas a nivel de los genes relacionados, a pesar de la ausencia de expresión de la proteína Msh6.

**Tabla IV.11.** Resultados del estudio genético en los pacientes con tumores IMS.

| <i>Estudio genético</i> |        |
|-------------------------|--------|
| <i>Mlh1</i>             | 4 (40) |
| <i>Msh2</i>             | 4 (40) |
| <i>Msh6</i>             | 2 (20) |

En la tabla IV.12 se muestran los tipos de mutaciones puntuales y de grandes reordenamientos identificados en los genes MMR.

Tabla IV.12. Mutaciones identificadas en los genes *MMR*.

| Gen         | Exón/Intrón   | Codón       | Alteración | Consecuencia en la proteína       |
|-------------|---------------|-------------|------------|-----------------------------------|
| <i>MLH2</i> | Exón 9        | 467         | G>T        | c1399 G>T p. Glu467X (Nonsense)   |
| <i>MLH2</i> | Exón 5        | 310         | T>G        | C929T>G p.Leu310 Arg              |
| <i>MLH6</i> | Intron 6      | 3557-2      | A>G        | Delección puntual                 |
| <i>MSH2</i> | Exon 1-3      |             |            | Gran delección                    |
| <i>MSH1</i> | Exón 13       | 497         | C>T        | C1459 C>T pR487x                  |
| <i>MSH2</i> | Exón 8        |             |            | Gran delección                    |
| <i>MSH1</i> | Exón 13       | 497         | C>T        | c1459 C>T pR487x                  |
| <i>MSH6</i> | Exon 2        | 431         | G>T        | pSer1441le                        |
| <i>MLH1</i> | Exón 10       | 875         | T>C        | Leu292 Pro                        |
| <i>MLH1</i> | Exon-intron18 | 2103,2103+1 | delG       | Incorrecto procesamiento del ARNm |

### 1.3.2 Vía serrada o Fenotipo metilador.

En 68 pacientes del total de 88 casos, se realiza el estudio de patrones de metilación de islotes CpG. El 19,1% presentan FM alto, el 41,17% FM bajo y el 39,7% FM-cero. El grupo con FM alto se caracteriza por un mayor porcentaje de casos que cumplen criterios de Ámsterdam tipo II y presencia de tumores asociados al SL; al igual que se observa predilección por la localización del CCR en el colon derecho y mayor frecuencia de mutaciones de los genes MMR.

### 1.3.3. Vía supresora o Inestabilidad cromosómica.

En nuestro estudio, se realiza el análisis de la INC en 59 pacientes del total de 88 casos mediante técnica de CGH-array (*Comparative Genomic Hybridization*). El 16,94 % presenta IMS, el 25,42 % INC y el 57,63% no muestran IMS ni INC, definiéndose como MACS. Los tumores con INC se caracterizan por un mayor predominio por el colon izquierdo y recto, grado medio de diferenciación y menor proporción de tumores productores de moco. El 60% de los casos presentan agregación familiar para el CCR, y destaca un FM bajo en una importante proporción de casos (46,6%).

## 2. ESTUDIO COMPARATIVO.

### **2.1. Estudio comparativo de la vía supresora. Tumores estables (EMS) e inestables (IMS).**

Una vez realizado el estudio descriptivo y el análisis de las diferentes vías dentro de la muestra general, se procede a comparar en primer lugar las características clínico-patológicas entre los tumores con IMS frente a los que presentaron EMS.

Como se ha indicado previamente, 12 casos (14,8%) mostraron IMS. Los resultados de comparar las características clínicas, familiares y moleculares entre los 12 casos con IMS y los 69 EMS, se presentan a continuación.

#### 2.1.1 Características anatomo-clínicas.

La diferencia en la edad al diagnóstico entre los CCR que presentan IMS frente a los EMS resulta estadísticamente significativa. La edad media de aparición del CCR en los IMS es de 34,3 años, mientras que en los EMS el diagnóstico es más tardío, con una edad media de aparición de 40,4 años. En cuanto a la distribución por sexos, destaca un porcentaje mayor de hombres en los IMS (75%) (Tabla IV. 13).

**Tabla IV.13.** Edad media al diagnóstico del CCR y distribución por sexos.

|                             | <b>IMS</b>               | <b>EMS</b>                | <b>p</b> |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------|
| <i>Edad al diagnóstico*</i> | 34,33 ( 27-41; DE: 5,19) | 40,41 ( 25-45; DE: 4,323) | < 0,005  |
| <i>Sexo (M/V)</i>           | 3 (25%) / 9 (75%)        | 29 (42%) / 40 (57,9%)     | NS       |

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

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

En la Tabla IV. 14 se presentan las diferentes localizaciones de los CCR y los resultados de la comparación entre los dos grupos definidos. Al mismo tiempo se indica la intención de la cirugía, curativa o paliativa. En los casos con EMS, se observa un predominio de CCR izquierdo (42,02%), seguido de recto (37,68%); mientras que los casos con IMS se distribuyen de forma equivalente. Sin mostrar diferencias estadísticamente significativas, sólo en el grupo como EMS se llevaron a cabo cirugías con intención paliativa (20,58%).

**Tabla IV.14.** Localización del CCR e intención quirúrgica en los tumores IMS y EMS.

|                                       | <b>IMS</b>    | <b>EMS</b>           | <b>p</b>     |
|---------------------------------------|---------------|----------------------|--------------|
| <b><u>Localización</u></b>            |               |                      |              |
| <i>Colon derecho</i>                  | 6 (50%)       | 14 (20,28%)          |              |
| <i>Colon izquierdo</i>                | 6 (50%)       | 29 (42,02%)          |              |
| <i>Recto y unión rectosigma</i>       | 0             | 26 (37,68%)          | <b>0,016</b> |
| <b><u>Intención de la cirugía</u></b> |               |                      |              |
| <i>Curativa / Paliativa</i>           | 12 (100%) / 0 | 54(79,4%)/14(20,58%) | NS           |

Respecto a las características histológicas, 21 casos fueron pólipos malignizados. De ellos, el 90% mostraron EMS. El grado de diferenciación de las neoplasias fue predominantemente de grado medio en los EMS y alto grado de diferenciación en los IMS. La presencia de células en anillo de sello, así como la producción de moco, son

características más frecuentes en los tumores con IMS, con unos valores de la p cercanos a la significación estadística. En la Tabla IV.15 se muestran estos datos histológicos.

**Tabla IV.15.** Comparación de las características histopatológicas de los IMS y EMS.

|                                       | <i>IMS n (%)</i>  | <i>EMS n (%)</i>    | <i>p</i> |
|---------------------------------------|-------------------|---------------------|----------|
| <b><u>Grado de diferenciación</u></b> |                   |                     |          |
| <i>Bajo</i>                           | 2 ( 18,18)        | 6 (12,24)           |          |
| <i>Medio</i>                          | 4 (36,36)         | 28 (57,14)          |          |
| <i>Alto</i>                           | 5 (45,45)         | 15 (30,61)          | NS       |
| <b><u>Producción de moco</u></b>      | <i>+/- (%)</i>    | <i>+/- (%)</i>      |          |
| <i>Mucosecretor</i>                   | 4(36,36)/7(63,63) | 13(26,53)/36(73,46) | NS       |
| <i>Células en anillo de sello</i>     | 2(18,18)/9(81,81) | 2(4,08)/47(95,9)    | 0.090    |
| <i>Producción de moco</i>             | 6(54,54)/5(45,45) | 13(26,5)/36(73,46)  | 0.071    |

La comparación de la estadificación tumoral de los casos con IMS frente a los EMS, muestra diferencias estadísticamente significativas. En ambos grupos hay un ligero predominio de los estadios iniciales, como se muestra en la Tabla IV.16. Destaca el bajo porcentaje de tumores IMS con afectación ganglionar (16,6%) y la ausencia de metástasis a distancia al diagnóstico.

Tabla IV.16. Estadificación tumoral de los tumores IMS y EMS.

|  | <i>IMS n (%)</i> | <i>EMS n (%)</i> | <i>p</i>     |
|--|------------------|------------------|--------------|
| <b><u>Estadio TNM:</u></b>                       |                  |                  |              |
| <i>I</i>   | 1 (8,3)          | 22 (31,9)        |              |
| <i>II</i>  | 9 (75)           | 17 (24,6)        |              |
| <i>III</i>                                       | 2 (16,7)         | 12 (17,4)        |              |
| <i>IV</i>  | 0                | 18 (26,1)        | <b>0.004</b> |
| <b><u>Afectación de ganglios linfáticos:</u></b> |                  |                  |              |
| <i>SI</i>  | 2 (16,66%)       | 22 (34,9%)       |              |
| <i>NO</i>  | 10 (83,33%)      | 41(65,05%)       | NS           |
| <b><u>Metástasis a distancia:</u></b>            |                  |                  |              |
| <i>SI</i>  | 0                | 18(26%)          |              |
| <i>NO</i>  | 12(100%)         | 51(73,9%)        | 0.059        |

En la Tabla IV. 17 se muestran los resultados de SLE, ST y mortalidad al comparar el grupo de IMS frente a los EMS. Tanto la SLE, como la ST fueron más favorables para los pacientes que presentan IMS. Cuando se excluyen aquellos casos que presentaban enfermedad a distancia en el momento del diagnóstico y/o presentan recidiva tumoral a lo largo del seguimiento, la SLE y ST aumenta en el grupo de EMS sin alcanzar los valores del grupo de IMS. La tasa de mortalidad también fue mayor en el grupo EMS.

**Tabla IV.17.** Seguimiento de los pacientes: Supervivencia, mortalidad, recidiva y tipo de recidiva.

|  | <i>IMS n (%)</i> | <i>EMS n (%)</i> | <i>p</i>     |
|--|------------------|------------------|--------------|
| <b><u>Total de pacientes:</u></b>                      |                  |                  |              |
| <i>ST</i>  | 86               | 54,81            | <b>0,003</b> |
| <i>SLE</i>   | 80,416           | 46,37            | <b>0,006</b> |
| <b><u>Pacientes sin metástasis al diagnóstico:</u></b> |                  |                  |              |
| <i>ST</i>  | 87,55            | 69,93            |              |
| <i>SLE</i>   | 87,55            | 70,06            |              |
| <i>Recidiva tumoral*</i>                               | 3/12 (25)        | 9/52 (17,3)      | NS           |
| <b><u>Tipo de recidiva:</u></b>                        |                  |                  |              |
| <i>Locorregional</i>                                   | 1(33,33)         | 2( 22,22)        |              |
| <i>A distancia</i>                                     | 1(33,33)         | 6(66,66)         |              |
| <i>Ambas</i>   | 1(33,33)         | 1(11,11)         | NS           |
| <i>Mortalidad*</i>                                     | 2/12 (16,66)     | 21/69 (30,43)    | NS           |

ST: Supervivencia Total. SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad. ( en meses)

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

El grupo IMS presenta mayor frecuencia de CCR sincrónicos y/ metacrónicos (16,67% frente a 4,3%). Trece pacientes presentaron más de una neoplasia a lo largo de la evolución; aquellas que fueron extracolónicas (8 casos) corresponden a pacientes con EMS.

En cuanto a la presencia de pólipos, en ambos grupos se desarrollan a lo largo de la evolución, siendo más frecuente en el grupo de IMS, con predominio de los pólipos mixtos (57,14%).

#### 2.1.2. Características familiares.

Los antecedentes familiares oncológicos entre los tumores IMS y EMS se muestran en la Tabla IV.18. Los casos con sospecha de SL predominan en los casos con

IMS, sin ningún caso esporádico, mientras que los tumores con EMS fueron casos esporádicos y con agregación familiar. Seis pacientes estables, mostraron antecedentes familiares sugestivos de SL. Sin embargo, ninguno de los casos con EMS mostró falta de expresión de las proteínas de reparación del ADN en el estudio IHQ. Dentro de los tumores con IMS, destaca la mayor presencia en la familia de neoplasias asociadas con el SL.

**Tabla IV.18.** Antecedentes oncológicos familiares de los tumores IMS y EMS.

|  | <i>IMS n (%)</i> | <i>EMS n (%)</i> | <i>p</i>       |
|--|------------------|------------------|----------------|
| <b><u>Agregación familiar de neoplasias:</u></b>                                       |                  |                  |                |
| <i>Caso esporádico</i>   | 0                | 34 (49,2)        | 0.001          |
| <i>Agregación familiar</i>   | 2 (16,67)        | 30 (43,47)       | NS             |
| <i>Ámsterdam II positivo</i>   | 10 (83,33)       | 5 (7,24)         | 0.001          |
| <b>Neoplasias relacionadas con el Síndrome de Lynch en otro miembro de la familia.</b> |                  |                  |                |
| Número de familias.  | 12 (100)         | 29 (42,02)       | < <b>0.001</b> |
| <b>Neoplasias no relacionadas con el Síndrome de Lynch.</b>                            |                  |                  |                |
| Número de familias.  | 5 (41,6)         | 26 (37,68)       | <b>0.85</b>    |

En las siguientes tablas (Tabla IV.19 y IV.20) se muestran los tipos de neoplasias asociadas al SL y no asociadas al SL, respectivamente, presentes en ambos grupos familiares.

**Tabla IV.19.** Relación de los tumores relacionados con el Síndrome de Lynch aparecidos en familiares de los *probandi* con tumores IMS y EMS.

|  | <i>IMS</i> | <i>EMS</i> |
|--|------------|------------|
| <i>Número de familias con neoplasia*</i> | 12 (100)   | 29 (42,02) |
| <i>Colorrectal</i>                       | 17         | 13         |
| <i>Útero</i>                             | 1          | 3          |
| <i>Gástrico</i>                          | 5          | 6          |
| <i>Vías urinarias</i>                    | 1          | 1          |
| <i>Sistema nervioso central</i>          | 1          | 2          |
| <i>Ovario</i>                            | 2          | 2          |
| <i>Páncreas</i>                          | 0          | 1          |

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

**Tabla IV.20.** Relación de los tumores no asociados con el Síndrome de Lynch que presentaron los familiares de los *probandi* con tumores IMS y EMS.

|  | <i>IMS</i> | <i>EMS</i> |
|--|------------|------------|
| <i>Neoplasias no relacionadas con el SL*</i> | 5 (41,6)   | 26 (37,68) |
| <i>Mama</i>                                  | 2          | 7          |
| <i>ORL</i>                                   | 0          | 4          |
| <i>Leucemia</i>                              | 0          | 4          |
| <i>Enfermedad de Hodgkin</i>                 | 1          | 1          |
| <i>Esófago</i>                               | 0          | 1          |
| <i>Pulmón</i>                                | 2          | 8          |
| <i>Sarcoma</i>                               | 1          | 2          |
| <i>Próstata</i>                              | 1          | 3          |

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

En la Tabla IV.21 se resumen los datos anatómo-clínicos y familiares globales en los tumores IMS y EMS.

Tabla IV.21. Resumen de los datos anatómo-clínicos y familiares en los grupos IMS y EMS.

|  | <i>IMS n (%)</i>         | <i>EMS n (%)</i>         | <i>p</i>          |
|--|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| <b>Pacientes</b>                                   | 12 (14,81)               | 69 (85,18)               |                   |
| <b>Edad media de diagnóstico del CCR.</b>          | 34,33<br>(27-41;DE:5,19) | 40,41<br>(25-45;DE:4,32) | <b>&lt; 0,005</b> |
| <b>Sexo:</b>                                       |                          |                          |                   |
| <i>Varones</i>                                     | 9 (75)                   | 40 (57,9)                |                   |
| <i>Mujeres</i>                                     | 3 (25)                   | 29 (42)                  | NS                |
| <b>Localización tumoral:</b>                       |                          |                          |                   |
| <i>Colon derecho</i>                               | 6 (50)                   | 14 (20,28)               |                   |
| <i>Colon izquierdo</i>                             | 6 (50)                   | 29 (42,02)               |                   |
| <i>Recto y unión rectosigma</i>                    | 0                        | 26 (37,68)               | <b>0,016</b>      |
| <b>Diferenciación tumoral:</b>                     |                          |                          |                   |
| <i>Alto</i>  | 5 (45,45)                | 15 (30,61)               |                   |
| <i>Moderado</i>                                    | 4 (36,36)                | 28 (57,14)               | NS                |
| <i>Bajo</i>  | 2 (18,18)                | 6 (12,24)                |                   |
| <b>Producción de moco ( Si /No)</b>                | 6(54,54)/5(45,4)         | 13(26,5)/36(73,46)       | 0,071             |
| <b>Estadío TNM:</b>                                |                          |                          |                   |
| <i>I</i>   | 1 (8,3)                  | 22 (31,9)                |                   |
| <i>II</i>  | 9 (75)                   | 17 (24,6)                |                   |
| <i>III</i>   | 2 (16)                   | 12 (17,4)                |                   |
| <i>IV</i>  | 0                        | 18 (26,1)                | <b>0,004</b>      |
| <b>Presencia de pólipos asociados.<br/>(Si/No)</b> | 9 (75)/3 (25)            | 38 (55)/31 (45)          | NS                |
| <b>CCR sincrónicos y metacrónicos.</b>             | 2 (16,67)                | 3 (4,34)                 | NS                |
| <b>Agregación familiar de neoplasias:</b>          |                          |                          |                   |
| <i>Caso esporádico</i>                             | 0                        | 34(49,27)                | <b>0,001</b>      |
| <i>Agregación familiar</i>                         | 2 (16,67)                | 30 (43,47)               | NS                |
| <i>Ámsterdam II positivo</i>                       | 10 (83,33)               | 5 (7,24)                 | <b>0,001</b>      |

2.1.3. Características moleculares.

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

*2.1.3.1. Análisis de las proteínas del sistema de reparación.*

Como se observa en la Tabla IV. 22, la falta de expresión de las proteínas del sistema de reparación se observa sólo en el grupo de CCR con IMS. Por tanto, los resultados obtenidos en la inestabilidad de microsatélites se correlacionan con los de la IHQ de las proteínas MMR.

**Tabla IV.22.** Resultados del análisis de la expresión inmunohistoquímica de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento (proteínas MMR).

|  | <i>IMS</i>          | <i>EMS</i>       |
|--|---------------------|------------------|
|  | + (%) / - (%)       | + (%) / - (%)    |
| <b><u>Proteínas del sistema de reparación.</u></b> |                     |                  |
| <i>Mlh1</i>  | 7 (58,3) / 5 (41,7) | 69 (100) / 0 (0) |
| <i>Msh2</i>  | 6 (50) / 6 (50)     | 69 (100) / 0 (0) |
| <i>Msh6</i>  | 7 (58,3) / 5 (41,7) | 69 (100) / 0 (0) |

Se observan diferencias entre los dos grupos IMS y EMS en relación con las proteínas del sistema de reparación más frecuentes, no existiendo falta de expresión en ninguno de los casos de EMS.

### 2.1.3.2. *Análisis de la metilación de islas de CpG.*

Dentro de los casos con IMS, cuatro (5,9%) presentan FM alto y seis (8,8%) FM bajo / cero. En el grupo de los tumores EMS, 49 (72,1%) pacientes presentan FM bajo /cero; y solamente en nueve casos (13%) se observa FM alto.

La comparación de las características anatómo-patológicas, familiares y moleculares entre los grupos con IMS y EMS, según los diferentes perfiles de metilación se detallan en el apartado 3.

En resumen, las principales características con significación estadística que diferencian a los tumores con IMS son: la edad media al diagnóstico más precoz, la localización tumoral, con una distribución homogénea entre el colon derecho e izquierdo, mayor proporción de tumores diagnosticados en estadios iniciales (83,3%) y mejores tasas de supervivencia. Otra característica con tendencia a la significación destacable, fue una proporción importante de tumores con producción de moco o con células en anillo de sello (54,54%). Los tumores con IMS presentan mayor asociación con el SL (83,3%), así como con la vía de FM (40%).

### **2.2. Estudio comparativo de la vía serrada o Fenotipo Metilador.**

La vía denominada del FM es la de más reciente identificación, y se caracteriza por la metilación de islas CpG promotoras de genes supresoras de tumores. En nuestro trabajo, se estudiaron patrones de metilación según se describe en el apartado de Material y métodos y se compararon desde el punto de vista estadístico los tres grupos, tanto las características anatomoclínicas como familiares.

### 2.2.1 Características anatómico-clínicas.

Del total de la muestra, el 19,1% presentan FM alto, el 41,2% FM bajo y el 39% FM cero.

Una de las principales características, con significación estadística, que diferencian los casos con FM alto respecto al resto es la localización del tumor, con un mayor predominio por el colon proximal (61,5%). Los tumores con FM bajo y FM cero se localizan principalmente en colon izquierdo (50% y 51,9%) y recto (20,8% y 40,7%), respectivamente.

Respecto a las características histológicas, los tumores con FM alto se caracterizan por mayor porcentaje de tumores con bajo grado de diferenciación (22,2%), y productores de mucina (44,4%), no siendo esta diferencia, sin embargo, estadísticamente significativa.

Los tumores con FM alto presentan mayor frecuencia de pólipos de tipo mixto durante el seguimiento (77%). Otras características con tendencia a la significación fueron la presencia de CCR sincrónico y metacrónico, con un 23,1% frente a 3,6% en los FM bajo y 14,8% en los tumores con FM bajo.

La comparación de los estadios tumorales de los CCR con FM alto frente a FM bajo o cero, no muestra diferencias estadísticamente significativas. En los tres grupos se observa una distribución homogénea, con leve predominio por el estadio II en los tumores con FM alto (46,2%).

### 2.2.2 Características familiares.

Se procede a comparar las características familiares de los tres grupos tumorales en función de su estado de metilación. El grupo con FM alto se caracteriza por un

mayor porcentaje de casos que cumplen criterios de Ámsterdam tipo II (30,8%) y presencia de tumores asociados o no al SL (30,8); mientras que la mayoría de los casos esporádicos presentan FM bajo (42,9%). Los tumores con FM cero presentan agregación familiar para CCR en el 44,4% de los casos y en el 37% no se identifican antecedentes familiares.

En la Tabla IV.23 se resumen las principales características anatopatológicas y familiares del CCR según se estado de metilación.

Tabla IV.23. Resultados del análisis de la metilación de islas de CpG.

|  | <i>FM alto</i> | <i>FM bajo</i> | <i>FM cero</i> |              |
|--|----------------|----------------|----------------|--------------|
|  | <i>n (%)</i>   | <i>n (%)</i>   | <i>n (%)</i>   | <i>p</i>     |
| <i>Pacientes</i>                                 | 13 (19,1)      | 28 (41,2)      | 27 (39,7)      |              |
| <i>Edad media de diagnóstico del CCR.</i>        | 36,9 (6,4)     | 39,4 (5)       | 40,1 (4,5)     | 0,18         |
| <u><i>Sexo:</i></u>                              |                |                |                |              |
| <i>Varones</i>                                   | 6 (46,2)       | 18 (64,3)      | 18 (67)        |              |
| <i>Mujeres</i>                                   | 7 (53,8)       | 10 (35,7)      | 9 (33)         | 0,43         |
| <u><i>Localización tumoral:</i></u>              |                |                |                |              |
| <i>Colon derecho</i>                             | 8 (61,5)       | 6 (21,4)       | 2 (7,4)        |              |
| <i>Colon izquierdo</i>                           | 3 (23,1)       | 14 (50)        | 14 (51,9)      |              |
| <i>Recto</i>                                     | 2 (15,4)       | 8 (28,6)       | 11 (40,7)      | <b>0.005</b> |
| <u><i>Diferenciación tumoral:</i></u>            |                |                |                |              |
| <i>Bajo</i>                                      | 2/9 (22,2)     | 3/22 (13,6)    | 0              | 0,27         |
| <i>Producción de moco.</i>                       | 4/9 (44,4)     | 8/22 (36,4)    | 5/24(20,8)     | 0,3          |
| <u><i>Estadío TNM:</i></u>                       |                |                |                |              |
| <i>I</i>   | 4 (30,8)       | 7 (25)         | 7 (25,9)       |              |
| <i>II</i>  | 6 (46,2)       | 9 (32,1)       | 10 (37)        |              |
| <i>III</i>                                       | 2 (15,4)       | 7 (25)         | 4 (14,8)       |              |
| <i>IV</i>  | 1 (7,7)        | 5 (17,9)       | 6 (22,2)       | NS           |
| <i>Presencia de pólipos asociados.</i>           | 10 (77)        | 14 (50)        | 14 (52)        | 0,23         |
| <i>CCR sincrónicos y metacrónicos.</i>           | 3 (23,1)       | 1 (3,6)        | 4 (14,8)       | 0,16         |
| <u><i>Antecedentes familiares de cáncer:</i></u> |                |                |                |              |
| <i>Caso esporádico</i>                           | 5 (38,5)       | 12 (42,9)      | 10 (37)        |              |
| <i>Agregación familiar</i>                       | 4 (30,8)       | 11 (39,3)      | 12 (44,4)      |              |
| <i>Ámsterdam II positivo</i>                     | 4 (30,8)       | 5 (17,9)       | 4 (18,5)       | NS           |

### **2.3. Estudio comparativo de la vía mutadora o inestabilidad de microsatélites. Tumores con Inestabilidad de microsatélites, Inestabilidad de cromosomas y MACS.**

A partir de la muestra caracterizada de CCR igual o menor de 45 años, se analiza la INC de 59 casos mediante técnica de CGH-array. Se considera cromosoma estable aquellos con menos de un 20% de segmentos alterados, definiendo como MACS aquellos con 1-4 cromosomas inestables (ganancias y/o pérdidas). Se procede a comparar las características entre dicho grupo con los que presentan INC e IMS.

De 59 casos, 10 (17 %) presentaron IMS, 15 (25,42%) INC y 34 (57,63%) no muestran IMS ni INC, definiéndose por tanto como MACS. Se presentan a continuación los resultados de comparar las características clínicas, familiares y moleculares de los tres grupos definidos.

#### 2.3.1. Características anatómo-clínicas.

Los CCR que presentan IMS se diagnostican a una edad media más precoz (34,3 años) que los tumores MACS e INC, cuya edad media al diagnóstico es de 40,3 y 39,5 años respectivamente. En cuanto a la distribución por sexos, en el grupo de los MACS e INC es homogénea, mientras que en los IMS destaca un mayor porcentaje de hombres (80%). No se observan diferencias significativas ni en la edad al diagnóstico ni en el sexo.

Tabla IV. 24. Edad y distribución por sexo.

|                             | <i>IMS</i>              | <i>INC</i>               | <i>MACS</i>              | <i>p</i> |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| <i>Edad al diagnóstico*</i> | 34,3<br>(27-43 DE: 5,9) | 39,53<br>(31-45 DE: 4,2) | 40,35<br>(25-45 DE: 4,7) |          |
| <i>Sexo ( M/V)</i>          | 2 (20)/8 (80)           | 7 (47)/8 (53)            | 14 (41)/20 (59)          | NS       |

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

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

La distribución del CCR por localizaciones muestra diferencias estadísticamente significativas, con una *p* de 0,015. Tanto en los casos con INC como en los tumores MACS, se observa un predominio por el CCR izquierdo (53,3% y 41,2%), seguido de recto (40% y 38,2%). Los CCR con IMS presentan una distribución equivalente entre el colon derecho e izquierdo. En la Tabla IV.25 se exponen los resultados descritos previamente, junto con la intención de la cirugía, curativa o paliativa, en función de la presencia o no de enfermedad a distancia en el momento del diagnóstico.

Tabla IV.25. Distribución por localización del CCR e intención de la cirugía.

|                                      | <i>IMS</i> | <i>INC</i> | <i>MACS</i> | <i>p</i>     |
|--------------------------------------|------------|------------|-------------|--------------|
| <b><u>Localización de colon:</u></b> |            |            |             |              |
| <i>Derecho</i>                       | 5 (50)     | 1 (6,6)    | 7 (20,58)   |              |
| <i>Izquierdo</i>                     | 5 (50)     | 8 (53,3)   | 14 (41,2)   |              |
| <i>Recto y rectosigma</i>            | 0          | 6 (40)     | 13 (38,2)   | <b>0,015</b> |
| <b><u>Tipo de cirugía:</u></b>       |            |            |             |              |
| <i>Curativa</i>                      | 10 (100)   | 12 (80)    | 29 (85)     |              |
| <i>Paliativa</i>                     | 0          | 3 (20)     | 5 (15)      | NS           |

En la Tabla IV.26, se muestran las características histológicas y los resultados de la comparación entre los grupos definidos. El grado de diferenciación de las neoplasias

fue predominantemente de grado medio en los MACS y en los INC; en los IMS, 50% fueron alto grado y 50% grado medio de diferenciación. El porcentaje de tumores con producción de mucina es mayor en los MACS respecto a los INC, pero menor que en los IMS, sin observarse diferencias significativas.

**Tabla IV.26.** Características histológicas.

|  | <i>IMS</i>   | <i>INC</i>       | <i>MACS</i>      | <i>p</i> |
|--|--------------|------------------|------------------|----------|
| <b><u>Grado de diferenciación:</u></b>     |              |                  |                  |          |
| <i>Alto</i>                                | 5 (50)       | 3/12 (25)        | 9/26 (34,6)      |          |
| <i>Medio</i>                               | 5 (50)       | 9/12 (75)        | 14/26 (53,8)     | NS       |
| <i>Bajo</i>                                | 0            | 0                | 3/26 (11,5)      |          |
| <b><u>Producción de moco:</u></b>          |              |                  |                  |          |
| <i>Mucosecretor ( SI/NO)</i>               | 4(40)/6 (60) | 2(16,6)/10(83,3) | 8(30,7)/18(69,2) | NS       |
| <i>Células en anillo de sello ( SI/NO)</i> | 1(10)/9(90)  | 0/12(100)        | 1(3,8)/25(96,1)  | NS       |
| <i>Total de CCR productores de moco</i>    | 5(50)/5(50)  | 2(16,6)/10(83,3) | 8(30,7)/18(69,2) | NS       |

La comparación del estadio tumoral de los casos con IMS frente a los INC y MACS se detalla en la Tabla IV.27 y resulta estadísticamente significativo con una p de 0,004. Se observa un predominio de los estadios iniciales en los tres grupos. En los tumores MACS e INC existe mayor afectación ganglionar, siendo esta diferencia significativa, con una p de 0,034. Así mismo, sin llegar a la significación, destaca el mayor porcentaje de metástasis en el momento del diagnóstico en comparación con los tumores IMS.

Tabla IV.27. Estadificación tumoral.

|   | <i>IMS</i> | <i>INC</i> | <i>MACS</i> | <i>p</i>     |
|---|------------|------------|-------------|--------------|
| <b><u>Estadio TMN:</u></b>                          |            |            |             |              |
| <i>I</i>  | 0          | 4 (26)     | 10 (29)     |              |
| <i>II</i>   | 10 (100)   | 4 (26)     | 9 (26)      |              |
| <i>III</i>  | 0          | 3 (20)     | 8 (23)      |              |
| <i>IV</i>   | 0          | 4 (26)     | 7 (20)      | <b>0,004</b> |
| <b><u>Afectación de ganglios linfáticos</u></b>     |            |            |             |              |
| <i>SI</i>   | 0          | 7 (47)     | 14 (41,17)  | <b>0,034</b> |
| <i>NO</i>   | 10 (100)   | 8 (53)     | 20 (59)     |              |
| <b><u>Metástasis a distancia al diagnóstico</u></b> |            |            |             |              |
| <i>SI</i>   | 0          | 4 (26,6)   | 7 (20,6)    | NS           |
| <i>NO</i>   | 10 (100)   | 11 (73,3)  | 27 (79,4)   |              |

Los resultados de comparar la SLE, ST y mortalidad en los tres grupos se describen en la Tabla IV.28. Los pacientes con tumores con IMS presentan una SLE y ST más favorable y una tasa de mortalidad menor, respecto a los otros dos grupos. Al comparar los tumores MACS frente a los INC, destaca la ausencia de diferencias tanto en la tasa de supervivencia como de mortalidad.

Tabla IV.28. SLE, ST y Mortalidad.

|                    | <i>IMS</i> | <i>IC</i> | <i>MACS</i> | <i>p</i> |
|--------------------|------------|-----------|-------------|----------|
| <i>ST</i>          | 86,4       | 60,7      | 60          | 0,2      |
| <i>SLE</i>         | 80,8       | 50,6      | 51,26       | 0,1      |
| <i>Mortalidad.</i> | 1 (10)     | 4 (26,7)  | 9 (26,5)    | 0,5      |

ST: Supervivencia Total. SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad.

Los tumores IMS presentan mayor porcentaje de CCR metacrónico (p 0,004). Sin embargo no se observan diferencias en cuanto a presencia de tumores sincrónicos ni neoplasias múltiples a lo largo de la evolución.

En cuanto a la presencia de pólipos, en los tres grupos se desarrollan a lo largo de la evolución, destacando una mayor frecuencia en el grupo de IMS (90%).

2.3.2. Características familiares.

Los antecedentes familiares oncológicos entre los tumores IMS, MACS e INC se muestran en la Tabla IV.29. Como era de esperar, los casos con sospecha de SL predominan en los casos con IMS, mientras que los tumores con INC fueron casos esporádicos y con agregación familiar y en los tumores MACS predominan los esporádicos.

Tabla IV.29. Características familiares.

|   | IMS    | INC     | MACS      | p            |
|---|--------|---------|-----------|--------------|
| <u><i>Agregación familiar de neoplasias</i></u> |        |         |           |              |
| <i>Caso esporádico</i>                          | 0      | 6 (40)  | 20 (58,8) | <b>0,004</b> |
| <i>Agregación familiar</i>                      | 1 (10) | 8 (60)  | 13 (38,2) | NS           |
| <i>Ámsterdam II positivo</i>                    | 9 (90) | 1 (6,7) | 1 (6,7)   | <b>0,001</b> |

2.3.3. Características moleculares.

Los resultados de la comparación de las características moleculares entre los tumores IMS, INC y MACS se resumen en la Tabla IV.30. Sin presentar significación estadística, vuelve a confirmarse la asociación directamente proporcional entre la IMS y el FM. Por otro lado, como era de esperar, la falta de expresión de las proteínas del sistema de reparación sólo afecta al grupo de CCR con IMS. En cuanto al análisis de la metilación de islas de CpG, los tumores MACS e INC presentan una asociación, discretamente mayor, con FM bajo y cero, sin encontrarse diferencias significativas.

**Tabla IV. 30.** Comparación de las características moleculares (análisis del estado de metilación de islas de CpG.)

|                | <i>IMS</i> | <i>IC</i> | <i>MACS</i> | <i>P</i> |
|----------------|------------|-----------|-------------|----------|
| <i>FM alto</i> | 3 (30)     | 2 (13)    | 7 (20,6)    |          |
| <i>FM bajo</i> | 4 (40)     | 6 (40)    | 13 (38,23)  |          |
| <i>FM cero</i> | 3 (30)     | 7 (46,6)  | 14 (41,17)  | NS       |

En definitiva, se puede resumir que las principales características que diferencian los tumores MACS son: localización del tumor, con un predominio por el colon izquierdo (41,17%); mayor proporción de tumores productores de mucina respecto a los INC, pero menor que en los IMS; y mayor afectación ganglionar y presencia de metástasis en el momento del diagnóstico, similar a los INC. La estadificación tumoral muestra diferencias significativas ( $p=0,004$ ), con un predominio por los estadios iniciales. Los tumores MACS presentaron muy baja asociación con la vía del fenotipo metilador (21%).

### 3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR.

Como se detalla en el apartado de Material y métodos, atendiendo a las alteraciones moleculares relacionadas con la carcinogénesis colorrectal, se clasifica al CCR en cuatro grupos según el estado de la IMS y el FM. En este apartado se describen y comparan las características anatómo-patológicas y familiares de los grupos establecidos. Los resultados se exponen en la Tabla IV.31.

Cuatro pacientes (5,9%) presentan IMS y FM alto y se caracterizan por una edad precoz de aparición del CCR, siendo la edad media al diagnóstico de 29 años, y mayor predilección por el colon derecho (75%). Se diagnostican en estadios iniciales (25% en estadio I y 75% en estadio II). Los cuatro casos cumplían criterios clínicos de

Ámsterdam II y se clasificaron como SL. La presencia de IMS y FM bajo/cero se observa en seis casos (8,8%), con predominio por el sexo masculino (83,3%) y por la localización izquierda del colon (66,7%). Sus características histopatológicas destacan por presentar el mayor porcentaje de tumores productores de mucina (66,7%) y células en anillo de sello (16,7%), en comparación con los otros grupos. Los seis casos se diagnostican en estadio II y presentan una importante agregación familiar con el SL. De los 69 casos con EMS, 9 pacientes presentan FM alto; mientras que 49 pacientes presentan FM bajo/cero, siendo el grupo más frecuente (72,1%). Los pacientes con EMS y FM alto se diagnostican a una edad media más tardía (40,1 años). El 56% de estos tumores se localizan en el colon derecho y la mitad de los casos son productores de mucina. Más de la mitad (56%) se consideran casos esporádicos. En los pacientes con EMS y FM bajo/cero se observa una mayor preferencia por el colon izquierdo y recto y una mayor frecuencia de tumores diagnosticados en estadios más avanzados (22,4%). Dentro de este grupo, el 45% de los tumores presentan agregación familiar para el CCR.

Los tumores con FM alto, con o sin IMS se localizan predominantemente en el colon derecho. Los casos de SL se relacionan con IMS, independientemente del FM, sin embargo los casos con EMS, también presentan cierta agregación familiar con tumores asociados o no con el SL.

En la Tabla IV. 31 se resumen las principales características clínicas y familiares del CCR según su clasificación molecular.

Tabla IV.31. Resumen datos anatómo-clínicos y familiares según la clasificación molecular.

|  | IMS/<br>FM alto.<br>n (%) | IMS/<br>FM bajo/cero.<br>n (%) | EMS/<br>FM alto.<br>n (%) | EMS/<br>FM bajo/cero.<br>n(%) | P                |
|--|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------|
| <i>Pacientes</i>                         | 4(5,9)                    | 6 (8,8)                        | 9(13,2)                   | 49 (72,1)                     |                  |
| <i>Edad media (DE)</i>                   | 29,25 (3,3)               | 37,17(3,3)                     | 40,3(1,3)                 | 40,1(4,8)                     | <b>&lt;0,001</b> |
| <b><u>Sexo:</u></b>                      |                           |                                |                           |                               |                  |
| <i>Hombre</i>                            | 2(50)                     | 5(83,3)                        | 4(44,4)                   | 31(63,3)                      |                  |
| <i>Mujer</i>                             | 2(50)                     | 1(16,7)                        | 5(55,6)                   | 18(36,7)                      | NS               |
| <b><u>Localización:</u></b>              |                           |                                |                           |                               |                  |
| <i>Derecho</i>                           | 3(75)                     | 2(33,3)                        | 5(55,6)                   | 6(12,2)                       |                  |
| <i>Izquierdo</i>                         | 1(25)                     | 4(66,7)                        | 2(22,2)                   | 24(49)                        |                  |
| <i>Recto</i>                             | 0                         | 0                              | 2(22,2)                   | 19(38,8)                      | <b>0,007</b>     |
| <i>Mucinoso</i>                          | 1/3 (33,3)                | 4/6 (66,7)                     | 3/6(50)                   | 9/40 (22,5)                   | 0,11             |
| <b><u>Células en anillo de sello</u></b> |                           |                                |                           |                               |                  |
| <i>Ausencia de Mlh1</i>                  | 0/3 (0)                   | 1/6 (16,7)                     | 0/6 (0)                   | 2/40 (5)                      | NS               |
| <i>Mutación BRAF</i>                     | 2(50)                     | 1(16,7)                        | 0                         | 0                             | <b>&lt;0,001</b> |
| <i>Mutación de genes</i>                 | 0                         | 0                              | 0                         | 1(2,1)                        | NS               |
| <i>MMR</i>                               | 4(100)                    | 3(50)                          | 0                         | 0                             | <b>&lt;0,001</b> |
| <b><u>TNM:</u></b>                       |                           |                                |                           |                               |                  |
| <i>I</i>                                 | 1(25)                     | 0                              | 3(33,3)                   | 14(28,6)                      |                  |
| <i>II</i>                                | 3(75)                     | 6(100)                         | 3(33,3)                   | 13(26,5)                      |                  |
| <i>III</i>                               | 0                         | 0                              | 2(22,2)                   | 11(22,4)                      |                  |
| <i>IV</i>                                | 0                         | 0                              | 1(11,1)                   | 11(22,4)                      | <b>0,06</b>      |
| <b><u>Historia familiar de</u></b>       |                           |                                |                           |                               |                  |
| <b><u>CCR:</u></b>                       |                           |                                |                           |                               |                  |
| <i>Amsterdam tipo II</i>                 | 4 (100)                   | 5(83,3)                        | 0                         | 5(10,2)                       | <b>0.001</b>     |
| <i>Agregación Lynch</i>                  | 0                         | 1(16,7)                        | 3(33,3)                   | 12(24,5)                      |                  |
| <b><u>Agregación no</u></b>              |                           |                                |                           |                               |                  |
| <i>Lynch</i>                             | 0                         | 0                              | 1(11,1)                   | 10(20,4)                      |                  |
| <i>Esporádico</i>                        | 0                         | 0                              | 5(55,6)                   | 22(44,9)                      | <b>0,028</b>     |

### 4. ESTUDIO COMPARATIVO DEL CCR DE APARICIÓN PRECOZ SEGÚN SU LOCALIZACIÓN EN EL COLON.

Como se sabe, el CCR se desarrolla a partir de diferentes vías de carcinogénesis, las cuales, presentan características clinicopatológicas diferentes, entre ellas la localización en el colon. Una vez analizado de forma global el CCR en adultos jóvenes, y posteriormente según las diferentes vías de carcinogénesis, procedemos a identificar y comparar las distintas características anatomoclínicas, familiares y moleculares, según criterios de localización tumoral.

#### 4.1. Características anatomoclínicas.

De la muestra total de pacientes (88 casos), el 25% de los CCR se localizan en el colon derecho, el 43,2% en el colon izquierdo y el 31,8% en el recto. Los CCRs de localización derecha se diagnostican a una edad media más precoz (34 años) en comparación con los localizados en colon izquierdo y recto, con una edad al diagnóstico de 38 años en ambos casos. La distribución por sexos, es homogénea en los tumores de colon derecho, mientras que en el colon izquierdo y recto destaca una frecuencia mayor de hombres. Tanto en la edad al diagnóstico como en la distribución por sexos no se observan diferencias significativas al comparar los tres grupos.

Las características histopatológicas de cada localización y los resultados de la comparación se resumen en la Tabla IV.32. No se observan diferencias en el grado de diferenciación, en la producción de mucina ni en la presencia de células en anillo de sello. Aunque, los tumores localizados en el lado derecho del colon, muestran un porcentaje mayor de casos con bajo grado de diferenciación (22,2%), la producción de moco es similar en las tres localizaciones y destaca la presencia de células en anillo de

sello en 2 casos de los CCRs que se originan en el recto (9,5%), mientras que en el colon derecho no se identifica ningún caso.

**Tabla IV.32.** Comparación de las características histopatológicas según la localización tumoral.

|  | <i>CCR derecho.</i><br><i>n (%)</i> | <i>CCR izquierdo.</i><br><i>n (%)</i> | <i>CCR recto</i><br><i>n (%)</i> | <i>p</i> |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|----------|
| <b><u>Grado de diferenciación:</u></b>           |                                     |                                       |                                  | NS       |
| <i>Alto</i>                                      | 6 /18 (33,3)                        | 9/26 (34,6)                           | 6/21(28,6)                       |          |
| <i>Medio</i>                                     | 8 /18 (44,4)                        | 14/26 (53,8)                          | 14/21(66,6)                      |          |
| <i>Bajo</i>                                      | 4/18 (22,2)                         | 3/26 (11,5)                           | 1/21(4,7)                        |          |
| <b><u>Producción de moco:</u></b>                |                                     |                                       |                                  | NS       |
| <i>Mucosecretor ( SI/NO)</i>                     | 12(66,7)/6(33,3)                    | 7(26,9)/19(73)                        | 5(23,8)/16(76)                   |          |
| <b><u>Células en anillo de sello( SI/NO)</u></b> |                                     |                                       |                                  |          |
|  | 0 /18 (100)                         | 2(7,7)/ 24(92,3)                      | 2(9,5)/19(90,5)                  |          |

En cuanto a la estadificación tumoral, los CCRs que se localizan en el colon derecho se diagnostican más de la mitad (54,2%) en estadio II, los tumores del colon izquierdo, el 66% en estadios precoces y los CCRs que se originan en recto, el 36% se diagnostican en estadio IV. La comparación entre los tres grupos resulta estadísticamente significativa con una p de 0,004. En relación al pronóstico, también se observan diferencias significativas (p 0,005) en la mortalidad y supervivencia media total de los tumores derechos, izquierdos y de recto, siendo esta última de 95.4%, 68.4% y 53.5% respectivamente. En la Tabla IV. 33 se detallan los resultados expuestos.

**Tabla IV.33.** Comparación de estadificación tumoral, ST, SLE y mortalidad según la localización tumoral.

|                            | <i>CCR derecho.</i> | <i>CCR izquierdo.</i> | <i>CCR recto</i> | <i>p</i>         |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|------------------|
|                            | <i>n (%)</i>        | <i>n (%)</i>          | <i>n (%)</i>     |                  |
| <b><i>Estadio TMN:</i></b> |                     |                       |                  | <b>0,004</b>     |
| <i>I</i>                   | 5 (22,7)            | 13 (34,2)             | 8 (28,6)         |                  |
| <i>II</i>                  | 12 (54,5)           | 12 (31,6)             | 2 (7,2)          |                  |
| <i>III</i>                 | 4 (18,2)            | 3 (7,9)               | 9 (32,1)         |                  |
| <i>IV</i>                  | 1 (4,5)             | 10 (26,3)             | 9 (32,1)         |                  |
| <i>ST</i>                  | 95,4                | 68,4                  | 53,5             | <b>&lt;0,001</b> |
| <i>SLE</i>                 | 72,36               | 48,68                 | 36,7             | <b>0,006</b>     |
| <i>Mortalidad.</i>         | 1 (4,5)             | 12 (31,6)             | 13 (46,4)        | <b>0,005</b>     |

Los tumores localizados en el colon derecho asocian CCR sincrónicos y/o metacrónicos en un 27,3% y neoplasias primarias múltiples en un 30,8%, siendo estadísticamente significativo al comparar con los tumores que se localizan en el colon izquierdo y recto.

En cuanto a la presencia de pólipos, los tumores del colon derecho presentan un mayor número de pólipos a lo largo de la evolución en comparación de los tumores de otras localizaciones (72,7%).

#### **4.2. Características familiares.**

Los antecedentes familiares de los CCRs en función de su localización en el colon muestran diferencias estadísticas y se presentan en la Tabla IV.34. Los CCRs que se localizan en el colon derecho asocian SL en un 40 % y presentan antecedentes familiares del mismo en un 35 %. En los tumores que se localizan en el colon izquierdo predominan los casos esporádicos (51,4 %), en el 31,4 % presentan agregación familiar para neoplasias relacionadas o no con el SL y 6 casos cumplen criterios de Ámsterdam

II. Por último, los CCRs que se localizan en el recto destacan que el 48 % presentan antecedentes familiares de neoplasia asociadas al SL.

**Tabla IV. 34.** Comparación de las características familiares en función de la localización tumoral.

|   | <i>CCR derecho.</i> | <i>CCR izquierdo.</i> | <i>CCR recto</i> | <i>p</i>     |
|---|---------------------|-----------------------|------------------|--------------|
|   | <i>n (%)</i>        | <i>n (%)</i>          | <i>n (%)</i>     |              |
| <b><u>Agregación familiar de neoplasias</u></b> |                     |                       |                  |              |
| <i>Caso esporádico</i>                          | 5 (25)              | 18 (51,4)             | 11 (40,7)        | <b>0,005</b> |
| <i>Agregación familiar SL</i>                   | 7 (35)              | 6 (17,1)              | 13 (48)          | <b>0,032</b> |
| <i>Agregación familiar no SL</i>                | 0                   | 5 (14,3)              | 2 (7,4)          | NS           |
| <i>Ámsterdam II positivo</i>                    | 8 (40)              | 6 (17,1)              | 1 (3,7)          | <b>0,005</b> |

### 4.3. Características moleculares.

A continuación, se comparan los resultados del análisis inmuohistoquímico y el estado metilador de los CCRs localizados en el colon derecho, colon izquierdo y recto.

#### 4.3.1. Inestabilidad de Microsatélites.

Un tercio de los CCRs que se localizan en el colon derecho y el 15% de los que se localizan en el colon izquierdo presentan IMS; mientras que no se identifica ningún caso en los tumores de recto.

#### 4.3.2. Análisis de la metilación de islas de CpG.

En cuanto al FM, se observa que el 50% de los tumores que asientan en el colon derecho presentan FM alto, el 37 % FM bajo y el 12,5% FM cero. En los tumores que se localizan en el colon izquierdo y recto, predomina el FM bajo/0, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con una p de 0,005.

Como se ha indicado con anterioridad, combinando el estado de la IMS y el FM, se clasifica desde el punto de vista molecular al CCR en cuatro grupos. Los resultados, según criterios de localización tumoral se exponen en la Tabla IV. 35.

**Tabla. IV. 35.** Diferencias en la clasificación molecular según la localización tumoral

|                          |                    |                      |                  | <i>p</i>     |
|--------------------------|--------------------|----------------------|------------------|--------------|
|                          | <i>CCR derecho</i> | <i>CCR izquierdo</i> | <i>CCR recto</i> |              |
|                          | <i>n (%)</i>       | <i>n (%)</i>         | <i>n (%)</i>     |              |
| <i>FM alto</i>           | 8/16 (50)          | 3 (9,7)              | 2 (9,5)          |              |
| <i>FM bajo</i>           | 6/16 (37,5)        | 14 (45,2)            | 8 (38,1)         | <b>0,005</b> |
| <i>FM cero</i>           | 2/16 (12,5)        | 14 (45,2)            | 11 (52,4)        |              |
| <i>IMS/FM alto</i>       | 3 (18,8)           | 1 (3,2)              | 0                |              |
| <i>IMS/ FM bajo-cero</i> | 2 (12,5)           | 4 (7,9)              | 0                | <b>0,007</b> |
| <i>EMS / FM alto</i>     | 5 (50)             | 2 (6,5)              | 2 (9,5)          |              |
| <i>EMS/ FM bajo-cero</i> | 6 (37,5)           | 24 (77,4)            | 19 (90,5)        |              |

#### 4.3.3. Análisis de la inestabilidad cromosómica.

Se analiza la INC en 59 casos del total de la muestra mediante la técnica de CGH-array, descrita en el apartado de material y métodos. Estratificamos la muestra en función de la localización tumoral en el colon y los resultados obtenidos se exponen a continuación.

Diez casos (17 %) presentaron IMS, de los cuales el 50% se localizan en el colon derecho y 50% en el izquierdo. En 15 casos (25,42%) se identifica INC y se distribuyen eminentemente en el colon izquierdo (53,3%) y recto (40%). Sólo un caso con INC se localiza en el colon derecho. El 68,4% de los tumores localizados en recto y el 52% de los localizados en colon izquierdo no muestran ni IMS ni INC, considerándose por tanto tumores MACS.

En la Tabla IV.36 se resumen las principales características de los CCRs en función de su localización en el colon.

**Tabla IV. 36.** Características principales de los CCR en función de su localización en el colon.

|   | <i>CCR derecho</i> | <i>CCR izquierdo</i> | <i>CCR recto</i> |              |
|---|--------------------|----------------------|------------------|--------------|
|   | <i>n (%)</i>       | <i>n (%)</i>         | <i>n (%)</i>     | <i>p</i>     |
| <i>Pacientes</i>                                | 22 (25)            | 38 ( 43,2)           | 28 (31,8)        |              |
| <i>Edad media (DE)</i>                          | 34,1 ( 6,4)        | 38,1 (5)             | 38,3 (4,5)       | 0,2          |
| <u><i>Sexo:</i></u>                             |                    |                      |                  |              |
| <i>Hombre</i>                                   | 11 (50)            | 24 ( 63,2)           | 18 (64,3)        | NS           |
| <i>Mujer</i>                                    | 11 (50)            | 14 ( 36,8)           | 10 (35,7)        |              |
| <i>Mucinoso</i>                                 | 6/ 18 (33,3)       | 7/ 26 ( 34,6)        | 5/21 (23,8)      | NS           |
| <i>Células en anillo de sello</i>               | 0                  | 2/ 26 (7,7)          | 2/21 (9,5)       | NS           |
| <u><i>Grado de diferenciación:</i></u>          |                    |                      |                  |              |
| <i>Bajo</i>                                     | 4/18 (22,2)        | 9/26 (34,6)          | 1/21 (4,7)       | NS           |
| <i>Medio</i>                                    | 8/18 (44,4)        | 14/26 (53,8)         | 14/21(66,6)      |              |
| <i>Alto</i>                                     | 6/18 (33,3)        | 3/26 (11,5)          | 6/21 (28,6)      |              |
| <i>Pólipos</i>                                  | 16 (72,7)          | 25 (65,8)            | 12 (42,9)        | 0,08         |
| <u><i>Tipos de pólipos</i></u>                  |                    |                      |                  |              |
| <i>Adenomas</i>                                 | 7 (43,8)           | 13 (54,2)            | 8 (66,7)         |              |
| <i>Hiperplásico</i>                             | 2 (12,4)           | 4 (16,7)             | 2 (16,7)         |              |
| <i>mixtos</i>                                   | 7 (43,8)           | 7 (29,2)             | 2 (16,7)         | NS           |
| <i>CCR sincrónico/ metacrónico</i>              | 6 (27,3)           | 3 (7,9)              | 2 (7,1)          | <b>0,05</b>  |
| <u><i>TNM:</i></u>                              |                    |                      |                  |              |
| <i>I</i>  | 5 (22,7)           | 13 (34,2)            | 8 (28,6)         |              |
| <i>II</i>                                       | 12 (54,5)          | 12 (31,6)            | 2 (7,2)          |              |
| <i>III</i>                                      | 4 (18,2)           | 3 (7,9)              | 9 (32,1)         |              |
| <i>IV</i>                                       | 1 (4,5)            | 10 (26,3)            | 9 (32,1)         | <b>0,004</b> |
| <i>Mortalidad.</i>                              | 1 (4,5)            | 12 (31,6)            | 13 (46,4)        | 0,005        |
| <u><i>Agregación familiar de neoplasias</i></u> |                    |                      |                  |              |
| <i>Caso esporádico</i>                          | 5 (25)             | 18 (51,4)            | 11 (40,7)        | <b>0,005</b> |
| <i>Agregación familiar SL</i>                   | 7 (35)             | 6 (17,1)             | 13 (48)          | <b>0,032</b> |
| <i>Agregación familiar no SL</i>                | 0                  | 5 (14,3)             | 2 (7,4)          | NS           |
| <i>Ámsterdam II positivo</i>                    | 8 (40)             | 6 (17,1)             | 1 (3,7)          | <b>0,005</b> |

*Características moleculares*

|                 |                |                  |             |       |
|-----------------|----------------|------------------|-------------|-------|
| <i>IMS /EMS</i> | 6 (30)/14 (70) | 6(17,1)/29(82,9) | 0/ 26 (100) | 0,005 |
| <i>IC</i>       | 1 (7,7)        | 8 (29,6)         | 6 (31,6)    |       |
| <i>MACS</i>     | 7 (54)         | 14 (52)          | 13 (68,4)   |       |
| <i>FM alto</i>  | 8/16 (50)      | 3 (9,7)          | 2 (9,5)     |       |
| <i>FM bajo</i>  | 6/16 (37,5)    | 14 (45,2)        | 8 (38,1)    | 0,005 |
| <i>FM cero</i>  | 2/16 (12,5)    | 14 (45,2)        | 11 (52,4)   |       |

---

## V. DISCUSIÓN

---



### V. DISCUSIÓN.

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

El CCR es la tercera neoplasia más común y la segunda causa de mortalidad por cáncer en los países desarrollados. El riesgo acumulado es de un 2-6% en la población general y éste riesgo aumenta con la edad. La mayor parte de los CCR ocurren a una edad media de 60-70 años. El CCR de aparición precoz es infrecuente, con una incidencia del 2-8% de todos los CCR. Sin embargo, según muestran los últimos estudios estadísticos su incidencia está aumentando (Boley y Ferlay 2005, Siegel RL et al. 2009).

Dentro del CCR de aparición precoz se identifican subgrupos de CCR con diferentes características clinicopatológicas, familiares y moleculares (Perea J et al. 2011). Además, varios estudios reiteran la existencia de diferencias respecto a aquellos

casos que aparecen en pacientes de mayor edad (Losi L et al. 2005, Fairley TL et al. 2006). Desde el punto de vista clinicopatológico, el CCR en jóvenes se caracteriza por bajo grado de diferenciación, producción de moco, mayor frecuencia de células en anillo de sello, y mayor porcentaje de tumores sincrónicos o metacrónicos, y desarrollo de pólipos durante el seguimiento. En cuanto a la localización, algunos autores muestran predominio por el colon izquierdo y recto, mientras que otras series destacan su origen en el colon derecho (Issa JP et al. 2004, Goel A et al. 2010).

El CCR de aparición precoz es un grupo heterogéneo, que incluye desde casos con un importante componente familiar hasta otros que son esporádicos. En los casos que se asocian al SL aumenta la proporción de tumores a nivel de colon derecho y con mejor pronóstico, mientras que los casos esporádicos destacan por diagnosticarse en estadios más avanzados.

Desde el punto de vista molecular, los CCR de edad precoz pueden subdividirse en tumores con IMS, que se relacionan con el SL; y los que presentan EMS. Este último grupo presentaría una edad más tardía de inicio, menor predominio por colon derecho y menor porcentaje de CCRs sincrónicos y metacrónicos, así como un diagnóstico en estadios extremos. Se originan predominantemente en el colon izquierdo y recto, y presentan mayor frecuencia de tumores mucinosos o con células en anillo de sello.

Desde el punto de vista familiar destaca una mayor agregación familiar y con tumores tipo Lynch (Snover DC 2011, Hawkins NJ et al. 2001, Perea J et al. 2011).

En los últimos años, se ha encontrado que un porcentaje de los tumores con EMS no presentan INC, presente en el grupo general pero más en particular en jóvenes. Este subgrupo parece asociarse con peor pronóstico, fenotipo invasivo, metástasis

temprana y mayor agregación familiar, y podría estar en relación, con nuevos síndromes de CCR hereditarios (como el síndrome de CCR familiar tipo X), y con otras alteraciones moleculares como la mutación del gen KRAS, fenotipo metilador y la mutación en BRAF (Hawkins NJ et al. 2001, Chan TL et al. 2001, Banerjea A et al. 2009).

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

### 2.1. Características anatómico-clínicas.

En nuestra muestra, la edad media al diagnóstico del CCR fue de 39 años, con un rango de edades comprendido entre los 17 a los 45 años. Hemos observado diferencias en la distribución por sexos, encontrando predominio en el varón. Estos datos coinciden con los publicados previamente en la literatura (Losi L et al. 2005).

En la localización de los CCR, existe predilección por el colon izquierdo y el recto, con el 43,2% y 31,8% de los casos. En los datos publicados en la literatura se observan diferencias en este sentido. Series como la de Giraldez et al. (2012) muestra un predominio por el colon izquierdo y recto (81%) y en lo publicado por Losi et al (2005), donde el 49,3% de los casos se localizan en colon izquierdo. También en la serie de Chang et al. (2012) el 44% de los casos se presentan en sigma y el 36% en recto.

Estudios recientes ponen de manifiesto un aumento de la incidencia de cáncer rectal en adultos menores de 50 años (You YN et al. 2011, Yantiss RK et al. 2009). En otras series, sin embargo, destacan un mayor porcentaje de CCR a nivel de colon derecho. Savas et al. (2007) evalúan 41 pacientes de menos de 40 años de edad y observan que el 47% de los casos se localizan en el colon proximal. En la serie de Mahdavinia et al. (2005), estudian 112 casos de CCR menores de 45 años, encontrando

que los pacientes con antecedentes familiares de CCR se localizan más frecuentemente en colon proximal (42%), mientras que los casos esporádicos mostraron predilección por el colon distal (77%). En este sentido también parece apuntar Miltry et al. (2001), concluyendo que el CCR en el colon proximal en pacientes jóvenes podría reflejar una predisposición genética (Mitry E et al. 2001).

El adenocarcinoma mucinoso y carcinoma con células en “anillo de sello” suponen el 10-15% y el 1% del total de CCRs, respectivamente. Diferentes publicaciones indican que el CCR en pacientes jóvenes presenta un predominio de tumores mucinosos y con mayor porcentaje de células en “anillo de sello”; característica que comparten con los tumores asociados a formas hereditarias. Además, algunos estudios han encontrado relación entre una mayor producción de moco en el CCR con peor pronóstico. En nuestra serie, el 74% son adenocarcinomas, con un 27,7 % de casos productores de mucina y 5,2% de tumores con células en “anillo de sello”. Si diferenciamos entre tumores IMS y EMS, se observa una mayor producción de mucina en el primer grupo (54,54% vs 26,5%). Estos datos concuerdan con lo descrito en la literatura: en las series la producción de moco varía desde 9% hasta 24% (Da Fonseca LM et al. 2012, Chang DT et al. 2012, You YN et al. 2011). En estudios con un mayor porcentaje de pacientes con SL, la incidencia de tumores mucinosos es discretamente mayor (Losi L et al. 2005, Mahdavinia M et al. 2005, Savas N et al. 2007).

En cuanto al grado de diferenciación, se observa que el 55,4% de los tumores presentaron grado moderado de diferenciación, el 32,3% alto y el 12,3% bajo grado de diferenciación. Tanto en los tumores con IMS como en los EMS existe predominio de tumores de medio y alto grado de diferenciación, sin mostrar diferencias. Estos datos destacan con respecto a lo publicado hasta el momento en la literatura, donde diferentes

publicaciones describen como característica del CCR de aparición precoz, un mayor porcentaje de tumores de bajo grado de diferenciación. Lo mismo ocurre cuando se estratifica los tumores en base a su IMS, siendo mayor el porcentaje de tumores poco diferenciados. En lo publicado por Chang et al. (2012), el 73% de tumores en edad precoz presenta bajo grado de diferenciación. Sin embargo, en otras series como la de You NY et al. (2011) el grado de diferenciación de los tumores se distribuye homogéneamente, con leve predominio por bajo grado (55,6% de los casos). Los resultados publicados por Fonseca et al. (2012) y Valle et al. (2007) coinciden con los nuestros. En ambas series se observa un predominio de tumores con moderado grado de diferenciación, el 76,45% y 78,6% de los casos, respectivamente. Además, en la serie de Valle et al. (2007) comparan los resultados de tumores con IMS y EMS no objetivándose diferencias, como en nuestra serie. No ocurre lo mismo en el estudio presentado por Losi et al. (2005), donde de forma global la proporción de CCR con moderado grado de diferenciación alcanza el 72%; sin embargo al estratificarlo según la IMS, la proporción de tumores con bajo grado es del 37,5%. En el estudio realizado por Klarskov et al. (2012), que compara las características de diferentes síndromes hereditarios, se observa un mayor porcentaje de tumores pobremente diferenciados en el SL.

La estadificación del CCR es imprescindible para una correcta planificación terapéutica, establecer el pronóstico y el riesgo de recidiva tumoral, y evaluar los resultados del tratamiento. En nuestro estudio, se observa una distribución homogénea del estadio al diagnóstico, con un ligero predominio por los estadios iniciales (ver Tabla IV.4 del capítulo de resultados). Al momento del diagnóstico, el 33,3 % de los casos

presentan metástasis ganglionares y el 23,9% metástasis a distancia. De los casos que no presentan enfermedad a distancia al diagnóstico, el 15,2% presentaron recidiva tumoral.

En las series revisadas predominan los estadios II y III en el momento del diagnóstico con porcentajes que varían de 18,3% al 75% (Losi L et al. 2005, Valle et al. 2007, Chang DT et al. 2012, Yantiss RK et al. 2009, You YN et al. 2011).

En general, el CCR en el adulto joven se diagnostica en estadios avanzados (Liang JT et al. 2003, Chang DT et al. 2012, Hawkins NJ et al. 2001). Una de las causas que podría explicarlo es la ausencia de programas de cribado de CCR en pacientes menores de 50 años, excepto en los casos con antecedentes familiares o personales de cáncer (Castells y Marzo 2009 ). La falta de sospecha clínica puede retrasar el diagnóstico y que éstos pacientes no se traten de forma correcta en la fase inicial de la enfermedad. Parramore et al 1998 publicó una serie de 36 casos de CCR en menores de 40 años, en los que el 97% de los pacientes presentaron sintomatología relacionada con su tumor durante una media de 7,2 meses, incluyendo dolor (72%), rectorragia (58%), alteraciones del ritmo intestinal (53%) y pérdida de peso ( 42%). En el 78% de los casos, el CCR se encontró en estadio III ó IV. Ello indica la necesidad de estar alerta ante cualquier síntoma relacionado con el CCR en este grupo poblacional. De este modo se podría incrementar el diagnóstico precoz y mejorar el pronóstico de estos pacientes. Nuestros resultados, sin embargo, no indican de manera tan manifiesta el predominio de estadios avanzados, tal vez debido al programa de cribado de CCR instaurado en el área sanitaria desde hace ya muchos años. Por otro lado, el carácter histopatológico agresivo del tumor y una posible base genética podría predisponer al desarrollo acelerado de este tumor en pacientes jóvenes. Estudios recientes han demostrado que la IMS puede acelerar el desarrollo de CCR, y por tanto la mayor incidencia de CCR con IMS en

pacientes jóvenes podría resultar en un desarrollo más rápido y el diagnóstico en estadios avanzados. Sin embargo, otros estudios no están de acuerdo con este concepto y defienden que los tumores con IMS no se asocian con estadios más avanzados que los EMS (Lin JT et al. 2005, Liang JT et al. 2003, Calin GA et al. 2000). Este trabajo coincide con lo observado en nuestro estudio, en el que el 75% de los tumores IMS se encuentran en estadio II y ningún caso en estadio IV, y los tumores EMS muestran una distribución homogénea, con 31,8% de los casos en estadio I y el 26% en estadio IV.

En nuestros resultados, ST fue de 58,51 meses, y la SLE de 50,79 meses. Si se excluyen los pacientes que presentan enfermedad a distancia en el momento del diagnóstico (21 pacientes), ambas aumentan a 71,54 y 66,71 meses, respectivamente. Se observó recidiva tumoral en el 15,2% de los casos. De ellos, 27,3% fue a nivel locorregional y 63,5% a distancia. La localización más frecuente de las metástasis a distancia fue el hígado. La mortalidad en nuestra serie fue de 29,54%. El estadio tumoral, en estos pacientes, resultó ser más avanzado en comparación con el grupo total (76,9% vs 23,9% en estadio IV).

Respecto a lo publicado en la literatura, existen estudios que demuestran que el CCR en pacientes jóvenes presenta pobres resultados clínicos (Lin JT et al. 2005, (Da Fonseca LM et al. 2012). Sin embargo, otros artículos encuentran tasas de supervivencia equivalentes o mayores en pacientes jóvenes con CCR en comparación con pacientes añosos, a pesar de presentar un estadio de la enfermedad más avanzado (O'Connell JB et al. 2004). La diferencia respecto a los resultados de CCR en pacientes jóvenes puede deberse a la inclusión de CCR hereditario, particularmente SL, que tiene mejor supervivencia en comparación con el CCR esporádico (Popat S et al. 2005). En la revisión realizada por Chang et al. (2012), muestran que el CCR de aparición precoz, a

pesar de presentar características histológicas que se relacionan con peor pronóstico, presenta tasas de ST y SLE similar a los pacientes mayores de 40 años de edad, aunque observaron mayor incidencia de recurrencia y de desarrollar metástasis a distancia durante su curso de la enfermedad. Estos resultados coinciden con lo publicado por Yeo et al. (2013): En su serie, la supervivencia media a los cinco años fue de 59,4% en pacientes menores de 40 años y de 61,1% en pacientes mayores de 40 años, mientras que la tasa de metástasis locorregionales y a distancia fue mayor en el grupo de los jóvenes (65,7% y 31,5% respectivamente).

En nuestro estudio, 50 pacientes presentaron algún tipo de pólipo en el colon (56,81%). Solo en un caso se detectó previo al diagnóstico de CCR, en 16 pacientes se identificaron en el momento del diagnóstico de CCR (32%), mientras que en 36% se presentaron durante el seguimiento de la cirugía. En el 30% de los casos se identificaron pólipos tanto en el momento del diagnóstico como durante el seguimiento de la cirugía de CCR. De los cincuenta pacientes, seis fueron diagnosticados de PAF; y si se excluyen a éstos, la media de pólipos fue de 1,8.

Hay pocas series en la literatura que analicen la aparición de pólipos en estos pacientes. La serie de Chang et al. (2012) muestra una menor frecuencia de pólipos en el grupo de CCR de inicio precoz en comparación con el grupo de CCR de edad avanzada (19/55 35% vs 39/73 52%  $p=0,034$ ). Solo en 7% se identificaron de forma sincrónica con el CCR, y el número de pólipos identificados fue de 1 a 3.

Se conoce que los individuos afectados por el SL desarrollan pólipos con más frecuencia que la población general y éstos suelen aparecer a edad más temprana, tienen mayor tamaño, y características histopatológicas asociadas a alto riesgo de degeneración (alto índice de displasia y mayor componente vellosos), con una progresión a la

malignización mucho más rápida (Vasen et al. 2007, Cappell. 2008, Jasperson KW et al. 2010, Kastrinos F et al. 2013). En nuestro estudio, el 75% de los casos con CCR IMS presentan algún tipo de pólipo en el colon, en comparación con el 55% de los CCR estables. En los IMS se identifica un predominio de pólipos mixtos (57,14%) y en los EMS de adenomas (52,63%). En otros trabajos, como el publicado por Valle et al. 2007, el porcentaje es menor para ambos tipos de tumores, identificando la presencia de pólipos en el 17,6% de los casos IMS y en el 36% de los EMS.

En nuestros resultados, 5 casos presentaron CCR sincrónico y/o metacrónico, siendo cuatro de ellos sincrónicos. Por otro lado, nueve pacientes presentaron neoplasias extracolónicas; de las cuales dos casos se asocian a SL. En total, 13 pacientes presentaron más de una neoplasia primaria a lo largo de la evolución.

El porcentaje de CCR sincrónico y/o metacrónico varía entre el 5-9,8% según los trabajos publicados. En la serie de Liang et al. (2003), se compara una muestra CCR a edad avanzada con una población de menor o igual a 40 años. El 9,8% de los pacientes jóvenes presentaban CCR sincrónico/metacrónico, mientras que sólo ocurría en el 1,8 % de edad avanzada. En la serie de Perea et al. (2010) se observa una frecuencia de 7% en una población de menos de 45 años, sin apreciarse diferencias al estratificar en función de la inestabilidad de microsatélites. Sin embargo en el estudio de Guillem et al. (1999), se aprecia un aumento de la frecuencia de CCR sincrónico y/o metacrónico asociado con los casos que presentaban antecedentes familiares relacionados con el SL.

A pesar de que no presente componente hereditario, y mientras se desconozcan por completo las bases moleculares del CCR en este rango de edad, el diagnóstico de un CCR en estos sujetos no sólo ha de determinar la necesidad de un seguimiento para

diagnosticar de forma precoz posibles recidivas, sino, como se ha visto según los resultados expuestos, debido al alto riesgo de desarrollar otros pólipos en el colon, así como CCR sincrónicos y/o metacrónicos, incluso neoplasias a otros niveles. Desde nuestro punto de vista, el seguimiento en estos sujetos, mientras no se demuestre lo contrario, incluso en aquellos sin componente hereditario comprobado y conocido, ha de ser de por vida, a nivel del colon, y en el resto de órganos de manera individualizada.

### **2.2. Características familiares.**

Como se ha mencionado previamente en la Introducción, un 30% aproximadamente de los CCR presentan un componente familiar. Un 5% son formas de CCR hereditario (Síndrome de Lynch, Poliposis Adenomatosa Familiar, etc), mientras que un 20-30% son casos que presentan agregación familiar para el CCR, cuyas bases moleculares están por definir (Lindor et al. 2005, Valle et al. 2007).

En el CCR de aparición precoz se incluyen tanto casos esporádicos como casos con importante componente familiar. En este grupo poblacional es más probable la identificación de casos de SL; por ello diferentes publicaciones proponen la utilización de la edad precoz, junto con otras características, como herramienta efectiva para la identificación del mencionado síndrome (Perea J et al. 2011, Jaspersen KW et al 2010a, Pucciarelli S et al. 2003).

De los 82 casos analizados de nuestra serie (excluidas las seis familias diagnosticadas de PAF), 32 casos (39%) fueron considerados casos de CCR esporádicos, no presentando antecedentes familiares de CCR ni neoplasias relacionadas con el SL. Se identificaron 34 casos (41,4%) con agregación familiar para el CCR y 19,5% cumplían los criterios de Ámsterdam para el SL.

Lo publicado en la literatura muestra que el porcentaje de casos con antecedentes familiares relacionados con el SL varía según el punto de corte de la edad al diagnóstico. En la serie de Losi et al. (2005), se emplea el mismo criterio de edad que en nuestro estudio, y el número de casos que cumplían criterios clínicos de SL fue de 7 (10%), un porcentaje menor respecto al nuestro. Datos similares se observan en el estudio realizado por Steinhagen et al. (2012), en el que analizaron 198 pacientes con diagnóstico de CCR en menores de 50 años de edad. De ellos, 9 casos (4,5%) presentaron criterios de *Ámsterdam II* y 61 casos (30,8%) presentaron agregación familiar de CCR (10,1% con antecedentes de CCR en familiares de primer grado y 20,7% en familiares de segundo grado). Sin embargo, el porcentaje es mayor en la serie publicada por Jaspersen et al. (2010a) que establecen la edad de corte en 35 años de edad. De los 96 casos de CCR de menos de 36 años, identificaron que el 18% de los casos cumplían criterios clínicos de *Ámsterdam*, el 28% los de *Bethesda* y un 54% fueron casos esporádicos.

La diferencia de porcentajes parece tener relación con la edad de corte, y por tanto, cuanto menor es la edad de corte, mayor es la proporción de casos con SL. Por el contrario, cuanto mayor es la edad de corte, mayor es el porcentaje de casos con EMS. Sin embargo, en comparación con CCR estables en ancianos, el CCR con EMS en jóvenes muestra mayor agregación familiar y presencia de tumores tipo *Lynch*, pudiendo estar en relación con nuevos síndromes de CCR hereditarios (Hawkins NJ et al 2001, Chan TL et al 2001, Valle et al. 2007, Banerjee A et al 2009).

Hasta el momento, la historia familiar de CCR se ha considerado un factor de riesgo más importante en sujetos jóvenes que en edades más avanzadas, y representa un 7% del total de CCR en adultos jóvenes (Giovannucci E 2006, Rosato V et al. 2013). En

el trabajo de Perea et al. (2011) se analiza la presencia de antecedentes familiares neoplásicos en el grupo de CCR en el adulto joven con un grupo control de CCR en edad avanzada. Como era de esperar, se observa un predominio de casos con antecedentes o agregación familiares en el grupo de adulto joven (61% vs 24,7%). De éstos, el 20% cumplían criterios clínicos de Ámsterdam para el SL y sólo un caso lo cumplía en el grupo de CCR de edad avanzada. En la serie publicada por Yantiss et al. (2009) destaca, sin embargo, que el porcentaje mayor de casos con historia familiar corresponde a pacientes mayores de 50 años. En este estudio, sin embargo, se analiza la presencia de antecedentes neoplásicos en familiares de primer grado, sin detallar si cumplen criterios de Ámsterdam o si presentan agregación con otras neoplasias.

Son pocos los estudios que detallan los tipos de neoplasias que presentan cada una de las familias, así como si se asocian o no al SL. En nuestro trabajo, las neoplasias más frecuentes de los familiares de aquellos casos que cumplían criterios de Ámsterdam fueron lógicamente aquellas relacionadas con el síndrome: CCR, gástrico, ovario, útero, vías urinarias, sistema nervioso central y páncreas (ver Tabla IV.8 del capítulo de resultados). En las familias con “agregación con neoplasias relacionadas con el SL” se observa la misma distribución, con un predominio del CCR (44,1%) y del adenocarcinoma gástrico (17,64%). Además, se identificaron 13 familias con agregación para neoplasias no relacionadas con el SL. Las neoplasias más frecuentes fueron el cáncer de pulmón (12,19%) y mama (10,97%), seguido de tumores ORL, leucemias y adenocarcinoma de próstata (ver Tabla IV.9 del capítulo de resultados). Destaca, que tanto el cáncer de mama como el cáncer de pulmón está presente en ambos grupos con agregación (SL y casos con agregación familiar), aunque el porcentaje es mayor para el grupo de agregación familiar (14,7% y 20,58% respectivamente). Ello se

podría explicar debido a la alta incidencia en la población de estos dos tipos de neoplasias.

Existen familias donde pueden concurrir factores genéticos, como podría ser el caso de aquellas con “agregación familiar” y EMS, donde serían ciertos genes de baja susceptibilidad al cáncer los que se concentrarían en ellas, y cuyo efecto conjunto les conferiría un aumento del riesgo para el desarrollo de diferentes neoplasias. En este sentido, aquellos casos que, cumpliendo criterios clínicos de *Ámsterdam*, presentaran EMS, se hallarían los casos englobados dentro del denominado Cáncer Colorrectal Familiar tipo X (Jasperson KW et al. 2010, Lindor et al. 2005). En cuanto a la asociación de tumores diferentes a los habituales relacionados con el SL en aquellas familias que cumplían criterios clínicos de sospecha de dicho síndrome, también se señala esta posibilidad en algunas publicaciones. Este sería el caso de la neoplasia de laringe, que se apunta que podría estar dentro del abanico de tumores asociados a dicho síndrome, aunque las series correspondientes presentan una muestra reducida, o son reseñas de un único caso (Lynch HT et al. 1988, Maul JS et al. 2006). En el trabajo de Oliveira et al. (2004), se analizó el espectro de neoplasias de las familias asociadas al SL, o familias con cierta agregación de neoplasias relacionadas, sin criterios de edad al diagnóstico, y se encontró que el cáncer de mama es el de más frecuente aparición dentro de las neoplasias que no se asocian por definición al SL, presente tanto en familias con criterios clínicos o con agregación, con un 26,5% y 27,8%, respectivamente.

### 2.3. Características moleculares

#### 2.3.1. Vía mutadora o de Inestabilidad de microsatélites.

##### 2.3.1.1. *Inestabilidad de microsatélites.*

La IMS se debe a una alteración del sistema de reparación de errores del ADN, y conduce a la acumulación de errores de los microsatélites, distribuidos por todo el genoma (Peltomaki et al. 2003). 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, donde las mutaciones son a nivel germinal. En los casos esporádicos, tiene lugar de manera adquirida, mediante un silenciamiento a nivel epigenético por hipermetilación a nivel de la región promotora de cualquiera de los genes relacionados con el sistema MMR (Grady WM et al. 2004).

En los 81 casos en los que se llevó a cabo el análisis se obtuvieron como resultado 12 (14,81%) tumores que presentaron IMS.

En los trabajos publicados, con un criterio de selección por edad similar al nuestro, la proporción de tumores con IMS varía entre 19,7% y el 41% (Liang JT et al. 2003, Pucciarelli S et al. 2003, Losi L et al. 2005, Yiu R et al. 2005). Cuando comparamos nuestros resultados se observa que la proporción de tumores con IMS apenas alcanza el límite inferior de lo expuesto en la literatura. En la serie publicada por Losi et al. (2005), el porcentaje de tumores que presentaron IMS fue de 19,7%, mientras que en el trabajo publicado por Perea et al. (2010), alcanza el 31%. En el estudio de Liang et al. (2003), el porcentaje de casos inestables es de 29,4%. Liang et al. subdividen en tres categorías por edad (13-19; 20-29 y 30-39) al conjunto de casos con CCR en adulto joven y observan que el porcentaje mayor de casos con IMS y con

antecedentes familiares corresponde a las dos primeras en comparación con el grupo de 30-39 años. Estos últimos resultados, de acuerdo con otros estudios publicados muestran que la frecuencia de la IMS es inversamente proporcional a la edad al diagnóstico, como hemos indicado previamente, de modo que el porcentaje de IMS aumenta según disminuye la edad de diagnóstico de CCR (Durno C et al. 2005). También se observa un mayor porcentaje de IMS en aquellos trabajos en los que se incluye un número mayor de CCR relacionados con el SL. Este es el caso de Valle et al. (2007), que incluye en su estudio 64 pacientes con criterios Ámsterdam tipo I, de los cuales 59,4% presentaron IMS.

Cuando se comparan los CCR en el adulto joven con los CCR a edad avanzada, los porcentajes de IMS varían según la literatura. En lo publicado por Liang et al. (2003), el porcentaje de IMS pasa de 29,4% en los CCR menores o iguales a 40 años, a 6,3% en los CCR iguales o mayores de 60 años. Sin embargo, Chang et al. (2012) no encontraron diferencias. En dicho trabajo, el 17% de los CCR menores de 40 años y el 14% de los CCR a edad avanzada mostraron IMS. La ausencia de diferencias entre los dos grupos podría estar en relación con un mayor número de CCR con IMS por hipermetilación del promotor de MLH1 en dicha serie, más frecuente en casos esporádicos y de edad avanzada (Grady WM et al. 2004, Snover DC 2011).

Según nuestros resultados, llama la atención que la edad precoz de CCR no se asocie en mayor proporción con el SL, ya que sólo un pequeño subgrupo muestra alteraciones en el sistema de reparación del ADN. Diferentes publicaciones sugieren que sólo 1 de cada 20 pacientes jóvenes con CCR es atribuible a una mutación germinal de los genes del sistema de reparación del ADN, y por tanto, la mayoría presentan EMS y representan otro grupo en el que, por el momento su etiología genética no se ha

descubierto totalmente (Chang DT et al. 2012, Antelo M et al. 2012, Limburg PJ et al. 2011).

### 2.3.1.2 *Análisis inmunohistoquímico de las Proteínas del sistema de reparación.*

Estudios realizados recomiendan el análisis IHQ de las proteínas del sistema MMR como método de detección de pacientes con SL, puesto que presenta una mayor sensibilidad y especificidad que los criterios clínicos de Ámsterdam y Bethesda, y facilita el estudio de los genes del sistema MMR, ya que la ausencia de expresión de las proteínas indica directamente el análisis del gen correspondiente. Al comparar la IHQ y el análisis de la IMS, esta última presenta una ligera mayor sensibilidad, aunque se considera que ambos métodos son igual de válidos a la hora de detectar a los candidatos para el estudio genético (Hampel H et al. 2008, Pérez-Carbonell L et al. 2012).

En nuestra serie, en todos los tumores que presentan IMS, se identifica ausencia de expresión de alguna de las proteínas del sistema de reparación. En cinco casos, se observa ausencia de expresión de la proteína Mlh1, que se confirma con la mutación del gen en cuatro casos; y solo en uno, la falta de expresión se debe a hipermetilación del promotor de *MLH1*. La falta de expresión de la proteína Msh2 y Msh6 se identifica en seis y cinco casos respectivamente, identificándose mutación del gen *MSH2* en ocho casos. En nuestro estudio la tasa de alteraciones de la IHQ (14,8%) está dentro del rango (12-21%) descrito en otros estudios que examinaron la incidencia de alteraciones IHQ en pacientes con CCR a edad precoz, incluso sin tener en cuenta la edad de inicio (Goel A et al. 2010, Giráldez MD et al. 2012, Pinol V et al. 2004, Steinhagen E et al. 2012). En el trabajo de Steinhagen et al. (2011), analizan la IHQ de todos los tumores en menores o igual a 50 años. De un total de 198 pacientes, 38 (19,1%) presentaron ausencia de expresión de alguna de las proteínas MMR y en 10 casos se identificaron

mutación genética (5,1%). 4,5 % del total de pacientes cumplían criterios de Ámsterdam II, mientras que 30,8% presentaban agregación familiar para CCR. Tan solo el 20% de los casos con mutación genética identificada cumplían criterios clínicos para el SL.

El estudio llevado a cabo por Limburg et al. (2011), determina la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo para la identificación de mutaciones para la IHQ siendo de 85,7%, 91,9%, 33,3% y 99,3% respectivamente; mientras que para los criterios Ámsterdam fue de 36,4%, 96,7%, 40% y 96,2% respectivamente. La mayoría de los estudios en los que se analizan las estrategias de aproximación para el estudio genético concluyen que el uso único de los criterios de Ámsterdam y Bethesda no es suficiente para identificar a portadores de mutaciones asociadas al SL. Varios estudios revelan que la mayoría de los pacientes con alteraciones de las proteínas del sistema MMR no muestran antecedentes familiares de CCR ni otras neoplasias asociadas al SL (Niessen RC et al. 2006, Antelo M et al. 2012, Liang JT et al. 2003). En nuestro trabajo, sin embargo, dos casos con mutación pertenecen al grupo de agregación familiar (16,6%), sin cumplir los criterios de Ámsterdam y los diez casos restantes sí lo hacen.

### 2.3.1.3. *Análisis genético.*

El 83,3% de los casos con IMS mostraron mutación de algunos de los principales genes implicados en la reparación del ADN (40% *MLH1*, 40% *MSH2* y 20% *MSH6*). Dos casos no mostraron mutación genética; uno de ellos presentó una hipermetilación del gen *MLH1*, mientras que en el otro no se encontró alteración a pesar de la ausencia de expresión de la proteína Msh6.

El porcentaje de mutaciones en los genes MMR en nuestro trabajo coincide con lo publicado previamente. En ellos la tasa de mutaciones varía desde el 8,9% hasta el 92,59% de los casos con IMS (Niessen RC et al. 2006, Liang JT et al. 2003, Perea J et al. 2010, Antelo M et al. 2012). La variabilidad en los porcentajes se debe principalmente al criterio de selección de los pacientes. En cuanto a la localización de las mutaciones encontramos coincidencias con la literatura. En la serie de Nissen et al. 2006, el 32% de las alteraciones identificadas se localizaron en *MLH1*, el 36% en *MSH2* y el 32% en *MSH6*, mientras que en lo publicado por Perea et al. 2010, el 37,5 % de las mutaciones se hallaron en *MLH1* y el 62,5% en *MSH2*. Hay que señalar, que en este último estudio no se tuvo en cuenta el análisis de *MSH6*.

2.3.2. Vía serrada o Fenotipo metilador. Como se describe en la introducción, en la actualidad se reconoce que el CCR comprende una familia de enfermedades con diversas vías moleculares. La vía serrada o el FM es la vía de carcinogénesis identificada más recientemente y hoy en día no hay duda de que las lesiones serradas son el precursor inmediato de las lesiones con FM e IMS, y probablemente también se relacionen con las que presentan EMS. Los tumores que surgen de esta vía suponen el 35% de los CCR y se caracterizan por la metilación de islas CpG promotoras de genes supresores de tumores, lo que provoca un silenciamiento epigenético. Los mecanismos que están implicados son múltiples, siendo los más comunes la activación del gen *BRAF* y la metilación del promotor de *MLH1* (Van Rinjsoever M et al. 2002, Samowitz W et al. 2005, Snover DC 2011, Menéndez P et al. 2012, Armaghany T et al. 2012).

En nuestro trabajo, se completa el análisis molecular del CCR en pacientes jóvenes con el estudio de patrones de metilación de genes promotores en 68 pacientes del total de 88 casos. Hallamos que el 19,1% presentan FM alto, el 41,17% FM bajo y el

39,7% FM cero. Al comparar con la literatura observamos que nuestros resultados coinciden con lo publicado, a pesar de que en ninguno de ellos el análisis se realiza exclusivamente en población joven. En dos estudios con un número relativamente alto de pacientes con CCR se obtiene un porcentaje de metilación que varía de 12% a 25%, disminuyendo al excluir los casos que mostraban IMS. En ninguno de los dos estudios se tiene en cuenta el grado de metilación (Hawkins NJ et al. 2001, van Rinjsoever M et al. 2002).

Una subdivisión común dentro del CCR para la vía del FM se realiza en función de la IMS. Se considera que los tumores con EMS engloban los CCR que siguen la vía supresora y el 60% aproximadamente de CCR con FM positivo; mientras que los IMS engloban los CRC relacionados con SL y el 40% de tumores metilados (Snover DC 2011). En nuestro estudio al clasificar los tumores en función de la IMS, los resultados que obtuvimos fueron los siguientes: en el grupo de los tumores IMS, 5,9% presentaron FM alto y 8,8% FM bajo o cero; mientras que en los tumores EMS, 13,2% fueron FM alto y 72,1% FM bajo o cero.

En la literatura revisada, se encuentran pocos trabajos que describan las características de los CCR con FM en la población joven. Sin tener en cuenta la edad al diagnóstico, Hawkins et al. (2002), en su estudio de 396 casos y van Rinjsoever et al. (2002), con 275 pacientes con CCR, describieron la relación entre el FM y la localización del CCR en el colon proximal, sexo femenino, edad avanzada, estadio avanzado, producción de moco, P53 nativo, IMS y mutación de *KRAS*. En otros estudios más recientes, también se ha identificado mayor número de mutaciones de *BRAF V600E* (Kambara T et al. 2001, Nagasaka T et al. 2004). En la serie de Samowitz et al. (2005), el 29,8% de los CCR analizados presentaron FM alto; de éstos 82,1%

fueron tumores con IMS. Se identificó hipermetilación de *MLHI* en 21,3% del total, 15,3% de los casos EMS (66% de los cuales presentan FM bajo) y 80,2% de los casos IMS, y se observó una relación importante con mutaciones en *BRAF V600E* en los tumores con FM alto (64,1% en IMS y 17,6% en EMS).

En nuestro trabajo, se observó que el 61,5% de los tumores con FM alto se localizan proximales al ángulo esplénico, el 44,4% son productores de moco y el 22,2 % presenta bajo grado de diferenciación. También se encuentra un porcentaje mayor de casos que cumplen criterios de Ámsterdam II y presencia de tumores relacionados con el SL. Desde el punto de vista molecular, 4 de 10 casos presentan mutación de los genes MMR, 2 casos presentan hipermetilación de *MLHI* y en ninguno de los casos se identifica mutación de *BRAF*.

Los estudios más recientes, muestran que el CCR de inicio precoz con FM alto consiste en dos subgrupos: por un lado, los que se presentan mutación del gen *BRAF* (similar a los CCR esporádicos con IMS en pacientes añosos) y por otro lado, aquellos sin mutación de *BRAF* y metilación limitada al promotor del gen *MLHI*. Este último grupo parece presentar tumores con características similares al SL (Goel A et al. 2010, van Roon EH et al. 2010).

### 2.3.3. Vía supresora o Inestabilidad cromosómica.

Realizamos el análisis de la INC en 59 pacientes total de 88 casos y obtenemos que el 16,94 % presentan IMS, el 25,42 % INC y el 57,63% no muestran IMS ni INC, definiéndose como MACS. Según diferentes trabajos, el porcentaje de MACS varía entre 17-50%, siendo más frecuente en los jóvenes que en la población general (Cai G et al. 2008, Silver A et al. 2012 ). Los tumores MACS se han identificado recientemente y

en principio, presentan características diferentes a otros CCR. Debido a que es un subgrupo de CCR que está adquiriendo importancia y es objetivo de investigación de numerosos estudios, discutimos sus características, así como la comparación con otros CCRs en el apartado 3.3.

### 3. ESTUDIO COMPARATIVO.

#### **3.1. Estudio comparativo de la vía mutadora. Tumores estables (EMS) e inestables (IMS).**

Como se ha comentado previamente, la IMS caracteriza a aquellos tumores, en los que se produce una alteración del sistema de reparación de errores del ADN. Se detecta en el 15% de los CCR; 3% de éstos se asocian con el SL, cuya base molecular son mutaciones a nivel germinal, mientras que el otro 12% son casos esporádicos y se producen por hipermetilación a nivel de la región promotora de los genes relacionados con el sistema de reparación del ADN ( Grady WM et al. 2004, Peltomaki et al. 2003, Boland y Goel 2010). Hoy en día, se acepta que el CCR con IMS presenta características clínico-patológicas y moleculares diferenciales respecto a los que presentan EMS, lo que sugiere que surgen de vías de carcinogénesis distintas (Boland y Goel 2010, Giacomini CP et al. 2005).

En nuestro trabajo, comparamos las características clínico-patológicas y moleculares entre los CCR en el adulto joven que presentan IMS Y EMS, con el objetivo de identificar los rasgos diferenciadores.

### 3.1.1 Características anatómo-clínicas.

Una de las primeras características que muestran diferencias estadísticamente significativas, es la edad al diagnóstico y podría deberse a un mayor porcentaje de casos hereditarios en el grupo de IMS. La edad media en los tumores con IMS es de 34,3 años y en los EMS de 40,4 años. Esta discrepancia en la edad al diagnóstico se observa en otros trabajos revisados. En el trabajo de Losi et al. (2005), con una edad de corte de 45 años, se observa una edad media de 38,2 en el grupo de IMS y de 40,1 en los EMS. Perea et al. (2010), presenta resultados similares, siendo la edad media de 37 y 41 años, respectivamente.

La localización del CCR a nivel del colon también presenta diferencias. En nuestro trabajo, los tumores con EMS muestran predominio por el CCR izquierdo (42%) y por el recto (37,68%), mientras que los IMS se distribuyen homogéneamente (50%). Los resultados expuestos en la literatura presentan un claro predominio del grupo de los IMS por el colon derecho, así como por el colon izquierdo y recto en el caso de los tumores con EMS. En el trabajo de Losi et al. (2005), el 64,3% de los tumores con IMS y el 24,6% de los EMS se sitúan en el colon derecho. Tanto en el trabajo de Liang et al. (2003) como en el de Perea et al. (2010), se observan porcentajes similares. En la serie de Liang et al. el 73,2% de los CCR derechos presentaban IMS, mientras que en la de Perea et al. el 69% de los tumores con IMS se localizaban en el colon derecho, mientras que solo lo hacían el 38% de los EMS.

Los tumores con IMS presentan ciertos rasgos fenotípicos característicos. Entre ellos, se ha descrito mayor frecuencia de tumores pobremente diferenciados, con mayor presencia de células en anillo de sello y producción de moco (Morán A et al. 2010, (Da

Fonseca LM et al. 2012). Estas características también se relacionan con el CCR de aparición precoz (Chang DT et al. 2012, Liang JT et al. 2003, Lin JT et al. 2005, O'Connell JB et al. 2004).

En nuestros resultados, el grado de diferenciación, tanto en los tumores con IMS como en los EMS fue predominantemente de grado medio y alto grado de diferenciación, sin mostrar diferencias. La presencia de células en anillo de sello y la producción de moco fue mayor en los tumores con IMS en comparación con los EMS (54,54% vs 26,5%), con tendencia a la significación estadística.

Estos resultados coinciden con lo publicado en otros trabajos como el de Losi et al. (2005), Liang et al. (2003), Valle et al. (2007) y Perea et al. (2010), con un predominio de grado medio de diferenciación tanto en los tumores con EMS como en los IMS. En estudios con un mayor porcentaje de pacientes con SL, el porcentaje de tumores pobremente diferenciados, así como la incidencia de tumores mucinosos es discretamente mayor (Klarskov L et al. 2012, Savas N et al. 2007).

La comparación de la estadificación tumoral de los casos con IMS frente a los EMS, muestra diferencias estadísticamente significativas. El 75% de los tumores con IMS se encontraban en estadio II y ningún caso en estadio IV; mientras que los tumores EMS mostraron una distribución homogénea, con 31,8% de los casos en estadio I y el 26% en estadio IV (ver Tabla IV 16 del capítulo de resultados).

Al comparar nuestros resultados con la literatura, destaca un mayor porcentaje de casos de estadios avanzados tanto en los tumores EMS como los IMS. El grupo de Losi et al. (2005) presenta una distribución por estadios con predominio de los estadios II y III. Sin embargo, no se observan, como en nuestro trabajo, diferencias

significativas al comparar los tumores en función de su estado de inestabilidad. En la serie de Liang et al. (2003), tampoco se muestran diferencias al comparar el estadio de la enfermedad al diagnóstico. Presentan una distribución homogénea, con ligero predominio por los estadios III y IV.

En cuanto a la ST, SLE, aparición de recidiva tumoral y mortalidad, nuestro trabajo muestran que los pacientes que presentan IMS presentan tasas más favorables. Cuando se excluyen aquellos casos que presentaban enfermedad a distancia en el momento del diagnóstico y/o presentan recidiva tumoral a lo largo del seguimiento, la SLE y ST aumenta en el grupo de EMS sin alcanzar los valores del grupo de IMS. Nuestros resultados coinciden con lo publicado en la literatura, que concluye que el CCR con IMS presentan mejores tasas de supervivencia y que la IMS se puede considerar un factor independiente de buen pronóstico (Popat S et al. 2005, Gryfe R et al. 2000).

### 3.1.2. Características familiares.

Al comparar las características familiares entre los dos grupos de CCR definidos, se observa que el 83,3% de los tumores con IMS pertenecen a las familias que cumplen criterios de *Ámsterdam II*, frente al 8,7% de los tumores con EMS. Los tumores con EMS son casos con agregación familiar, el 26% con neoplasias relacionadas con el SL y el 19% con otras neoplasias, y el 100% de los casos esporádicos.

El SL se define por la IMS, como consecuencia de alteraciones en los genes implicados en la reparación del ADN. La mayor proporción de casos con características relacionadas con el SL se observa dentro del CCR de inicio precoz (Yiu R et al. 2005).

En nuestros resultados se muestra que el 83,3% de los casos de IMS se explican por mutaciones en los genes de reparación del ADN y ningún caso se define como esporádico. Estos porcentajes dan como consecuencia la equivalencia de fenotipos entre los casos con IMS en los casos jóvenes en muestras con la mayoría de características que presenta el SL. Sin embargo, en otros trabajos el porcentaje es menor. En la serie de Losi et al. 2005, 50% de los tumores IMS pertenecen a familias que cumplen criterios de Ámsterdam II, y 36% son CCR esporádicos. En el trabajo de Steinhagen et al. 2012, 16% de los tumores IMS se definen como SL.

En el grupo con EMS, hay que tener en cuenta los casos con antecedentes familiares que cumplen los criterios de Ámsterdam y el porcentaje de casos con agregación familiar, tanto para neoplasias relacionadas como no con el SL. En nuestra serie, el 8,7% y el 45% de los casos con EMS, respectivamente. Estas características, junto con la edad precoz, hacen pensar en el componente genético del cáncer. Varios autores proponen, que estos casos, en especial aquellos que cumplen criterios de Ámsterdam, podrían estar en relación con nuevos síndromes de CCR hereditarios, cuyas bases genéticas aún no se conocen, como el síndrome familiar tipo X (Chan TL et al. 2001, Hawkins NJ et al. 2001, Banerjea A et al. 2009, Valle et al. 2007, de la Chapelle 2003, Lindor et al. 2005, Johnson V et al. 2005).

### 3.1.3. Características moleculares.

El análisis de la IHQ relacionada con las proteínas del sistema de reparación del ADN, muestra, como era de esperar, diferencias entre los dos grupos IMS y EMS. Mientras que en los tumores EMS presentan expresión normal de las proteínas del sistema MMR, en los tumores IMS es donde se observan alteraciones de la expresión.

Éstos resultados, como se ha mencionado previamente, son esperables y coinciden con lo publicado (Lanza G et al. 2002, Stone JG et al. 2001, Lindor NM et al. 2002, de Jong AE et al. 2004). La correlación que se observa entre el análisis de la inestabilidad y la IHQ, demuestra que ambos estudios sirven como herramienta eficaz para la selección de casos candidatos al análisis de las mutaciones en los genes de reparación (Vasen et al. 2007, Balmaña J et al. 2010, Byfield y Syngal 2008, Kuppermann M et al. 2013).

Las características entre los grupos con IMS y EMS, según los diferentes perfiles de metilación se discute en el apartado 4.

### **3.2. Estudio comparativo de la vía serrada o Fenotipo Metilador.**

Como se describe previamente en el apartado 2.3.2, en nuestro trabajo se observó que más de la mitad de los tumores con FM alto se localizan en el colon proximal, asocian producción de mucina y bajo grado de diferenciación. Además, presentan una mayor frecuencia de casos que cumplen criterios de Ámsterdam II y presencia de tumores relacionados con el SL. Desde el punto de vista molecular, la mayoría se deben a mutación de los genes MMR, 2 casos presentan hipermetilación de *MLH1* y ninguna mutación de *BRAF*.

Los trabajos publicados en la literatura, asocian el FM con la localización del CCR en el colon derecho, estadio avanzado, producción de moco, IMS, mutación de *KRAS* y *BRAF V600E*. (Kambara T et al. 2001, Nagasaka T et al. 2004). En la población joven, se observa que los casos con mutación del gen *BRAF*, presentan características similares a el CCR en el anciano con IMS, mientras que los casos que se deben a hipermetilación del promotor del gen *MLH1*, se asemejan al SL (Goel A et al. 2010, van Roon EH et al. 2010).

En el apartado 4, se describe con detalle el estudio comparativo del perfil metilador, en base a la clasificación molecular del CCR.

### **3.3. Estudio comparativo de la vía mutadora o inestabilidad de microsatélites. Tumores con Inestabilidad de microsatélites, Inestabilidad de cromosomas y MACS.**

Los tumores MACS representan un subgrupo de cáncer colorrectal que asocian tanto estabilidad de microsatélites como cromosómica. Además no pertenecen estrictamente a la vía serrada. Este grupo, en principio presenta características clínicas, patológicas y moleculares diferentes a otros CCR, aunque con resultados muy diversos en la literatura.

#### 3.3.1. Características anatomo-clínicas.

En nuestro trabajo, se analiza la INC en 59 casos mediante técnica de CGH-array. El 57,63% de los CCR (34 casos) resultó presentar EMS así como estabilidad cromosómica, y por tanto se clasificaron como MACS. En la literatura, el porcentaje de MACS varía entre 17-50% según diferentes series (Cai G et al. 2008, Silver A et al. 2012 ). En nuestra estudio el número de casos supera el 50%, y ello podría deberse a que los MACS se identifican con más frecuencia en CCRs en jóvenes (Chan TL et al. 2001). En cuanto a las características clínicopatológicas, encontramos que la edad media al diagnóstico es de 40 años; y en cuanto a la distribución por sexos, el 58,8% de los pacientes son hombres y el 41,2% mujeres. Las diferentes localizaciones de los CCR, existe una preferencia por el colon izquierdo y recto (41,2% y 38,2% respectivamente). Respecto a las características histológicas, el 53,8% presenta grado medio de diferenciación y el 34,6% son neoplasias con alto grado de diferenciación.

Dentro de la producción de moco, el 23,5% son tumores mucosecretores y 3,8% (un caso) presenta células en anillo de sello. Nuestros resultados no difieren respecto a otros estudios publicados en la literatura (Banerjea A et al. 2009, Tang R et al. 2004, Silver A et al. 2012 ).

En la serie de Banerjea et al. (2009), el 30,8% se clasifican como MACS, siendo el 57% hombres y el 43% mujeres. El 60% de los CCR se localizan en el recto y el 54% presentan moderado grado de diferenciación. En la serie de Silver et al. (2012), 60 casos de 170 (35%) son MACS, con una distribución homogénea entre sexos (53% varones y 47% mujeres). También, se observó mayor predilección por el recto (45%), moderado grado de diferenciación (75%) y producción de moco en el 22% de los casos.

Los MACS parecen asociarse con peor pronóstico y presentar metástasis en el momento del diagnóstico (Banerjea A et al. 2009, Hawkins NJ et al. 2001). En nuestra muestra, existe una distribución homogénea del estadio al diagnóstico, con predominio de los estadios iniciales. El 41,2% de los casos presentan metástasis ganglionares y el 20,6% metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. La ST fue, de media, de 60,17 meses, y la SLE de 51,26 meses. Nueve pacientes (26,5%) fallecen como consecuencia de la evolución de su enfermedad. En el estudio de Banerjea et al. (2009) el 64% de los casos presentaron un estadio II según clasificación TNM y un porcentaje de mortalidad de 36%. Banerjea et al. (2009) demostraron que los tumores MACS presentaban una recidiva precoz de la enfermedad y una supervivencia significativamente menor que los tumores IMS e INC. Ello lo asociaron con que los MACS mostraban una respuesta inmunológica disminuida o inhibida en relación con otros fenotipos de CCR. Cai et al. (2008) describieron que el 69,2% de los MACS se

diagnosticaron en estadio III/IV. El 61,5% de los casos presentaron metástasis ganglionares y el 15,4 % metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

Al revisar la literatura, se pone de manifiesto que no existe consenso en cuanto al pronóstico de este subgrupo de CCR. Mientras que algunos estudios muestran que los MACS tienen mejor tasa de supervivencia en comparación con CCR con IMS y INC (Kakar S et al. 2008, Silver A et al. 2012 ); otros observan que los MACS presentan peor pronóstico (Banerjea A et al. 2009).

Al realizar el estudio comparativo entre los tumores con IMS, INC y MACS, observamos que en nuestro trabajo, no se identifican diferencias estadísticamente significativas ni en la edad al diagnóstico ni en la distribución por sexos. Aunque, los CCR con IMS se diagnostican a una edad más precoz (34,3 años), en comparación con los tumores MACS e INC, cuya edad media es de 40,3 y 39,5 años respectivamente; y presentan predominio por el sexo masculino (80%). Una de las principales características con diferencias estadísticamente significativas es la localización del tumor. Los CCR con INC y MACS predominan en el colon izquierdo (53,3% y 41,2%), seguido de recto y rectosigma (40% y 38,2%), mientras que los tumores con IMS se distribuyen en el colon derecho e izquierdo de forma equivalente. Respecto a las características histológicas, en los MACS y en los INC predomina el grado medio de diferenciación (53,8% y 75% respectivamente), y en los IMS el 50% presentaron alto grado de diferenciación. El porcentaje de tumores con producción de mucina es mayor en los MACS que en los INC (23,5% vs 13,3%), pero menor que en los IMS (23,5% vs 30,8%), sin alcanzar la significación estadística. Nuestros resultados coinciden con los descritos en otras series. En el trabajo de Banerjea et al. (2009), se observan diferencias estadísticamente significativas en relación con la distribución del CCR en el colon. Los

tumores con INC y los MACS se originan predominantemente en recto (51% y 60%, respectivamente), mientras que el 81% de los CCR con IMS asientan en el colon derecho. En el grado de diferenciación no se encuentran diferencias al comparar los tres grupos de tumores. Aunque los IMS presentan una proporción relativamente mayor de tumores pobremente diferenciados (31%). Silver et al. (2012) compara las características entre los tres grupos de CCR en una serie de 170 casos y observa un predominio significativamente mayor por la localización izquierda del colon en los tumores INC y MACS que en los IMS. La frecuencia de la producción de moco fue mayor en los MACS que en los INC (22% vs 7%), pero menor de la observada en los IMS (22 % vs 39%). En relación al grado de diferenciación, el porcentaje de bajo grado de diferenciación en los MACS es mayor que en los INC, sin alcanzar la significación estadística, pero menor respecto a los IMS.

En nuestra serie, encontramos diferencias al comparar el estadio tumoral de los CCR con IMS frente a los INC y MACS. El 100% de los CCR con IMS se diagnostican en estadio II según la clasificación TNM. La afectación ganglionar es mayor en los MACS y en los INC, siendo esta diferencia significativa. También, sin alcanzar la significación, se describe una mayor frecuencia de metástasis en el momento del diagnóstico en comparación con los tumores IMS. Nuestros resultados no se corresponden con lo descrito por Banerjea et al. (2009) y Silver et al. (2012) en sus trabajos. En ninguno de ellos se observan diferencias al comparar el estadio tumoral, presentando una mayor frecuencia por el estadio II en los tres grupos de CCR. En cuanto a las tasa de supervivencia y mortalidad, observamos que los pacientes con tumores con IMS presentan una SLE y ST más favorable y una tasa de mortalidad menor respecto a los otros dos grupos. Al comparar los tumores MACS frente a los

INC, destacamos la ausencia de diferencias tanto en la tasa de supervivencia como de mortalidad. En la literatura, no existe consenso en cuanto al pronóstico de los MACS. Mientras que algunos trabajos demuestran una tasa de supervivencia mayor para los MACS respecto a los IMS e INC (Kakar S et al. 2008, Silver A et al. 2012 ), otros presentan peor pronóstico para los MACS y mejores tasas de supervivencia en el grupo de los IMS (Banerjea A et al. 2009, Hawkins NJ et al.2001). Por lo tanto, parece necesaria la realización de más estudios que permitan aclarar la supervivencia a largo plazo de los tumores MACS en comparación con los IMS e INC.

Finalmente, coincidiendo con lo descrito por otros autores (Kakar S et al. 2008), en nuestro trabajo, no encontramos numerosos rasgos diferenciales dentro del grupo de los CCR con EMS, al comparar los MACS respecto a aquellos con INC.

### 3.3.2. Características familiares.

Al analizar nuestros resultados describimos que, los casos con sospecha de SL predominan en los tumores con IMS (90%), mientras que los tumores con INC fueron casos esporádicos (33,3%) y con agregación familiar (60%) y en los tumores MACS, el 55,8% se consideran esporádicos y el 44,% presentan agregación familiar para el CCR.

Hay pocos trabajos publicados que comparen las características familiares de los tres grupos de CCR. En la literatura se analiza cada uno de éstos grupos por separado, como se ha descrito en apartados anteriores. Los tumores con IMS pueden ser esporádicos (hipermetilación de *MLH1*), o bien relacionarse con síndromes hereditarios, concretamente con el SL, como ocurre en nuestro trabajo (Losi L et al. 2005). En el grupo de CCR con INC se encuentran la mayor parte de los casos esporádicos (cerca del 85%), pero también se incluyen los casos de PAF, que presentan mutaciones germinales

del gen *APC* (Armaghany T et al. 2012, Pino MS et al. 2010). En cuanto a los tumores MACS, algunos estudios publicados concluyen que los tumores MACS podrían estar relacionados con síndromes familiares de CCR, basándose en la mayor frecuencia de estos tumores en pacientes jóvenes y con antecedentes familiares de CCR. Sin embargo, otros estudios piensan que la EMS y cromosómica no predispone a un síndrome hereditario (Chan TL et al. 2001, Rex DK et al. 2012).

### 3.3.3 Características moleculares.

Se realiza el análisis de la IHQ relacionada con las proteínas del sistema de reparación del ADN. Como era de esperar, la falta de expresión de alguna de ellas sólo afecta al grupo de CCR con IMS. Posteriormente, se estudia el perfil metilador de cada uno de los grupos y se compara entre ellos, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas. El mayor porcentaje de tumores con FM alto se asocia con los IMS (30%), mientras que los tumores MACS e INC presentan una asociación discretamente mayor con FM bajo/0 (ver Tabla IV 30 del capítulo de resultados).

Aunque se conocen pocos datos desde el punto de vista molecular, varios estudios han observado que los MACS se asocian con FM bajo. En la serie de Silver et al. (2012) el 68% de los casos presentan FM 0 y el 34% FM bajo. Sin embargo, otros estudios como el de Cai et al. (2008), relacionan los MACS con un FM alto, en un 46,2%. En los MACS es poco frecuente tanto la mutación del gen *BRAF* como la ausencia de expresión del gen *MLH1*; y parecen presentar un patrón de hipometilación al compararlos con CCRs con IMS o INC. Esto plantea la posibilidad de que la hipometilación del gen LINE-1, características de las formas de edad precoz de

aparición del CCR podrían estar en relación con los MACS (Silver et al. 2012, Antelo et al. 2012).

La falta de consenso en la caracterización molecular, hace necesario la realización de investigaciones futuras sobre el papel de la metilación del ADN en los MACS utilizando un gran número de genes implicados en la carcinogénesis (Silver A et al. 2012, Tang R et al. 2004, Cai G et al. 2008, Kakar S et al. 2008, Banerjea A et al. 2009).

#### 4. CLASIFICACIÓN MOLECULAR.

Tras la realización de una revisión bibliográfica, hasta lo que conocemos, nuestro trabajo es el primero que caracteriza el CCR en adultos jóvenes según su clasificación molecular.

Basándonos en el estado de IMS y de metilación, definimos los cuatro grupos moleculares definidos y que cada vez son más aceptados de la clasificación molecular del CCR (Jass JR et al. 2007, Ogino S y Goel A 2008). En nuestro trabajo, en el grupo con IMS, 4 casos (40%) presentaron FM alto y 6 casos (60%) FM bajo o cero; mientras que en el grupo con EMS, 9 casos (13,2) fueron FM alto y 50 casos (72,1%) FM bajo o cero.

Siguiendo esta clasificación, el grupo con IMS y FM alto se relaciona con CCR pobremente diferenciado, producción de moco y presencia de células en anillo de sello. Desde el punto de vista molecular se asocia con mutación del gen *BRAF* e hipermetilación del promotor *MLH1*. En nuestros resultados, sin embargo, todos los casos con IMS y FM alto se corresponden con SL; y los dos casos con IMS sin encontrarse mutación de los genes MMR se engloban dentro de FM bajo. Esto podría

explicarse por el bajo grado de mutación del gen *BRAF* en la población joven (Goel A et al. 2010, Giráldez MD et al. 2012). Por otro lado, el criterio de inicio precoz podría modificar las características de este grupo debido al alto porcentaje de casos de SL identificados. El grupo de IMS y FM bajo/cero se asocia con rasgos clínicopatológicos y familiares característicos del SL. En nuestro estudio, el 66,7% de los CCR se localizan en el colon izquierdo y presentan una importante agregación familiar. El 50% de los casos de SL se engloban dentro de este grupo. El grupo de EMS y FM alto se caracterizan por presentar mayor predominio por el colon derecho, pobre diferenciación tumoral y presencia de células en anillo de sello. Estos rasgos coinciden con lo descrito en nuestros resultados; y en cuanto a las características familiares el 33% presentan agregación familiar con neoplasias Lynch. Por último, el grupo con EMS y FM bajo es el grupo más frecuente. En nuestro estudio supone el 72% y se caracteriza por un predominio por el recto y rectosigma, una distribución homogénea en todos los estadios y desde el punto de vista familiar, el 45% presentan agregación familiar tanto con neoplasia relacionadas como no con el SL e identificándose 10% de casos que cumplen criterios de *Ámsterdam II*. Este subgrupo de tumores podría explicarse dentro de síndromes hereditarios cuyas bases moleculares no están completamente definidas, como el síndrome familiar tipo X o los denominados MACS.

### 5. ESTUDIO COMPARATIVO DEL CCR DE APARICIÓN PRECOZ SEGÚN SU LOCALIZACIÓN EN EL COLON.

Varios estudios sugieren que la localización del tumor es uno de los factores más influyentes en la morfología del CCR. Los trabajos que comparan las características del CCR en función de su localización, muestran que existen diferencias desde el punto de vista clinicopatológico, familiar y genético, así como en los factores de riesgo, al comparar los tumores que se originan en el lado derecho del colon con los localizados en el colon izquierdo y recto (Snaebjornsson P et al. 2010).

Cada vez más, se sugiere que las diversas diferencias entre el cáncer del lado derecho y del lado izquierdo del colon y recto puede deberse, en parte, a diferencias entre el colon derecho, colon izquierdo y recto normal, tales como el origen embriológico, propiedades fisiológicas, biológicas y expresión genética. Esto predispondría a seguir vías de carcinogénesis y progresión diferentes en función de la localización en el colon (Li FY et al. 2009, Oleg K. Glebov et al. 2003, Iacopetta 2002).

En la literatura, son varias las publicaciones que comparan las características del CCR en función de la edad y en función de su localización en el colon de forma independiente. Sin embargo, hasta el momento, no se encuentran trabajos publicados que estudien las características del CCR en el adulto joven según su localización en el colon.

En nuestro trabajo, una vez estudiado el CCR en adultos jóvenes de forma global, identificamos y comparamos sus características según criterios de localización tumoral.

### 5.1. Características anatómicas-clínicas.

En nuestra serie, el 25% de los CCR se localizan en el colon derecho, el 43,2% en el colon izquierdo y el 31,8% en el recto. Los resultados muestran que los tumores que se localizan en el colon derecho se diagnostican a una edad media más precoz (34 años) y su distribución por sexos es homogénea; mientras, los tumores que se localizan en el lado izquierdo del colon y en recto se diagnostican a una edad media discretamente mayores (38 años) y predominan en hombres.

Sin tener en cuenta la edad al diagnóstico, en la literatura encontramos varios trabajos relacionados con la localización en el colon del CCR. En cuanto a la edad al diagnóstico y la distribución por sexos, la mayoría de los estudios sugieren una frecuencia diferente según ambas variables. En el trabajo de Nawa et al. (2008) se describe un porcentaje mayor de CCR localizado en el colon derecho en pacientes de edad avanzada. Cuando se estratifica por intervalos de edad, se observa que la proporción de CCR derecho es relativamente mayor en pacientes menores de 40 años (33%) y mayores de 80 años (43%). La proporción de mujeres, también es significativamente mayor en los casos de tumores localizados en el lado derecho del colon (52% vs 39%). Snaebjomsson et al. (2010) concluyen en su trabajo, que a medida que aumenta la edad de las mujeres aumentan los casos de CCR en el colon derecho. En cambio, en los hombres el mayor número de casos que se localizan en el colon derecho ocurren en pacientes jóvenes.

En nuestra serie de CCR en menores de 45 años, destaca un porcentaje claramente mayor de casos que se originan en el colon izquierdo y recto, con un predominio del sexo masculino (60,2%). Estos resultados coinciden con lo publicado en

otras series que indican que el cáncer de colon derecho se observa con frecuencia en las personas de edad avanzada y en las mujeres, mientras que el cáncer de colon izquierdo predomina en la población joven y en los hombres (Gonzalez EC et al. 2001, Iacopetta 2002, McCashland TM et al. 2001). Posiblemente, como se indica más adelante, la menor proporción de casos con IMS en nuestra serie sea la razón principal para la menor proporción de casos localizados a nivel de colon derecho.

En cuanto al estudio histopatológico, determinadas características se han asociado con los tumores que se localización en el lado derecho del colon, como bajo grado de diferenciación, presencia de células en anillo de sello y producción de mucina, cuya frecuencia es mayor al comparar con los tumores que se originan en el colon izquierdo y recto. Dichas características también han sido descritas para el CCR de aparición precoz (Ghazi S et al. 2012, Snaebjornsson P et al. 2010, Nawa T et al. 2008).

En nuestro trabajo, no observamos diferencias para ninguna de las características histopatológicas descritas al comparar las tres localizaciones del CCR. Los tumores localizados en el lado derecho del colon, muestran un porcentaje mayor de casos con bajo grado de diferenciación (22,2%), pero, sin embargo la producción de moco es similar en las tres localizaciones y los dos casos que presentan células en anillo de sello se localizan en el recto. Estos resultados difieren de lo esperado. Al tratarse de una serie de CCR en adultos jóvenes se podría esperar un porcentaje mayor de tumores localizados en el colon derecho con características histológicas relacionadas con síndromes hereditarios, como el SL (Ghazi S et al. 2012). De nuevo la proporción mayor de casos con EMS puede ser la razón de esta diferencia.

Los resultados de la estadificación tumoral muestran diferencias estadísticamente significativas. Los CCRs que se localizan en el colon derecho se

diagnostican más de la mitad (54,2%) en estadio II, los tumores del colon izquierdo, el 66% en estadios precoces y los CCRs que se originan en recto, el 36% se diagnostican en estadio IV. Los estudios realizados en la población general, independientemente de la edad al diagnóstico, indican que los CCR que se desarrollan en el lado derecho del colon se diagnostican en estadios más avanzados que los que se originan en el colon izquierdo y recto; y sugieren que puede ser debido a que los tumores en el colon derecho son menos sintomáticos que los del colon izquierdo y recto (Nawa T et al. 2008, Ghazi S et al. 2012).

Según la literatura, el CCR en adultos jóvenes se diagnostica en estadios avanzados. Sin embargo en las series revisadas, predominan los estadios II y III, lo que coincide con nuestros resultados (Losi L et al. 2005, Valle et al. 2007, Yantiss RK et al. 2009, Chang DT et al. 2012, You YN et al. 2011). En nuestra serie, el CCR localizado en el colon derecho se diagnostica en estadios iniciales en el 77,2 % y solo un caso (4,5%) en estadio avanzado. En los tumores localizados en el colon izquierdo y principalmente en recto se observa un porcentaje mayor de casos en estadios avanzados (26,3% y 35,7 % respectivamente). Estos resultados pueden explicarse por un mayor porcentaje de casos asociación con antecedentes familiares relacionados con SL en el CCR derecho (73%), y por tanto, la eficacia de los programas de seguimiento de población de alto riesgo en nuestro centro.

### **5.2. Características familiares.**

Los antecedentes familiares de los CCRs según criterios de localización en el colon muestran diferencias estadísticamente significativas. El 27,2% de los CCRs que se localizan en el colon derecho cumplen criterios Ámsterdam II, y el 73% presentan antecedentes familiares de neoplasias asociadas al SL. En cambio, los casos esporádicos

predominan en los tumores que se localizan en el colon izquierdo (51,4 %) y recto (40,7 %). En los tumores de colon izquierdo el 31,4% presenta agregación familiar para el CCR y 6 casos se asocian con el SL, mientras que los tumores de recto el 55,4% asocia antecedentes familiares de neoplasias relacionadas con el SL. Estos resultados coinciden con la literatura. En el SL es más frecuente que la neoplasia se localice a nivel proximal del colon, por lo que se espera identificar; mayor porcentaje de casos que cumplan criterios de *Ámsterdam II* en el colon derecho en comparación con las otras localizaciones (Jasperson KW et al. 2010, Balmaña J et al. 2010, Valle et al. 2007). Por otra parte, llama la atención el alto porcentaje de casos con antecedentes familiares en los tumores localizados en el recto y en el colon izquierdo. Estos casos podrían estar en relación con nuevos síndromes hereditarios cuyas bases moleculares y caracterización fenotípica están por establecer, como puede ser el denominado CCR Familiar tipo X (Lindor et al. 2005, Valle et al.2007).

### **5.3. Características moleculares.**

Los conocimientos de las características moleculares en función de la localización del CCR en el colon en una población de adultos jóvenes son limitados.

En nuestro trabajo se realiza el análisis de la IMS y se observa que el 33,3% de los tumores que se localizan en el colon derecho y el 15% de los que se localizan en el colon izquierdo presentan IMS. Por el contrario, todos los tumores que se desarrollan en el recto presentan EMS. Como es de esperar, los casos relacionados con el SL, y por tanto, que presentan IMS, asientan con mayor frecuencia a nivel derecho del colon (Jasperson KW et al. 2010, Goodenberger M et al. 2011).

En cuanto al estado de metilación, existen diferencias significativas al comparar el CCR en función de su localización. Mientras que en los tumores del colon derecho predomina en FM alto (37%), en los del colon izquierdo y recto predomina el FM bajo/cero (45,2% y 52,4 respectivamente).

El estudio de la INC muestra que el 17% presentan Estabilidad Cromosómica, cuya distribución es homogénea entre el colon derecho y el izquierdo. La INC ocurre en un 25,4% de los tumores, localizándose sobre todo en el colon izquierdo (53,3%) y recto (40%). El 68,4% de los tumores localizados en recto y el 52% de los localizados en colon izquierdo son tumores MACS.

## VI. CONCLUSIONES

---



### VI. CONCLUSIONES

1. En nuestra serie, en el CCR del adulto joven predomina el sexo masculino y muestra en más de la mitad de los casos grado medio de diferenciación, una elevada frecuencia por el colon izquierdo (43%) y recto (32%), producción de mucina en un tercio de los casos y pólipos en el 57%.
2. El 59% de los tumores de nuestra serie se diagnosticaron en estadios iniciales, mientras que el 33% presentaron metástasis ganglionares y el 23,9% metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.
3. La presencia de antecedentes familiares es común en este grupo de pacientes. El 41,4% de los casos muestra agregación familiar de CCR y el 19,5% cumplen criterios de *Ámsterdam II*.

4. A pesar de que en la población joven es más probable la identificación de casos con SL, sólo el 15% de los tumores presenta IMS, de los que el 83% de los casos se debe a mutaciones germinales de los genes MMR. Los tumores con IMS se diagnostican a una edad media más precoz que los casos estables, y predominan los casos de SL, así como mayor agregación familiar de neoplasias asociadas con el SL.

5. La mayoría de los CCR en adultos jóvenes en nuestra serie presentan EMS (85%). Predomina en el CCR izquierdo (42%) y recto (38%) y la mitad de los casos muestran agregación familiar y con tumores tipo Lynch, lo que hace suponer su asociación con la presencia de genes de baja penetrancia, entre los que posiblemente se hallen los implicados en el CCR Familiar tipo X.

6. En nuestra serie, menos de un tercio de los tumores presentan FM alto. Algunas de las características que presentan los CCR con FM se solapan con las descritas para el SL: el predominio por el colon proximal, menor grado de diferenciación y producción de mucina, así como la mayor agregación familiar.

7. Más de la mitad de los tumores (57,63%) presentan estabilidad de microsatélites y cromosómica y se definen como MACS. En la población joven, las características de los tumores MACS no muestran numerosas diferencias, en especial respecto a aquellos con INC. Esto sugiere la necesidad de buscar nuevos marcadores moleculares a los que asociar al criterio de la INC para definir como un subgrupo de CCR independiente.

8. En cuanto a la aplicación de la clasificación molecular del CCR, podemos concluir que los tumores con IMS y FM alto se asocian con el SL en el 100% de nuestros casos, mientras que los tumores con IMS y FM bajo predominan en los hombres y en el colon distal, con mayor producción de mucina e importante agregación familiar con el SL.

Más de la mitad de los tumores con EMS y FM alto (56%) son esporádicos y se localizan en el colon derecho. Por último, los tumores con EMS y FM bajo, son el grupo más frecuente y predominan en el colon distal. Éstos se diagnostican en estadios más avanzados y el 45% presentan agregación familiar para el CCR.

9. La localización del CCR en jóvenes condiciona características clínicas y moleculares propias, que pueden llevar a un nuevo enfoque en el manejo clínico del CCR. En nuestro trabajo, el CCR derecho se asocia con mayor número de casos de SL, mayor frecuencia de CCR sincrónico y/o metacrónico y pólipos. Un tercio de los casos son inestables y más de la mitad presentan FM alto. Por otro lado, el CCR izquierdo son casos esporádicos el 60%, la mayoría se diagnostican en estadios iniciales (66%), se asocian con FM bajo/cero y el 15% presentan IMS. Los tumores que se localizan en recto destacan por la ausencia de asociación con SL, FM alto e IMS, se diagnostican en estadios avanzados (36%) y más de la mitad presentan antecedentes familiares de neoplasias asociadas al SL.

10. Basándonos en nuestros resultados, concluimos que el CCR en el adulto joven parece ser un grupo heterogéneo de CCR, con diferencias moleculares, clinicopatológicas y familiares respecto a las series publicadas de CCR en población general. Por el momento, no se conoce completamente su base molecular y se sugiere la implicación de genes poco habituales en el desarrollo del CCR en esta población.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

---



## VII. BIBLIOGRAFIA

Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Sep; 27(9):1423-31. Review.

Antelo M, Balaguer F, Shia J, Shen Y, Hur K, Moreira L, et al. A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PLoS One*. 2012; 7(9):e45357.

Armaghany T, Wilson J D, Quyen Chu, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Research* 2012 Jan;5:19-27.

Atkin WS, Saunders BP. Surveillance guidelines after removal of colorectal adenomatous polyps. *Gut*. 2002 Oct; 51 Suppl 5: V6-9.

Baca B, Beart RW Jr, Etzioni DA. Surveillance after colorectal cancer resection: a systematic review. *Dis Colon Rectum*. 2011 Aug; 54(8):1036-48.

Balmaña J, Castells A, Cervantes A. ESMO Guidelines Working Group. Familial colorectal cancer risk: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2010 May; 21:Suppl 5:v78-81.

Banerjea A, Hands RE, Powar MP, et al. Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence. *Colorectal Dis* 2009; 11:601-8.

Bartlett DL, Chu E. Can metastatic colorectal cancer be cured? *Oncology (Williston Park)*. 2012 Mar; 26(3):266-75.

Berends MJ, Hollema H, Wu Y, van Der Sluis T, Mensink RG, ten Hoor KA, et al. MLH1 and MSH2 protein expression as a pre screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hiperplasia and cancer. *Int J Cancer* 2001; 92: 398-403.

Bertario L, Russo A, Sala P, Varesco L, Giarola M, Mondini P, et al. Multiple approach to exploration of genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *J clin oncol*. 2003 May 1; 21(9):1698-1707.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5.

- Boland CR y Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. Jun 2010;138 (6): 2073-2087.
- Boley and, Ferlay. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-488.
- Borràs, Josep Maria. Cribado del cáncer colorrectal en España. Epidemiología del cáncer colorrectal. Dentro de cribado del cáncer colorrectal en España. ¿es coste efectivo? *Alianza para la prevención del cáncer colorrectal*. Madrid, 2011.
- Buess G, Theiss R, Gunther M, et al. Endoscopic surgery in the rectum. *Endoscopy* 1985; 17:31-35.
- Byfield SA, Syngal S. Clinical guidelines versus universal molecular testing: are we ready to choose an optimal strategy for Lynch syndrome identification? *Am J Gastroenterol*. 2008 Nov. 103(11):2837-40.
- Cai G, Xu Y, Lu H, Shi Y, Lian P, Peng J, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic microsatellite and chromosomal- stable colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23:365-373.
- Calin GA, Gafà R, Tibiletti MG, Herlea V, Becheanu G, Cavazzini L, et al. Genetic progression in microsatellite instability high (MSI-H) colon cancers correlates with clinico-pathological parameters: A study of the TGRbetaR11, BAX, hMSH3, hMSH6, IGF1R and BLM genes. *Int J Cancer*. 2000 May 20;89(3): 230-5.
- Cappell., Mitchell S. Pathophysiology, clinical presentation, and management of Colon cancer. *Gastroenterology clinics of North America* 2008; 37:1-24.
- Carro, Angel, Daniel Rico, Oscar M. Rueda, Ramon Diaz-Uriarte, y David G. Pisano. waviCGH: a web application for the analysis and visualization of genomic copy number alterations. *Nucleic Acids Research*. 2010; vol 38, Web server issue. doi:10.1093/nar/gkq44).
- Castells A, Marzo-Castillejo M, Mascort J, et al. Guía de prácticas clínicas en prevención del cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol*. 2009 Dec; 32(10): 717. e1-58.
- Chan TL, Curtis LC, Leung SY, Farrington SM, Ho J WC, Chan A SY, et al. Early-onset colorectal cancer with stable microsatellite DNA and near- diploid chromosomes. *Oncogen* 2001;20:4871-4876.

Chang AJ, Nahas CS, Araujo SE, et al. Early rectal cancer: local excision or radical surgery? *J Surg Educ*. 2008 Jan- Feb; 65(1):67-72.

Chang DT, Pai RK, Rybicki LA, Dimaio MA, Limaye M, Jayachandran P, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features. *Mod Pathol*. Aug 2012; 25(8):1128-39.

Christensen M, Katballe N, Wikman F, Primdahl H, Sorensen FB, Laurberg S, et al. Antibody-based screening for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma compared with microsatellite analysis and sequencing. *Cancer* 2002;95: 2422-2430.

Christoforidis D, Cho HM, Dixon MR, et al. Transanal endoscopic microsurgery versus conventional transanal excision for patients with early rectal cancer. *Ann Surg* 2009 May; 249(5):776-82.

Codina A, Farrés R, Olivet F. Estadificación preoperatoria del Cáncer Colorrectal. *Cir Esp* 2003;73:17-19.

Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch H, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2010;375:1030-47.

Da Fonseca LM, da Luz MM, Lacerda-Filho A, Cabral MM, da Silva RG. Colorectal carcinoma in different age groups: a histopathological analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2012 Feb; 27 (2): 249-55.

Davis DM, Marcet JE, Frattini JC, et al. Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *J Am Coll Surg*. 2011:213:352.

de Jong AE, Morreau H, Van Puijenbroek M, Eilers PH, Wijnen J, Nagengast FM, et al. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology* 2004;126:42-48.

de Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y, Tops C, Wijnen J, Ausems MG, et al. Microsatellite instability immunohistochemistry and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 972-980.

de la Chapelle, A. Microsatellite instability. *N Engl J Med*. 2003;349: 209-210.

de Vos tot Nederveen Cappel WH, Buskens E, Van Duijvendijk P, et al. Decision analysis in the surgical treatment of colorectal cancer due to mismatch repair gene defect. *Gut*. 2003;52:1752-1755.

Desch CE, Benson AB 3rd, Somerfield MR, Flynn PJ, Krause C, Loprinzi CL, et al. Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol*. 2005 Nov 20; 23(33):8512-9.

Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastasis colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10; 26(35):5705-12.

Dunlop, MG. Guidance on gastrointestinal surveillance for hereditary non-polyposis colorectal cancer, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis, and Peutz-Jeghers syndrome. *Gut*. 2002 Oct; 51 Suppl 5: V21-27.

Dunn KB, Trudel JL. Colorectal Cancer: Adjuvant Therapy. *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery*. 2011; 773-782

Durno C, Aronson M, Bapat B, et al. Family history and molecular features of children, adolescent and Young adults with colorectal carcinoma. *Gut* 2005;54: 1146-50.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC et al. Colon and Rectum. eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7 th ed. New York, NY: Springer. 2010, 143-64.

Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, Alley L, Friedman C, Edwards B et al. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer*. 2006 Sep 1;107(5 Suppl):1153-61.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1; 61(5):759-67. Review

Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol*. 2011; 22:1958.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127 (12): 2893-917.

Ferlay., Boley P and. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* 2005; 16:481-488.

Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, et al. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut.* 2001 Apr;48 (4):515-521.

Fukushima T, Takenoshita S. Colorectal carcinogenesis. *Fukushima J Med Sci.* 2001 Jun;1: 1-11. Review.

Galler AS, Petrelli NJ, Shakamuri SP. Rectal cancer surgery: a brief history. *Surg Oncol.* 2011 Dec; 20(4): 223-30.

Ghazi S, Lindfors U, Lindberg G, Berg E, Lindblom A, Papadogiannakis N, y Low-Risk Colorectal Cancer Study Group. Analysis of colorectal cancer morphology in relation to sex, age, location, and family history. *J Gastroenterol.* 2012 Jun; 47(6): 619-34.

Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2000 Jan;18(1): 136-47.

Giacomini CP, Leung SY, Chen X, Yuen ST, Kim YH, Bair E, Pollack JR. A gene expression signature of genetic instability in colon cancer. *Cancer Res.* 2005 Oct15; 65(20): 9200-5.

Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology.* 2001 Jul; 121(1): 198-213.

Giovannucci E, Wu K (2006) Cancers of the colon and rectum. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr (eds) *Cancer epidemiology and prevention*, 3rd edn. Oxford University Press, New York.

Giráldez MD, López-Dóriga A, Bujanda L, Abulí A, Bessa X, Fernández-Rozadilla C, et al. Susceptibility genetic variants associated with early-onset colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2012 Mar; 33 (3): 613-9.

Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.* 2003;63: 1608-14.

Goel A, Nagasaka T, Spiegel J, Meyer R, Lichliter WE, Boland CR. Low frequency of Lynch syndrome among young patients with non-familial colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010 Nov;8(11): 966-71.

Gonzalez EC, Roetzheim RG, Ferrante JM, Campbell R. Predictors of proximal vs. distal colorectal cancers. *Dis Colon Rectum*. 2001 Feb; 44 (2): 251-8.

Goodenberger M, Lindor NM. Lynch syndrome and MYH-associated polyposis: review and testing strategy. *J Clin Gastroenterol*. 2011 Jul; 45 (6): 488-500.

Grady, WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004 Jan-Jun; 23(1-2): 11-27.

Grady, WM. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology*. 2003 May;124 (6):1.574-1.594.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.

Guillem JG, Puig- La Calle J, Cellini C, Murray M, Ng J, et al. Varying features of early age of onset “sporadic” and Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer patients. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 36-42.

Guldberg P, Guttler F. A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 2261-2262.

Haanstra JF, de Vos Tot Nederveen Cappel WH, et al. Quality of life after surgery for colon cancer in patients with Lynch syndrome: partial versus subtotal colectomy. *Dis Colon Rectum*. 2012 Jun; 55(6): 653-9.

Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE, Wruble LD. Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. *Gastroenterology*. 1985;89: 328–336.

Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352:1851-1860.

Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35): 5783-8.

- Harris GJ, Church JM, Senagore AJ, Lavery IC, Hull TL, Strong SA, et al. Factors affecting local recurrence of colonic adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2002;1029-34.
- Hawkins NJ, Tomlinson I, Meagher A, Ward RL. Microsatellite-stable diploid carcinoma: a biologically distinct and aggressive subset of sporadic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2001 Jan;84(2): 232-6.
- Heitman SJ, Ronksley PE, Hilsden RJ, et al. Prevalence of adenomas and colorectal cancer in average risk individuals: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009; 7: 1272.
- Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, et al. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol* 2003;162: 469-477.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6870-6875.
- Hotta T, Yamaue ,H. Laparoscopic surgery for Rectal Cancer. Review of published literature 2000- 2009. *Surg Today*. 2011;41: 1583–1591.
- Iacopetta. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer*. 2002 Oct 10;101(5): 403-8.
- Issa, JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec; 4(12): 988-93.
- Jasperson KW, Thuy M. Vu, Angela L. Schwab, Deborah W Neklason, Miguel A. Rodriguez-Bigas, et al. Evaluating Lynch syndrome in very early onset colorectal cancer probanda without apparent polyposis. *Familial cancer* 2010; 9: 99-107.
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Herediatry and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun; 138(6): 2044-2058.
- Jass, JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50: 113-130.
- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011: 61:69.

Johnson V, Lipton LR, Cummings C, Eftekhari Sadat AT, Izatt L, Hodgson SV, et al. Analysis of somatic molecular changes, clinicopathological features family history and germline mutations in colorectal cancer families evidence for efficient diagnosis of HNPCC and for the existence of distinct group of non HNPCC families. *J Med Genet* 2005; 42: 756-762.

Kakar S, Deng G, Sahai V, et al. Clinicopathologic characteristics, CpG island methylator phenotype, and BRAF mutations in microsatellite- stable colorectal cancers without chromosomal instability. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(6): 958-64.

Kambara T, Matsubara N, Nakagawa H, et al. High frequency of low-level microsatellite instability in early colorectal cancer. *Cancer Res*. 2001; 61: 7743-7746.

Kastrinos F, Steyerberg EW, Balmaña J, Mercado R, Gallinger S, Haile R, et al. Comparison of the clinical prediction model PREMM1,2,6 and molecular testing for the systematic identification of Lynch syndrome in colorectal cancer. *Gut*. 2013 Feb; 62 (2): 27.

Klarskov L, Holck S, Bernstein I, Nilbert M. Hereditary colorectal cancer diagnostics: morphological features of familial colorectal cancer type X versus Lynch syndrome. *J Clin Pathol*. 2012 April; 65(4): 352-6.

Konopke R, Roth J, Volk A, Pistorius S, Folprecht G, Zöphel K, Schuetze C, et al. Colorectal liver metastases: an update on palliative treatment options. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2012 Mar; 21(1): 83-91.

Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A, Peltomäki P. Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol*. 2000 May; 156(5):1773-9.

Kuppermann M, Wang G, Wong S, Blanco A, Conrad P, Nakagawa S, et al. Preferences for outcomes associated with decisions to undergo or forego genetic testing for Lynch syndrome. *Cancer*. 2013 Jan 1;119 (1):215-25.

Lacy AM, Delgado S, Castells A, Prins HA, Arroyo V, Ibarzabal A, et al. The long-term results of a randomized clinical trial of laparoscopy-assisted versus open surgery for colon cancer. *Ann Surg*. 2008 Jul; 248(1):1-7.

Laurent S, Franchimont D, Coppens JP, et al. Familial adenomatous polyposis: clinical presentation, detection and surveillance. *Acta Gastroenterol Belg*. 2011 Sep;74(3):415-20.

- Lanza G, Gafa R, Maestri I, Santini A, Matteuzzi M, Cavazzini L. Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Mod Pathol* 2002; 15: 741-749.
- Lee JE, Chan AT. Fruit, vegetables, and folate: cultivating the evidence for cancer prevention. *Gastroenterology*. 2011;141:16.
- Leroy J, Arenas M, Marescaux J. Total mesorectal excision by laparoscopy for rectal cancer. *Rev Gastroenterol Mex*. 2004 Aug; 69 Suppl 1:73-83.
- Leroy J, Jamali F, Forbes L, Smith M, Rubino F, Mutter D, et al. Laparoscopic total mesorectal excision (TME) for rectal cancer surgery: long-term outcomes. *Surg Endosc*. 2004 Feb;18(2):281-9.
- Li FY, Lai MD. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009 Mar; 10 (3) 219-29.
- Liang JT, Huang KC, Cheng AL, et al. Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *Br J Surg*. 2003;90:205-14.
- Limburg PJ, Harmsen WS, Chen HH, Gallinger S, Haile RW, Baron JA, et al. Prevalence of alterations in DNA mismatch repair genes in patients with young-onset colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jun; 9 (6): 497-502.
- Lin JT, Wang WS, Yen CC, Liu JH, Yang MH, Chao TC et al. Outcome of colorectal carcinoma in patients under 40 years of age. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20: 900-905.
- Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1043-1048.
- Lindor, N.M., Rabe, K., Petersen, G.M, et al. Lower cancer incident in Amsterdam- I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *Jama*. 2005;293:1979-1985.
- Lledó, S. *Guía clínica de Cirugía Colorrectal*. Arán Ediciones S.A., 2000.
- López-Abente G, Ardanaz E, Torrella-Ramos A, et al. Changes in colorectal cancer incidente and mortality trends in Spain. *Annals of Oncology*. 2010; 21 Supl 3.

Losi L, Di Gregorio C, Pedroni M, Ponti G, Roncucci L, Scarselli A, et al. Molecular genetic alterations and clinical features in early-onset colorectal carcinomas and their role for the recognition of hereditary cancer syndromes. *Am J Gastroenterol*. 2005 Oct;100(10): 2280-7.

Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ, Marcus J, Smyrk T, Fitzgibbons RJ, et al. Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum* 1988; 31: 439-444.

Macedo LT, da Costa Lima AB, Sasse AD. Addition of bevacizumab to first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis, with emphasis on chemotherapy subgroups. *BMC Cancer*. 2012 Mar;13:12:89.

Mahdavinia M, Bishehsari F, Ansari R, et al. Family history of colorectal cancer in Iran. *BMC Cancer*. 2005; 5: 112.

Makec M, Jr, Mercier B, Mackova A, Miller PW, Hamosh A, Ferec C, et al. Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the CFTR gene. *Hum Mutat* 1997; 9: 136-147.

Maul JS, Warner NR, Kuwada SK, Burt RW, Cannon-Allbright LA. Extracolonic cancers associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the Utah Population Database. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1591-6.

McCashland TM, Brand R, Lyden E, de Garmo P, y CORI Research Project. Gender differences in colorectal polyps and tumors. *Am J Gastroenterol*. 2001 Mar; 96(3): 882-6.

Melisa M, Ahmedin Jemal, Robert A. Smith, Elizabeth Ward. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009;59:366-378.

Menéndez P, Villarejo P, Padilla D, Menéndez JM, Rodríguez Montes JA. Epigenetics and colorectal cancer. *Cir Esp*. 2012 May; 90(5): 277-83.

Meredith KL, Hoffe SE, Shibata D. The Multidisciplinary management of rectal cancer. *Surg Clin North Am*. 2009 Feb;89(1) : 177-215.

Mino P, Baker K, Goswami R, et al. Extensive DNA methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis. *Gut*. 2006: 55:1467.

Mitry E, Benhamiche AM, Jouve J-L, Clinard F, Finn-Faivre C, Faivre J. Colorectal adenocarcinoma in patients under 45 years of age: comparison with older patients in a well-defined French population. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 380-387.

Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol.* 2010 Mar 15;2(3):151-8.

Muller A, Giuffre G, Edmonston TB, Mathiak M, Roggendorf B, Heinmoller E, et al. Challenges and Pitfalls in HNPCC Screening by Microsatellite Analysis and Immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2004; 6 : 308-31.

Muller W, Burgart LJ, Krause-Paulus R, Thibodeau SN, Almeida M, Edmonston TB, et al. The reliability of immunohistochemistry as a prescreening method for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)-results of an international collaborative study. *Fam Cancer* 200; 1: 87-92.

Muzny DM, Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012 Jul 18; 487(7407) : 330-7.

Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, Cullings HM, Takeda M, Kimura K, et al. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol.* 2004 Nov 15; 22(22): 4584-94.

Navarro M, Piulats JM. Seguimiento del cáncer colorrectal. *Cir Esp* 2003;73: 58-62.

Nawa T, Kato J, Kawamoto H, Okada H, Yamamoto H, Kohno H, Endo H, Shiratori Y. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Mar; 23( 3): 418-23.

Niessen RC, Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Hollema H, Ligtenberg MJ, et al. Identification of mismatch repair gene mutations in young patients with colorectal cancer and in patients with multiple tumours associated with hereditary non-polyposis colorectal. *Gut.* 2006 Dec; 55(12): 1781-8.

Nieuwenhuis MH, Mathus-Vliegen LM, Slors FJ, Griffioen G, Nagengast FM, Schouten WR, et al. Genotype-phenotype correlations as a guide in the management of familial adenomatous polyposis. *Clinical gastroenterology and hepatology.* 2007 Mar; (5)3: 374-8.

NIH consensus, conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990;264:1440-1450.

Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation

and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(14): e128.

O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, et al. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 1990;98:371.

O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96:1420.

Ogino S and Goel, A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2008;10:13-27.

Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Weisenberger DJ, et al. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut* 2006; 55(7): 1000-1006.

Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M, Fuchs CS. Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn* 2007;9: 305–14.

Oleg K. Glebov, Luz M. Rodriguez, Kenneth Nakahara, et al. Distinguishing Right from Left Colon by the Pattern of Gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 755-762.

Oliveira F, Napoli CC, Rossi BM, Toshiiko W, Aguilar S Jr, Monteiro EM, et al. Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) in Brazilian families: An analysis by Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. *Fam Cancer* 2004; 3: 41-47.

Parromore JB, Wei JP, Yeh KA. Colorectal cancer in patients under forty: presentation and outcome. *Am Surg* 1998; 64: 563-567.

Patel SS, Floyd A, Doorly MG, Ortega AE, Ault GT, Kaiser AM, et al. Current controversias in the management of colon cancer. *Curr Probl Surg* 2012 Jul;49(7):398-460.

Peltomaki, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1174-79.

Perea J, Alvaro E, Rodríguez Y, Grávalos C, Sánchez- Tomé E, Rivera B et al. Approach to early- onset colorectal cancer: clinicopathological, familial, molecular and immunohistochemical characteristics. *World Gastroenterol* 2010 August 7;16(29): 3697-3703.

Perea J, Justo I, Alvaro E, et al. Surgical management of hereditary colorectal cancer: surgery based on molecular analysis and family history. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009 Aug;101(8): 536-40.

Perea J, Rodríguez Y, Rueda D, Marín JC, Díaz-Tasende J, Álvaro E, et al. Early-onset colorectal cancer is an easy and effective tool to identify retrospectively Lynch syndrome. *Ann Surg Oncol.* 2011 Nov;18(12):3285-91.

Pérez-Carbonell L, Ruiz-Ponte C, Guarinos C, Alenda C, Payá A, Brea A, et al. Comparison between universal molecular screening for Lynch syndrome and revised Bethesda guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer. *Gut.* 2012 Jun; 61(6): 865-72.

Pharoah P, Caldas C. Molecular genetics and the assessment of human cancers. *Expert reviews in molecular medicine.* 1999 March;11:1-19.

Pino MS, Chung DC, et al. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138:2059-72.

Pinol V, Andreu M, Castells A, Paya A, Bessa X, Rodrigo J. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicentre, prospective, nationwide study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16: 39-4.

Piso P, Dahlke MH, Mirena P, Schmidt U, Aselmann H, Schlitt HJ, et al. Total mesorectal excision for middle and lower rectal cancer: a single institution experience with 337 consecutive patients. *J Surg Oncol.* 2004 Jun 1; 86(3):115-21.

Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 20; 23 (3): 609-18.

Pucciarelli S, Agostini M, Viel A, Bertorelle R, Russo V, Toppan P, et al. Early-age-at-onset colorectal cancer and microsatellite instability as markers of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2003 Mar; 46 (3): 305-12.

Qi Y, Stoddard D, Monson J R.T. Indications and Techniques of Transanal Endoscopic Microsurgery (TEMS). *J Gastrointest Surg.* 2011;15:1306-1308.

- Raut CP, Pawlik TM, Rodríguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res.* 2004 Dec; 21(568)(2):275-282.
- Renehan AG, Tyson M, Egger M, et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008; 371:569.
- Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, et al. Serrated lesions of the colorectum: Review and recommendations from an expert panel. *The American journal of gastroenterology.* 2012 Sep; 107(9):1315-29.
- Roig JV, Solama A, Alós R. Tratamiento quirúrgico y resultados del cáncer de colon. *Cir Esp.* 2003;73: 20-24.
- Rosato V, Bosetti C, Levi F, Polesel J, Zucchetto A, Negri E, La Vecchia C. Risk factors for young-onset colorectal cancer. *Cancer Causes Control.* 2013 Feb; 24(2): 335-41.
- Sacchi M, Picozzi P, Di Legge P, Capuano L, Greco L, De Stefano M, et al. Virtual ileostomy following rectal cancer surgery: a good tool to avoid unusefull stomas? *Hepatogastroenterology.* 2011 Sep-Oct; 58(110-111): 1479-81.
- Salahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A. Microsatellite Instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* 2001; 81: 535-541.
- Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med.* 2000 Sep 28; 343(13): 905-14.
- Samowitz W, Albertsen H, Herrick J, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype (CIMP) in colon cancer. *Gastroenterology.* 2005;121:837-45.
- Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M, et al. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology.* 2001 Oct;121(4): 830-8.
- Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, et al. . Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981–2012. *Annals of Oncology.* 2010: 21 Supl 3.

Savas N, Dagli U, Akbulut S, et al. Colorectal cancer localization in young patients: should we expand the screening program? *Dig Dis Sci.* 2007; 52: 798-802.

Scheer A, Auer RA. Surveillance after curative resection of colorectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009 Nov; 22(4):242-50.

Siegel RL, Jermal A and Ward EM. Increase in incidence of colorectal cancer among young men and women in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(6):1695-8.

Silver A, Sengupta N, Propper D, Wilson P, Hagemann T, Patel A, et al. A distinct DNA methylation profile associated with microsatellite and chromosomal stable sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer.* 2012; 130:1082-1092.

Snaebjornsson P, Jonasson L, Jonsson T, Möller PH, Theodors A, Jonasson JG. Colon cancer in Iceland--a nationwide comparative study on various pathology parameters with respect to right and left tumor location and patients age. *Int J Cancer.* 2010 Dec; 127(11): 2645-53.

Snover, DC. Update on serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2011 Jan; 42(1): 1-10.

Steinhagen E, Shia J, Markowitz AJ, Stadler ZK, Salo-Mullen EE, Zheng J, et al. Systematic immunohistochemistry screening for Lynch syndrome in early age-of-onset colorectal cancer patients undergoing surgical resection. *J Am Coll Surg.* 2012 Jan; 214(1): 61.

Stone JG, Robertson D, Houlston RS. Immunohistochemistry for MSH2 and MHL1: a method for identifying mismatch repair deficient colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2001; 54: 484-487.

Sutter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple-cancers. *Nat Genet* 2004; 36: 497-501.

Tang R, Changchien CR, Wu MC, Fan CW, Liu KW, Chen JS, et al. Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability- an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2004;25:81-6.

Targarona EM, Ortiz H. El final del principio: cirugía laparoscópica del cáncer de colon. *Cir Esp.* 2004;76 (4): 201-2.

Tejpar S, Odze RD. Accomplishments in 2008 in Biologic Markers for Gastrointestinal Cancers-Focus on Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2009 Sep-Oct; 3(5 Suppl 2): S73-S78.

Valle, L., Perea, J., Carbonell, P., et al. Clinicopathologic and Pedigree differences in Amsterdam I- Positive Hereditary Nompolyposis Colorectal Cancer Familias According to Tumor Microsatellite Instability Status. *J Clin Oncol.* 2007; 25:781-786.

Van Rinjsoever M, Grieu F, Eisaleh H et al. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut.* 2002;51: 797-802.

van Roon EH, van Puijbroek M, Middeldorp A, van Eijk R, de Meijer EJ, Erasmus D, et al. Early onset MSI-H colon cancer with MLH1 promoter methylation, is there a genetic predisposition? *BMC Cancer.* 2010 May 5;10: 180.

Vasen, HF et al. One to 2-year surveillance intervals reduce risk of colorectal cancer in families with Lynch syndrome. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(7):2300-6.

Vasen, HF. Review article: The Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Dec; 26 Suppl 2:113-26.

Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G, Loda M, Garber J, Syngal S, et al. Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* 2002; 62: 3485-349.

Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J Cancer* 2003;103: 636-641.

Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer *Nat Genet* 2006; 38(7): 787-93.

Wijnen J, Khan PM, Vasen H, Menko F, van der Klift H, van den Broek M, et al. Majority of hMLH1 mutations responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer cluster at the exonic region 15-16. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 300-307.

Wijnen J, Vasen H, Khan PM, Menko FH, van der Klift H, van Leeuwen C, et al. Seven new mutations in hMSH2, an HNPCC gene, identified by denaturing gradient gel electrophoresis. *Am Hum Genet* 1995; 56: 1060-1066.

Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK, Rennert H, Pirog EC, Banner BF, Chen YT. Clinical, pathologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2009 Apr; 33(4): 572-82.

Yeo SA, Chew MH, Koh PK, Tang CL. Young colorectal carcinoma patients do not have a poorer prognosis: a comparative review of 2,426 cases. *Tech Coloproctol*. 2013 Mar 5.

Yiu R, Qui H, Lee SH et al. Mechanisms of microsatellite instability in colorectal cancer patients in diferente age group. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 2061-2069.

You YN, Dozois EJ, Boardman LA, Aakre J, Huebner M, Larson DW. Young-onset rectal cancer: presentation, pattern of care and long-term oncologic outcomes compared to a matched older-onset cohort. *Ann Surg Oncol*. 2011 Sep; 18(9): 2469-76.



ANEXO

---



## ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO.

***HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE EXCEDENTES DE TEJIDO O SANGRE CON FINES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA****Finalidad y descripción del proceso*

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

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

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

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

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

#### Carácter altruista de la donación

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

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

#### Protección de datos y confidencialidad

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

ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

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

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

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

#### Información sobre resultados del estudio

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

Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser tanto clínica como genéticamente relevantes para Ud e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así Ud lo estima oportuno. Un facultativo del Hospital 12 de Octubre se compromete a ofrecerle consejo genético, una vez obtenidos y evaluados los resultados del estudio.

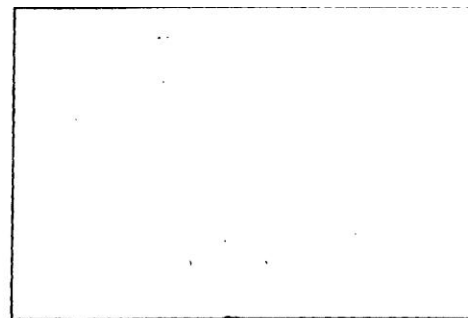
Asimismo, podría obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a Ud decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de esta hoja.

### La muestra

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

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

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



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

D.N.I. del paciente: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nombre del Médico que informa: \_\_\_\_\_

Nº Colegiado: \_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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

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

La información sobre los resultados es estrictamente confidencial y únicamente será facilitada a la persona estudiada y a quienes ella nos autorice por escrito. Estos datos quedarán bajo la custodia de la Unidad de Consejo Genético que le atiende, sin que consten en su historial clínico y no podrán ser cedidos a ninguna entidad o persona sin su autorización expresa. Los datos podrán ser utilizados con el fin de realizar estudios epidemiológicos, garantizando en todo momento el anonimato. Si, no obstante lo anteriormente expuesto, en algún momento usted decide que esta información sea destruida, podrá solicitarlo por escrito a la persona responsable de la Unidad que le ha estudiado.

Si su análisis genético es negativo, es decir, no se encuentra ningún tipo de mutación que suponga especial predisposición al cáncer, se le indicarán cuáles son las medidas de prevención a tomar y que dependerán de la existencia o no de casos de portadores de la mutación conocidos en su familia.

Si su análisis genético es positivo se le informará sobre el riesgo existente, así como de las alternativas de prevención disponibles en la actualidad.

En ocasiones se puede obtener un resultado que denominamos no informativo. Este tipo de resultados implica que no se conoce en la actualidad las repercusiones que ciertas alteraciones detectadas puede tener sobre el riesgo de padecer cáncer de colon.

*Continúa al dorso*

**04 554**

Cuando la existencia de la mutación en la familia ha sido confirmada, debe saber que otros miembros de su familia pueden haberla heredado: de usted (en caso de sus descendientes) o de sus antepasados (en caso de otros familiares como tíos o primos). La Unidad de Consejo Genético en ningún caso contactará con ellos por propia iniciativa para advertirles de esta circunstancia, ya que esta información es estrictamente confidencial. Es decisión personal suya informar a dichos familiares con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cuál es su riesgo individual con respecto a estos tumores.

De igual manera debe conocer que este tipo de pruebas pueden repercutir en su estado emocional y/o psicológico, tanto positiva como negativamente.

Si usted decide que no desea realizarse un estudio genético, sepa que su decisión será respetada en todo momento y recibirá el asesoramiento genético apropiado a su caso. De igual manera debe saber que existen modelos teóricos que permiten conocer de manera aproximada su riesgo de padecer determinados tipos de cáncer, los cuales podrían aplicársele si no desea realizarse este tipo de test.

Comentarios del médico que informa: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**AUTORIZACIÓN**

Yo, \_\_\_\_\_, he sido informado oralmente y por escrito sobre las características, beneficios y problemas que plantea el estudio genético en el cáncer.

He comprendido esta información y cualquier duda surgida me ha sido aclarada por el médico.

Por lo anterior **OTORGO MI CONSENTIMIENTO** para que se proceda al estudio de factores genéticos predisponentes al cáncer sobre una muestra de sangre que me será extraída a tal efecto y análisis de tejido tumoral si ello fuera necesario.

Firma \_\_\_\_\_ Firma tutor (caso de menor o incapacitado legalmente) \_\_\_\_\_ Firma Médico \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Autorizo para que las personas abajo indicadas puedan ser informadas sobre los resultados del estudio realizado.

Nombre \_\_\_\_\_ TF \_\_\_\_\_  
Nombre \_\_\_\_\_ TF \_\_\_\_\_  
Nombre \_\_\_\_\_ TF \_\_\_\_\_  
Nombre \_\_\_\_\_ TF \_\_\_\_\_

Fdo.: D. /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: \_\_\_\_\_

ANEXO 2. PUBLICACIONES:

**Early-onset colorectal cancer is an easy and effective tool to identify retrospectively Lynch syndrome.**

Perea J, Rodríguez Y, Rueda D, Marín JC, Díaz-Tasende J, Álvaro E, Alegre C, Osorio I, Colina F, Lomas M, Hidalgo M, Benítez J, Urioste M.

*Ann Surg Oncol.* 2011 Nov;18(12):3285-91.

**“Age of onset” should be a major criterion for subclassification of Colorectal Cancer.**

Perea J, Rueda D, Canal A, Rodriguez Y, Álvaro Edurne, Osorio I, Alegre C, Rivera B, Martinez J, Benítez J, Urioste M.

*The Journal of Molecular Diagnostics.* (en proceso de revisión)