

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD
GENÉTICA EN LA POLIPOSIS
ADENOMATOSA ATENUADA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Víctor Lorca Castellanos

Directora

Dra. Pilar Garre Rubio

Madrid, 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital
Clínico San Carlos**

**Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y
Biomedicina**



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD
GENÉTICA EN LA POLIPOSIS
ADENOMATOSA ATENUADA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Víctor Lorca Castellanos

Directora

Dra. Pilar Garre Rubio

Madrid, 2023

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar este apartado nombrando a la persona que me ha dado la oportunidad de crecer y formarme científica, profesional y personalmente en el campo de la oncología molecular. Gracias por brindarme tus conocimientos, tus sugerencias y tus críticas sin las cuales nada de esto habría sido posible. Muchas gracias, Pilar Garre. Es un placer trabajar juntos, formando parte de este gran equipo del Laboratorio de Oncología Molecular.

Me gustaría agradecer también a otras dos personas que considero pilares fundamentales en este laboratorio. A Miguel de la Hoya, por su inmensa sabiduría y su incondicional paciencia. Al segundo pilar, Vanesa García, por todos los conocimientos que me ha aportado junto a su buen rollo y su gran implicación siempre. Gracias a ambos todo ha sido mucho más fácil y simplemente puedo decirles que me encanta trabajar con vosotros.

Así mismo, me gustaría dar las gracias a Trinidad Caldés, por toda tu implicación y esfuerzo, y por esa postura de madre con la que tanto nos cuidas.

Al resto de predoctorales (incluyo en este grupo a lo/as CUATRO iniciales, aunque alguna ya no sea predoctoral). Gracias a todos por hacerme pasar las mañanas y las tardes mucho más amenas. A Raquel por sus bailes, sus cánticos, su apoyo y sus risas durante muchos años. Eres un personaje y una magnífica persona. A Lorena y Mateo, por enseñarme no solo a nivel profesional, sino también en cada una de esas tardes en Zacatrus, siendo capaces de explicarnos juegos interminables en menos de 5 minutos. A todos los que formamos ese cuartito o despacho (no se muy bien como llamarlo): Ada, Igor, Lobna, Beatriz, Elena y Ana. ¡Me siento muy bien acompañado ahí dentro! Al resto del laboratorio (aunque alguno/as ya no estén): Inma, Alicia, Marta, Paula, Julia, Nieves, Inés, Ericka, Patri, Mariló, Ana e incluso a gente del laboratorio vecino (Elena y Jose Luis) que me acogieron y me cuidaron desde que llegué a este hospital.

Del mismo modo, me gustaría dar las gracias al Servicio de Oncología Médica y a todos los que forman la Consulta de Consejo Genético, en especial, a Isa, Santi y Pedro Pérez Segura, así como al Servicio de Anatomía Patológica de este hospital, sobre todo a María Jesús y María Luisa por su gran dedicación en los distintos proyectos que tenemos en marcha.

También, quiero agradecer al laboratorio de Cáncer Hereditario del Hospital 12 de Octubre, en concreto, a Daniel Rueda por colaborar con nosotros durante todos estos años, y a Richarda de Voer, del Radboud University Medical Centre de Nijmegen.

A mi tutora, Pilar Iniesta, por todo su apoyo y disposición siempre. Gracias por todas las facilidades que me has dado durante todo este tiempo.

A Eva Blasco, la artista que ha dado color a esta tesis con sus laminas pintadas en acuarela. Gracias por todo tu trabajo y disponibilidad, y por aconsejarme cuando lo he necesitado.

Por último, quiero terminar este apartado dedicando unas palabras a todos aquellos que forman parte de mi día a día, ya que son los que más me han visto crecer y sufrir durante todo este tiempo. A Rafa, Lola, Vicky, Inma, Roberto, Paula, Silvia y Peco por darme tanto cariño.

Y por supuesto, a toda mi familia: en especial, a mis padres, Gregorio y Sole, a mi hermana Vanesa y a mi tía Marisa. Sin vosotros no habría llegado hasta aquí. Soy muy afortunado de teneros a todos. Gracias por ser un ejemplo a seguir. ¡OS QUIERO MUCHO!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
LISTADO DE TABLAS	17
LISTADO DE FIGURAS	19
LISTADO DE ANEXOS	22
RESUMEN/SUMMARY	23
INTRODUCCIÓN	29
1. Cáncer colorrectal.....	31
1.1. Función y estructura del colon y recto.....	32
1.2. Epidemiología.....	34
1.3. Etiología y factores de riesgo.....	36
1.3.1. Edad y sexo.....	36
1.3.2. Estilo de vida y dieta.....	36
1.3.3. Otros factores: enfermedades/síndromes digestivos.....	36
1.3.4. Factores genéticos.....	37
1.4. Carcinogénesis colorrectal.....	40
1.4.1. Vía de la inestabilidad cromosómica o supresora.....	41
1.4.2. Vía de la inestabilidad de microsatélites o mutadora.....	41
1.4.3. Vía del fenotipo metilador de islas CpG o Vía Serrada.....	42
1.5. Clasificación del CCR.....	43
1.5.1. Subtipos moleculares del CCR.....	43
1.5.2. Clasificación según la historia familiar.....	45
2. CCR hereditario.....	46
2.1. Clasificación del CCR hereditario.....	47
2.1.1. Cáncer colorrectal hereditario no polipósico.....	47
2.1.1.1. Síndrome de Lynch.....	48
2.1.1.2. Cáncer colorrectal familiar tipo X.....	49
2.1.1.3. Síndrome de Lynch-like.....	50
2.1.2. Cáncer colorrectal hereditario polipósico.....	50
3. Poliposis colorrectales.....	51
3.1. Poliposis adenomatosas.....	51
3.1.1. Poliposis adenomatosas clásicas.....	52
3.1.2. Poliposis adenomatosas atenuadas.....	53
3.2. Poliposis hamartomatosas.....	54
3.2.1. Síndrome tumorales hamartomatosos asociados a <i>PTEN</i>	54
3.2.2. Síndrome de Peutz-Jeghers.....	55
3.2.3. Síndrome de poliposis juvenil.....	55
3.3. Poliposis serradas.....	56
3.4. Poliposis mixtas.....	56
4. Genes de predisposición a la PA.....	57
4.1. <i>APC</i>	59

4.2. <i>MUTYH</i>	62
4.3. <i>POLE</i> y <i>POLD1</i>	64
4.4. <i>NTHL1</i>	65
4.5. <i>MSH3</i>	66
4.6. <i>MLH3</i>	67
4.7. <i>AXIN2</i>	68
4.8. <i>GALNT12</i>	69
4.9. PAA secundarias a otros síndromes de riesgo al cáncer.....	69
4.10. Poliposis adenomatosas no explicadas.....	70
4.10.1. Variantes en zonas promotoras y desequilibrio alélico.....	70
4.10.2. Variantes intrónicas.....	70
4.10.3. Variantes en regiones UTR.....	71
4.10.4. Mosaicismo genético.....	71
5. Actualidad en el cribado asistencial de la PA.....	73
5.1. Importancia del estudio genético.....	73
5.2. Recomendaciones clínicas de estudio genético en las PA.....	73
5.3. Diagnóstico molecular de las PA en el Hospital Clínico San Carlos.....	74
6. Secuenciación masiva y su aplicación para la búsqueda de variantes genéticas.....	76
6.1. Secuenciación de exoma y genoma completo	76
6.2. Paneles multigénicos.....	77
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	78
METODOLOGÍA.....	82
1. Poblaciones y criterios de selección.....	84
1.1. Población PAA-HCSC.....	84
1.2. Cohorte PAAX.....	84
1.2.1. Criterios de inclusión.....	84
1.2.2. Criterios de exclusión.....	84
1.3. Cohortes de validación.....	84
2. Obtención de muestras.....	85
2.1. Extracción de ADN.....	85
2.1.1. ADN de sangre periférica.....	85
2.1.2. ADN de tejido tumoral/adenomatoso.....	85
2.2. Extracción de ARN.....	86
2.2.1. ARN de sangre periférica.....	86
2.2.2. ARN de tejido tumoral/adenomatoso.....	86
2.3. Síntesis de ADNc.....	87
3. Cribado germinal en genes de predisposición a la PAA.....	87
3.1. Secuenciación masiva.....	87
3.1.1. Preparación de librerías y lanzamiento de la carrera de NGS.....	87
3.1.2. Análisis de datos de secuenciación.....	90
3.1.3. Filtrado y priorización de las variantes obtenidas.....	90

3.2. Validación de variantes y análisis de segregación familiar por secuenciación directa.....	92
3.2.1. Validación de variantes en <i>PMS2</i>	93
3.2.2. Validación de variantes bialélicas en <i>MUTYH</i>	94
3.3. <i>High resolution melting</i> (HRM).....	95
3.4. <i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i> (MLPA).....	96
3.5. Pérdida de heterocigosidad.....	96
3.6. Estudios de expresión alelo específica a nivel de ARN.....	97
3.7. Estudio somático externo en el paciente PAAX-83.....	98
3.8. Estudios de <i>splicing</i>	99
3.9. Estudios caso-control.....	100
3.10. Estudios de inmunohistoquímica.....	101
3.11. Clasificación de variantes.....	101
4. Caracterización molecular de adenomas/CCR.....	102
4.1. Análisis de expresión de las proteínas implicadas en la vía MMR...102	
4.2. Inestabilidad de microsatélites.....	102
4.3. Genotipado de V600E en <i>BRAF</i>	103
4.4. Análisis de la metilación del promotor de <i>MLH1</i>	103
4.5. Cribado de mutaciones somáticas.....	104
5. Búsqueda de mosaicos en el gen <i>APC</i>	107
5.1. Cohorte de estudio.....	107
5.2. Panel <i>APC</i>	107
5.3. Validación de mosaicos.....	108
RESULTADOS	111
1. Estudio descriptivo del diagnóstico molecular de las PAA en el HCSC.....	113
2. Características clínicas de la cohorte de estudio PAAX.....	114
3. Cribado germinal de genes de predisposición a la PAA.....	115
3.1. Características generales de la secuenciación.....	115
3.2. Variantes detectadas.....	115
3.3. Casos explicados.....	121
3.3.1. Variantes en <i>APC</i>	121
3.3.2. Variantes en <i>MUTYH</i>	123
3.3.3. Variante en <i>PTEN</i>	127
3.4. Variantes co-ocurrentes en <i>POLE</i> y <i>NTHL1</i>	129
3.5. Variante en <i>GALNT12</i>	132
3.6. Otras variantes reclasificadas como benignas o probablemente benignas.....	136
4. Caracterización molecular de adenomas.....	137
4.1. Clasificación molecular de adenomas.....	137
4.2. Cribado de mutaciones <i>hotspots</i>	138
4.2.1. Variantes detectadas.....	139
4.2.2. Caracterización de variantes germinales.....	142
5. Resultados del análisis de mosaicos en <i>APC</i>	144
5.1. Variante c.4127_4128delAT.....	145

5.2. Variante c.646-2A>T.....	148
5.3. Variante c.4156A>T.....	150
5.4. Variante c.4348C>T.....	152
DISCUSIÓN.....	155
1. Justificación e interés del estudio de familias PAAX.....	157
2. Cribado germinal de genes de predisposición a PAA/CCR.....	159
2.1. Variantes en genes de predisposición primaria a la PAA.....	159
2.2. Variantes en genes de predisposición secundaria a la PAA.....	161
2.3. Otros mecanismos de susceptibilidad propuestos.....	162
2.4. Papel de <i>GALNT12</i> en la predisposición a la PAA.....	165
3. Caracterización molecular de adenomas.....	168
4. Cribado de mosaicos en el gen <i>APC</i> de pacientes PAAX.....	170
5. Criterios clínicos propuestos y algoritmo diagnóstico.....	173
CONCLUSIONES.....	177
BIBLIOGRAFÍA.....	181
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	214
ANEXOS.....	218

ABREVIATURAS

A	Adenina
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ACG	<i>American College of Gastroenterology</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AFAP	Poliposis adenomatosa familiar atenuada
AKT1	Gen <i>serine/threonine kinase 1</i> (MIM164730)
ALK	Gen <i>anaplastic lymphoma kinase</i> (MIM105590)
APC	Gen <i>adenomatous polyposis coli</i> (MIM611731)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
AXIN2	Gen axina 2 (MIM604025)
BER	Reparación por escisión de bases
BMP4	Gen <i>bone morphogenetic protein 4</i> (MIM112262)
BMPRIA	Gen <i>bone morphogenetic protein receptor, type IA</i> (MIM601299)
BRAF	Gen <i>B-Raf proto-oncogene</i> (MIM164757)
C	Citosina
PAC	Poliposis adenomatosa clásica
CCG	Consulta de Consejo Genético
CCR	Cáncer Colorrectal
CDH1	Gen <i>cadherin 1</i> (MIM192090)
CGP	Células germinales primordiales
CIMP	Fenotipo metilador de islas CpG
CIN	Inestabilidad cromosómica
CNV	Variación en el número de copias (del inglés, <i>Copy number variant</i>)
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CpG	Dinucleótido citosina-guanina
CTNNB1	Gen <i>catenin beta 1</i> (MIM116806)
CUGC	<i>Clinical Utility Gene Card</i>

DHPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
EGFR	Gen <i>epidermal growth factor receptor</i> (MIM131550)
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EMAST	Inestabilidad de microsatélites de cuatro repeticiones
ENG	Gen endogлина (MIM131195)
ERBB2	Gen <i>erb-b2 receptor tyrosinekinase 2</i> (MIM164870)
ESMO	Sociedad Europea de Oncología Médica
EVS	<i>Exome Variant Server</i>
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
FA	Fracción alélica
FAP	Poliposis adenomatosa familiar
FBXW7	Gen <i>F-box and WD repeat domain containing 7</i> (606278)
FCCT-X	CCR familiar tipo X
FGFR2	Gen <i>fibroblast growth factor receptor 2</i> (MIM176943)
FOXL2	Gen <i>forkhead box L2</i> (MIM605597)
G	Guanina
GALNT12	Gen <i>polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 12</i> (MIM610290)
GIST	Tumores del estroma gastrointestinal
GNAQ	Gen <i>G protein subunit alpha q</i> (MIM600998)
GNAS	Gen <i>guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating complex locus</i> (MIM139320)
GnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
GREM1	Gen <i>gremlin 1</i> (MIM603054)
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo
HA	Análisis de heterodúplex
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
HNPCC	Cancer colorrectal hereditario no polipósico
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
HSF	<i>Human Splicing Finder</i>
IA	Desequilibrio alélico
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
KIT	Gen <i>KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i> (MIM164920)

KRAS	Gen <i>v-Ki-ras2 oncogene homolog</i> (MIM190070)
LOH	Pérdida de heterocigosidad (del inglés, <i>loss of heterozygosity</i>)
LOVD	<i>Leiden Open Variant Database</i>
LR-PCR	PCR de largo alcance (del inglés, <i>Long range-PCR</i>)
MAF	Frecuencia del alelo minoritario (del inglés, <i>Minor allele frequency</i>)
MAP	Poliposis asociada a <i>MUTYH</i>
MAP2K1	Gen <i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i> (MIM176872)
MCR	<i>Mutation cluster region</i>
MET	Gen <i>Methoprene-tolerant proto-oncogene</i> (MIM164860)
MGB	Aglutinante de surco menor
MGMT	Gen <i>O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase</i> (MIM156569)
MLH1	Gen <i>mutLhomolog 1</i> (E.coli) (MIM120436)
MLH3	Gen <i>mutLhomolog 3</i> (E.coli) (MIM604395)
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSH2	Gen <i>mutS homolog 2</i> (E.coli) (MIM609309)
MSH3	Gen <i>mutS homolog 3</i> (E.coli) (MIM 600887)
MSH4	Gen <i>mutS homolog 4</i> (E.coli) (MIM602105)
MSH6	Gen <i>mutS homolog 6</i> (E.coli) (MIM600678)
MSI	Inestabilidad de microsatélites
MS-MLPA	<i>Methylation-specific-Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MUTYH	Gen <i>mutY homolog</i> (E.coli) (MIM604933)
NAP	Poliposis asociada a <i>NTHL1</i>
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NET	Tumores neuroendocrinos
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NRAS	Gen <i>NRAS proto-oncogene</i> (MIM164790)
NTHL1	Gen <i>nth like DNA glycosylase 1</i> (MIM602656)
PA	Poliposis adenomatosa
PAA	Poliposis adenomatosa atenuada
PAAX	Poliposis Adenomatosa Atenuada no explicada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCRd	PCR digital

<i>PDGFRA</i>	Gen <i>platelet derived growth factor receptor alpha</i> (MIM173490)
PHTS	Síndromes tumorales hamartomatosos asociados a <i>PTEN</i>
<i>PIK3CA</i>	Gen <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i> (MIM171834)
<i>PMS2</i>	Gen <i>postmeiotic segregation increased 2</i> (MIM600259)
<i>POLD1</i>	Gen <i>DNA polymerase delta 1</i> (MIM174761)
<i>POLE</i>	Gen <i>DNA polymerase epsilon</i> (MIM174762)
Polyphen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
PPAP	Poliposis asociada a la región exonucleasa de las polimerasas
<i>PTEN</i>	Gen <i>phosphatase and tensin homolog</i> (MIM601728)
PTT	Prueba de truncamiento de proteínas
Q	<i>Quencher</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>
<i>SCG5</i>	Gen <i>secretogranin V</i> (MIM173120)
SIFT	<i>Sorts Intolerant From Tolerant</i>
<i>SMAD4</i>	Gen <i>SMAD family member 4</i> (MIM600993)
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
smMIP	<i>single-molecule molecular inversion probes</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SNV	<i>Single nucleotide variant</i>
SRC	Gen <i>SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase</i> (MIM190090)
<i>STK11 (LKB1)</i>	Gen <i>serine/threonine kinase 11</i> (MIM602216)
T	Timina
<i>TP53</i>	Gen <i>tumor protein p53</i> (MIM191170)
U	Uracilo
UMD	Universal Mutation Database
UTR	Regiones no traducidas
VSD	Variante de significado desconocido
WES	Secuenciación de exoma completo
WGS	Secuenciación de genoma completo
5-OHdC	2'-deoxi-5-hidroxicitidina
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

LISTADO DE TABLAS

TABLAS DE INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Criterios histológicos para distinguir los grados de displasia de adenomas colorrectales.

Tabla 2. Variantes patogénicas recurrentes en el gen *MUTYH*.

TABLAS DE METODOLOGÍA

Tabla 3. Características generales del panel personalizado de NGS.

Tabla 4. Condiciones de las amplificaciones utilizadas en las distintas PCRs.

Tabla 5. Secuencia de nucleótidos de los 5 marcadores utilizados para determinar la inestabilidad de microsatélites.

Tabla 6. Genes, vías de señalización y procesos celulares del panel TruSight tumor 26.

TABLAS DE RESULTADOS

Tabla 7. Características clínico-patológicas de la población con más de 10 adenomas.

Tabla 8. Descripción de las características clínico-patológicas de la cohorte de estudio PAAX.

Tabla 9. Resultados obtenidos de la NGS después de aplicar la estrategia de filtrado.

Tabla 10. Variantes priorizadas en los genes de predisposición primaria a la PAA.

Tabla 11. Variantes priorizadas en los genes de predisposición secundaria a la PAA.

Tabla 12. Características clínicas de los portadores de la variante *GALNT12:c.907G>A*, p. (Asp303Asn).

Tabla 13. Estudio de casos y controles para la variante *GALNT12:c.907GA*, p.(D303N).

Tabla 14. Características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes en la que se llevó a cabo el estudio molecular en adenomas.

Tabla 15. Características clínico-patológicas de la cohorte de 58 pacientes en la que se llevó a cabo el TruSight Tumor 26.

Tabla 16. Porcentaje de muestras y pacientes portadores en los distintos genes incluidos en el TST26.

Tabla 17. Cambios G>T detectados en los tejidos de pacientes portadores de variantes en *MUTYH*.

Tabla 18. Cambios C>T detectados en los tejidos de portadores de variantes monoalélicas en *NTHL1*.

Tabla 19. Características de las muestras de tejido analizadas para el estudio de mosaicos en *APC*.

Tabla 20. Variantes comunes identificadas en al menos dos tejidos adenomatosos de un mismo paciente.

TABLAS DE DISCUSIÓN

Tabla 21. Características y resultados de los estudios descritos en la literatura sobre mosaicos en *APC* basados en NGS y/o PCRd.

Tabla 22. Características clínicas generales de los pacientes resueltos en este trabajo.

LISTADO DE FIGURAS

FIGURAS DE INTRODUCCIÓN

- Figura 1.** “*Hallmarks*” o características distintivas del cáncer.
- Figura 2.** Estructura del colon y recto.
- Figura 3.** Porcentaje de nuevos casos de tumores (agrupados según localización) en 2020 a nivel mundial.
- Figura 4.** Incidencia y mortalidad de cáncer en España en el año 2020.
- Figura 5.** Arquitectura genética de loci conocidos de susceptibilidad al CCR.
- Figura 6.** Clasificación molecular del CCR basado en el estado de CIMP, CIN y MSI.
- Figura 7.** Hipótesis de Knudson.
- Figura 8.** Clasificación del CCR según la historia familiar.
- Figura 9.** Poliposis adenomatosas atenuadas agrupadas en función de su patrón de herencia.
- Figura 10.** Interactoma de los genes asociados con el desarrollo de adenomas.
- Figura 11.** Diagrama que ilustra las relaciones entre los genes, vías de señalización implicadas y síndromes hereditarios de CCR.
- Figura 12.** Esquema de la vía de señalización Wnt.
- Figura 13.** Correlaciones genotipo-fenotipo y manifestaciones extracolónicas en pacientes FAP y AFAP.
- Figura 14.** Esquema de la vía BER.
- Figura 15.** Papel de *NTHL1* en la vía BER.
- Figura 16.** Representación esquemática de la vía de reparación MMR en células humanas.
- Figura 17.** Algoritmo empleado en el diagnóstico molecular de las poliposis adenomatosas en el Hospital Clínico San Carlos hasta el año 2020.

FIGURAS DE METODOLOGÍA

- Figura 18.** Esquema del sistema de enriquecimiento *Haloplex* (*Agilent Technologies*).
- Figura 19.** Química de la secuenciación NGS de Illumina.

- Figura 20.** Esquema del proceso de filtrado y priorización de variantes.
- Figura 21.** Programa general empleado en la secuenciación directa de ADN.
- Figura 22.** Programa general empleado para la reacción de secuenciación.
- Figura 23.** Esquema de las amplificaciones alelo-específicas diseñadas para estudiar si los pacientes en los que se detectaron dos variantes en *MUTYH* eran portadores bialélicos.
- Figura 24.** Diferencias en las curvas de fusión obtenidas mediante HRM.
- Figura 25.** Fundamento de la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples.
- Figura 26.** Amplificación empleada para confirmar la posible contaminación por ADN genómico en las muestras de ADNc.
- Figura 27.** Esquema del amplicón diseñado para los distintos estudios de *splicing*.
- Figura 28.** Fundamento de los ensayos TaqMan.
- Figura 29.** Esquema de la técnica MS-MLPA.
- Figura 30.** Esquema del proceso de elaboración de librerías de NGS en el panel TruSight Tumor 26.
- Figura 31.** Fundamento de la PCR digital.
- Figura 32.** Ejemplos de resultados de genotipado de muestras de tejido adenomatoso obtenidos por PCRd.

FIGURAS DE RESULTADOS

- Figura 33.** Resultados del cribado asistencial de las PAA agrupadas según N de adenomas.
- Figura 34.** Representación gráfica del número de lecturas medio para cada muestra en las regiones diana analizadas.
- Figura 35.** Porcentaje de variantes agrupadas según su biotipo.
- Figura 36.** Árboles genéticos de los pacientes portadores de variantes patogénicas en el gen *APC*.
- Figura 37.** Caracterización de la variante *MUTYH* c.739C>G p.(Arg247Gly) detectada en el paciente PAAX-35.
- Figura 38.** Caracterización de la variante *MUTYH*: c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p. (Thr504Profs*68) detectada en el paciente PAAX-89.
- Figura 39.** Árbol genético del paciente portador de la variante patogénica en el gen *PTEN*.
- Figura 40.** Caracterización del doble heterocigoto en *POLE* y *NTHL1*.
- Figura 41.** Árboles genéticos de la variante *GALNT12*:c.907G>A p.(Asp303Asn).

Figura 42. Caracterización de la variante *GALNT12:c.907G>A p. (Asp303Asn)*.

Figura 43. Árbol genético del paciente PAAX-21.

Figura 44. Esquema de los distintos estudios moleculares en tejido adenomatoso de pacientes PAAX.

Figura 45. Muestras analizadas mediante TruSight Tumor 26.

Figura 46. Variantes detectadas tras el cribado de TST26.

Figura 47. Porcentaje de muestras con mutación en los distintos genes agrupados en función de la vía de señalización implicada.

Figura 48. Árbol genético de la familia del paciente PAAX-47.

Figura 49. Detección de la variante *c.4127_4128delAT p.(Tyr1376Cysfs*9)* en *APC*.

Figura 50. Detección de la variante *c.646-2A>T* en *APC*.

Figura 51. Detección de la variante *c.4156A>T p.(Arg1386*)* en *APC*.

Figura 52. Detección de la variante *c.4348C>T p.(Arg1450*)* en *APC*.

FIGURAS DE DISCUSIÓN

Figura 53. Algoritmo propuesto para el diagnóstico molecular en pacientes con sospecha de un síndrome de PAA hereditaria.

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Criterios clínicos de selección de familias HNPCC.

Anexo 2. Lista de genes de predisposición a la poliposis/CCR incluidos en el panel personalizado de NGS.

Anexo 3. Bases de datos y programas de predicción utilizados para la anotación de variantes.

Anexo 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación en los distintos experimentos.

Anexo 5. Criterios propuestos por la ACMG-AMP para la clasificación de variantes en el sistema de 5 niveles.

Anexo 6. Combinación de los criterios propuestos por la ACMG-AMP para la clasificación de variantes.

Anexo 7. Regiones cubiertas por el panel *TruSight® Tumor 26 (Illumina)*.

Anexo 8. Características clínicas de todos los participantes incluidos en el estudio.

Anexo 9. Variantes obtenidas tras los análisis de filtrado.

Anexo 10. Estudios moleculares en muestras de tejido de pacientes PAAX.

Anexo 11. Resumen de las muestras analizadas para la confirmación de mosaicos en el gen *APC*.

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

Introducción: La poliposis adenomatosa (PA) se define como aquella condición en la que un individuo tiene tendencia a desarrollar adenomas a lo largo del colon y/o recto. Los adenomas son lesiones precursoras del cáncer colorrectal (CCR) y, por lo tanto, los individuos que presentan PA tienen un riesgo acumulado de padecer CCR a lo largo de su vida, que oscila entre el 40% y el 100% según la gravedad de la poliposis. Clínicamente, suele clasificarse según la carga de adenomas en poliposis clásica (PAC) (>100) y atenuada (PAA) (10-100). La mayoría de las PAC se explican por variantes germinales en el gen *APC* o en el gen *MUTYH*. Sin embargo, las alteraciones en estos genes tan solo explican el 10-20% de las PAA, población que representa una fracción importante en las consultas de Consejo Genético (CCG) y que ha ido en aumento en los últimos años debido a la implantación de los programas de cribado colorrectal y la mejora en la sensibilidad de las técnicas de imagen.

Hipótesis y objetivos: El diagnóstico molecular rutinario de la PAA se centra principalmente en los genes *APC* y *MUTYH*. La hipótesis de este trabajo es que una fracción importante de las PAA no explicadas (PAAX) podría ser causada por alteraciones en otros genes de susceptibilidad menos conocidos. El objetivo de esta tesis doctoral es definir la susceptibilidad genética en los casos de PAA que acuden a las Consultas de Consejo Genético (CCG).

Metodología: Se incluyeron 159 pacientes con PAAX. Se llevó a cabo la secuenciación de 22 genes de predisposición a la PA/CCR mediante un panel personalizado de secuenciación masiva o “Next Generation Sequencing” (NGS). Las variantes detectadas se validaron mediante secuenciación Sanger y para su caracterización se llevaron a cabo estudios de segregación familiar, *splicing*, expresión de ARN y/o proteína en tejido adenomatoso y cribado de mutaciones somáticas.

Se analizaron los tejidos adenomatosos procedentes de los pacientes PAA mediante el análisis de la inestabilidad de microsatélites, Genotipado de la mutación V600E de *BRAF* y el estudio de metilación en el promotor del gen reparador *MLH1*, así como el cribado de *hotspots* mediante un panel somático de NGS.

Se llevó a cabo un estudio de mosaicos en *APC* en una cohorte más reducida, sin historia familiar de PA, mediante secuenciación NGS con un panel de *APC* en al menos dos tejidos adenomatosos/adenocarcinomatosos por paciente y genotipado de tejidos adicionales por PCR digital.

Resultados: En el cribado germinal se validaron 45 variantes distribuidas en 49 sujetos (30,8% de la cohorte inicial), de las cuales 6 variantes detectadas en 10 sujetos (6,3% de la cohorte inicial) fueron clasificadas como benignas o probablemente benignas, 30 variantes en 31 sujetos como variantes de significado desconocido (19,5%), y 9 variantes en 10 sujetos como patogénica o probablemente patogénica (6,3%). En total se pudo explicar la PAA y ofrecer un asesoramiento y seguimiento personalizado en 7 pacientes (4,4%). Concretamente, se detectaron 3 portadores de variantes truncantes en *APC*, 2 portadores bialélicos en *MUTYH*, un portador de una variante truncante en *POLE* y un portador de una variante patogénica en *PTEN*.

El estudio molecular de los tejidos adenomatosos facilitó la caracterización de variantes en *MUTYH* y permitió detectar dos tejidos metilados en el promotor de *MLH1*, en dos pacientes sin historia familiar.

En el análisis de mosaicos en el gen *APC* se detectaron 4 pacientes que presentaron al menos dos muestras de adenomas independientes portadoras de la misma variante en *APC*. Tras genotipar más tejidos adenomatosos y/o tejido colónico normal de cada uno de ellos, se confirmó el mosaicismo en dos de ellos, sugiriendo una tasa de mosaicismo del 20%.

Conclusiones: Tras el desarrollo de este estudio se ha demostrado un aumento notable de la sensibilidad diagnóstica de la PAA con el uso de paneles multigénicos. Se han detectado distintos casos de susceptibilidad asociados principalmente a los genes de predisposición primaria *APC* y *MUTYH*, y en menor medida a genes asociados a otros síndromes polipósicos, como *PTEN*. Se ha descartado la variante controvertida D303N de *GALNT12* como alelo de alta penetrancia en la susceptibilidad a la PAA, y se proponen las variantes truncantes en *POLE* como posibles mecanismos de susceptibilidad a la PAA. Se pone de manifiesto la importante contribución de los fenómenos de mosaicismo en *APC* en pacientes sin historia familiar de PAA. Estos resultados contribuyen al conocimiento y a la mejora del manejo asistencial de la susceptibilidad a la PAA, y demuestran la alta heterogeneidad genética y fenotípica en este grupo de pacientes.

SUMMARY

Introduction: Adenomatous Polyposis (AP) is that condition in which an individual tends to develop adenomatous polyps (adenomas) throughout the colon and/or rectum. Adenomas are precursor lesions of colorectal cancer (CRC) and, therefore, individuals with AP have a cumulative risk of developing CRC that ranges from 40% to 100% depending on the severity of the polyposis. Clinically, AP can classify according to the adenoma burden into classic (>100) and attenuated (AAP) (10-100). The most severe cases are generally due to germline alterations in the *APC* gene or germline biallelic variants in the *MUTYH* gene. However, alterations in these genes can only explain for 10-20% of AAP. This population represents a significant fraction in Genetic Counseling Units (GCU), and it has increased significantly in recent years due to the implementation of colorectal screening programs and the improvement in the sensitivity of imaging techniques.

Hypothesis and objective: AAP routine genetic testing has been focusing only on the *APC* and *MUTYH* genes in most hospitals. The hypothesis of this work is that a significant fraction of unexplained AAP could be caused by alterations in other known susceptibility genes. The main objective is to define the genetic susceptibility of AAP cases in our hospital environment.

Methodology: We included 159 patients with unexplained AAP who had not been previously detected an alteration in any CRC/polyposis predisposition gene. For germline screening, an NGS custom panel of 22 AP/CRC predisposition genes was designed. The detected variants were validated by Sanger sequencing. Familial segregation studies, cDNA splicing analyses, RNA and/or protein expression studies in adenomatous tissue, and somatic mutations screening were carried out for germline variant characterization.

Microsatellite instability analysis, *BRAF* V600E genotyping, *MLH1* promoter methylation and a somatic NGS panel were performed for the characterization of adenomatous tissues. The *APC* mosaic study was carried out in a smaller cohort (N=10), with no family history of AP, in which common *APC* variants were searched for in at least two adenoma/adenocarcinoma tissues per patient and validated by genotyping of additional tissues by digital PCR.

Results: 45 variants (58 detections) distributed in 49 subjects (30.8% of the initial cohort) were validated before the germline analysis. 6 variants detected in 10 subjects (6.3% of the initial cohort) were classified as benign or likely-benign, 30 variants detected in 31 subjects remained as variants of unknown significance (19.5% of the initial cohort), and 9 variants distributed in 10 subjects were classified as pathogenic or likely pathogenic (6.3% of the initial cohort). It was possible to explain the AAP and offer personalized advice and follow-up in 7 study subjects (4,4% of the cohort). Specifically, 3 patients harbored *APC* truncating variants, two patients harbored biallelic variants in *MUTYH*, one patient harbored *POLE* truncating variant and another one harbored a pathogenic variant in the *PTEN* gene.

The molecular study of adenomatous tissues facilitated the characterization of *MUTYH* variants and allowed the detection of two methylated tissues in the *MLH1* promoter, in two patients with no family history.

In the *APC* mosaic analysis, four patients were detected with at least two independent adenoma samples carrying the same variant in *APC*. After analyzing the clinical characteristics of the patients and genotyping more adenomatous and/or normal colonic tissues, mosaicism was confirmed in two of them, suggesting a mosaicism rate of 20%.

Conclusions: A notable increase in the diagnostic sensitivity of the AAP has been demonstrated with the use of multigene NGS panels. Different cases of susceptibility were detected in primary predisposition genes (*APC* and *MUTYH*), predisposition to other polyposis syndromes (*PTEN*), and the controversial D303N variant of *GALNT12* was ruled out as a high penetrance allele in the susceptibility to AAP. In addition, truncating variants in *POLE/POLD1* was proposed as possible mechanisms of susceptibility to AAP, and it was highlighted the contribution of *APC* mosaicism phenomena in patients without a family history of AAP. These results contribute to improving the care management of susceptibility to AAP and demonstrate the high genetic and phenotypic heterogeneity in this group of patients.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER COLORRECTAL

La carcinogénesis es un proceso genético y, secuencial, en el que a partir de una célula se producen secuencialmente alteraciones genéticas y/o epigenéticas que conllevan, en última instancia, al desarrollo de un tumor con todas las propiedades que lo definen, como son el mantenimiento de la señal proliferativa y la evasión de las señales antiproliferativas, resistencia a la muerte celular, inducción de la angiogénesis, capacidad de división ilimitada y activación de la invasión y la metástasis. Estas capacidades, acuñadas como “*hallmarks* del cáncer”, fueron descritas inicialmente por Hanahan y Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2000), y actualizadas por ambos autores en la última década (Hanahan & Weinberg, 2011; Hanahan, 2022) (Figura 1).



Figura 1. “Hallmarks” o características distintivas del cáncer. En el año 2000 Hanahan y Weinberg propusieron unas características iniciales, aunque el progreso conceptual en la última década ha permitido la incorporación de seis características emergentes: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune en el 2011 (Hanahan & Weinberg, 2011); y la reprogramación epigenética, las células senescentes, los microbiomas polimórficos y el desbloqueo de la plasticidad fenotípica en el año 2022. Imagen adaptada de (Hanahan, 2022).

El cáncer colorrectal (CCR) engloba todos aquellos tumores que se originan en cualquiera de las capas del tejido del colon y/o recto. Los tumores colorrectales malignos más frecuentes son los adenocarcinomas, pues representan más del 90% de todos los tumores colorrectales. Estos tumores son de origen glandular y se desarrollan a partir de una lesión premaligna conocida como pólipo. Se conocen diferentes tipos de pólipos según su histología, y se ha visto que más del 70% de los adenocarcinomas de colon y recto proceden de pólipos adenomatosos (von Karsa et al., 2013).

Existen otras neoplasias colorrectales que representan menos del 10% de los tumores colorrectales. Entre estas neoplasias atípicas se incluyen:

- Los tumores carcinoides o neuroendocrinos (NET), originados a partir de células neuroendocrinas del colon y/o recto (Porter & Stoeger, 2017).
- Los linfomas colorrectales primarios, que se originan a partir de las células del linaje B y son linfomas tipo no Hodgkin (Porter & Stoeger, 2017).
- Los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) son los tumores mesenquimales más comunes del sistema gastrointestinal y algunos de ellos son benignos (Randall Cooper et al., 2018).
- Los sarcomas se originan en los vasos sanguíneos, en las capas musculares o en otros tejidos conectivos del colon y recto (Randall Cooper et al., 2018).

1.1. FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DEL COLON Y RECTO

El colon engloba la parte inferior del tubo digestivo, comprendida entre la válvula ileocecal y el ano. Posee una longitud aproximada de 150cm en adultos, y sus funciones principales son la absorción de nutrientes, electrolitos y agua, así como la eliminación de los restos no absorbidos que, junto con el mucus secretado, la fibra y parte de la flora bacteriana, forman las heces.

El colon puede organizarse macroscópicamente en dos grandes divisiones: el colon proximal o derecho y el colon distal o izquierdo. El colon derecho está formado por el ciego, al cual le continúa el colon ascendente y el colon transversal. El colon izquierdo está formado por el colon descendente, el colon sigmoide o sigma, el recto y finalmente el ano (Kadrić et al., 2003) (Figura 2A).

Microscópicamente, su pared puede dividirse en varias capas: la más interna, empezando desde el lumen hacia el exterior, es la mucosa, formada por glándulas mucosas

denominadas criptas de Lieberkühn. Estas criptas están compuestas por células epiteliales absorbentes (enterocitos), que se renuevan constantemente, naciendo en la base de las criptas y desplazándose hacia la superficie donde mueren. En esta misma capa se sitúan la lámina propia y la muscular de la mucosa. Seguidamente se encuentra la submucosa, formada por tejido conectivo denso, que contiene vasos sanguíneos y zonas de tejido adiposo. Adyacente a la submucosa hay una capa muscular, constituida por fibras longitudinales y circulares. Tras ella se encuentra la subserosa y finalmente la serosa, tan delgada que en algunos puntos se continúa con el peritoneo (Figura 2B) (Brüel A et al., 2015).

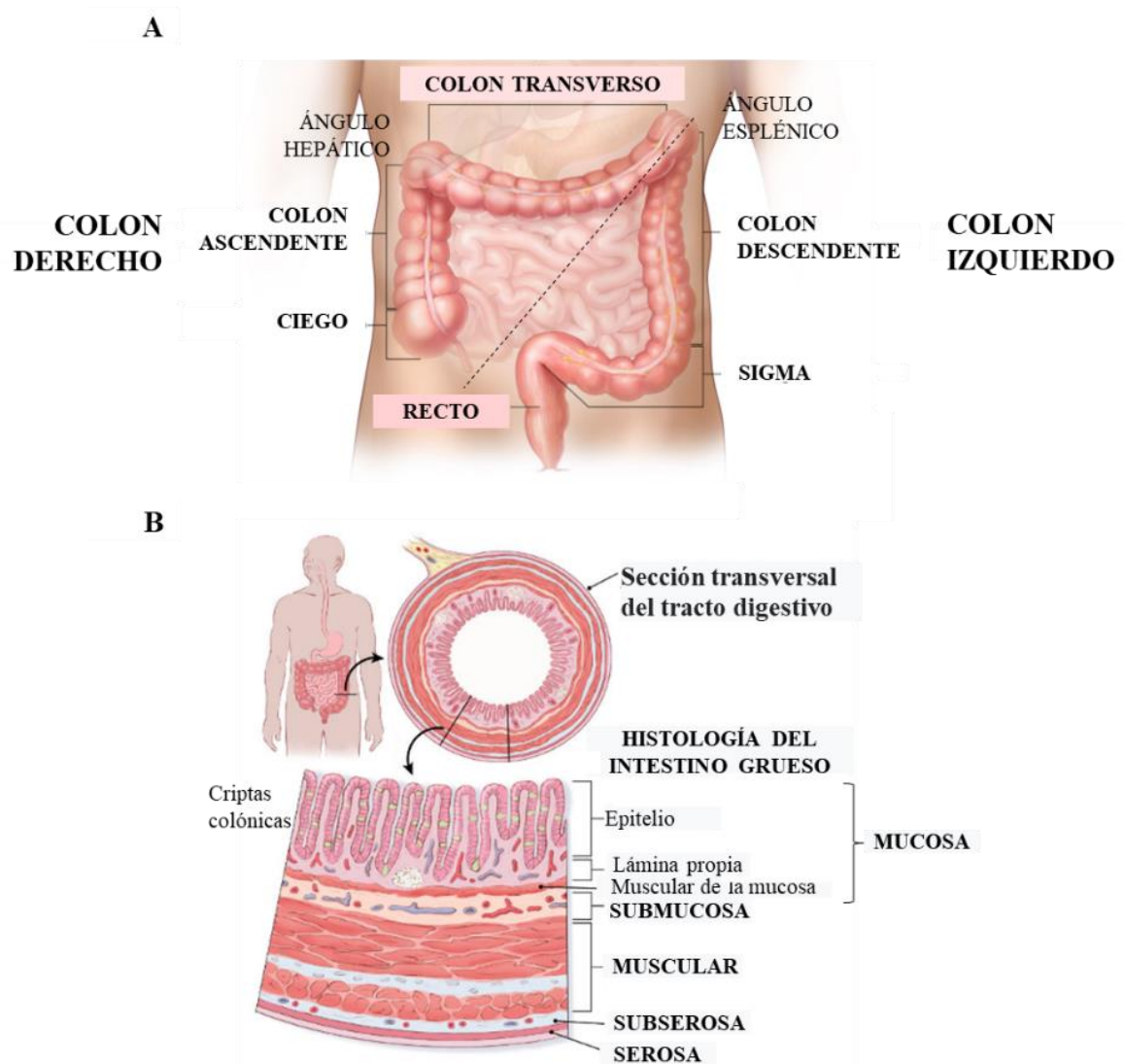


Figura 2. Estructura del colon y recto. A: Representación de las diferentes partes anatómicas del colon, modificada del Instituto Nacional del Cáncer (cancer.gov). B: Histología del intestino grueso, modificada de American Cancer Society (cancer.org).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Se estima que en el año 2020 hubo 19,3 millones de casos nuevos y 10 millones de muertes por cáncer en todo el mundo, teniendo en cuenta todos los tumores, sexos y edades. De todos ellos, más de 1,9 millones fueron nuevos casos de CCR (10%) y hubo 935.000 muertes por CCR (9,4%). Con ello, el CCR ocupa el tercer lugar, después del cáncer de mama y pulmón, en términos de incidencia y teniendo en cuenta ambos sexos (Figura 3), y el segundo lugar en términos de mortalidad, tras el cáncer de pulmón (Sung et al., 2021).

Porcentaje de casos a nivel mundial

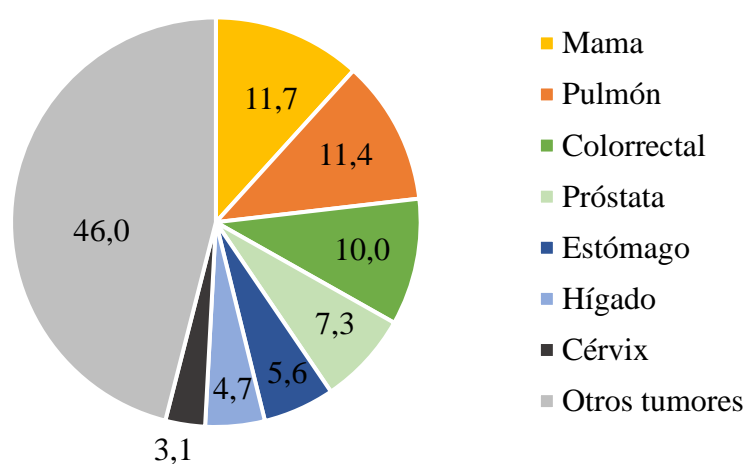
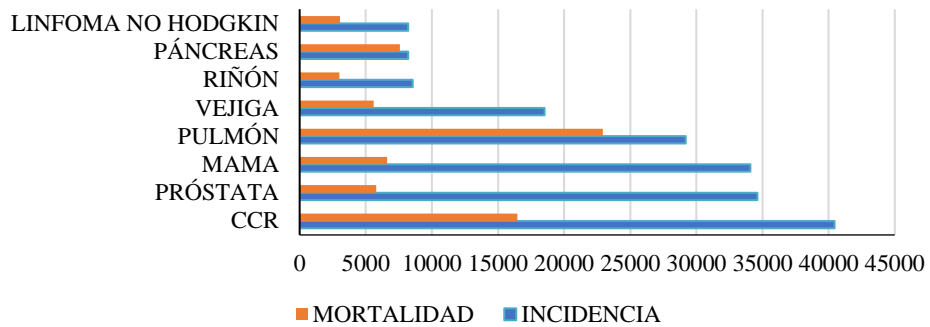


Figura 3. Porcentaje de nuevos casos de tumores (agrupados según localización) frente al total de casos diagnosticados en 2020 a nivel mundial. Se incluyen los datos de ambos sexos y todas las edades. Datos obtenidos de GLOBOCAN, 2020 (<http://gco.iarc.fr>).

Hay una variación de aproximadamente 9 veces en las tasas de incidencia de CCR en las distintas regiones del mundo, con las tasas más altas en las regiones europeas, Australia/Nueva Zelanda y América del Norte, y con Hungría y Noruega ocupando el primer lugar tanto en hombres como en mujeres, respectivamente. En España, el CCR es el tumor con mayor incidencia si consideramos ambos sexos (40441 nuevos casos) y el segundo más mortal (16470 muertes) después del cáncer de pulmón (Figura 4). Sin embargo, en el caso de las mujeres es el segundo tumor en incidencia y el primero en mortalidad.

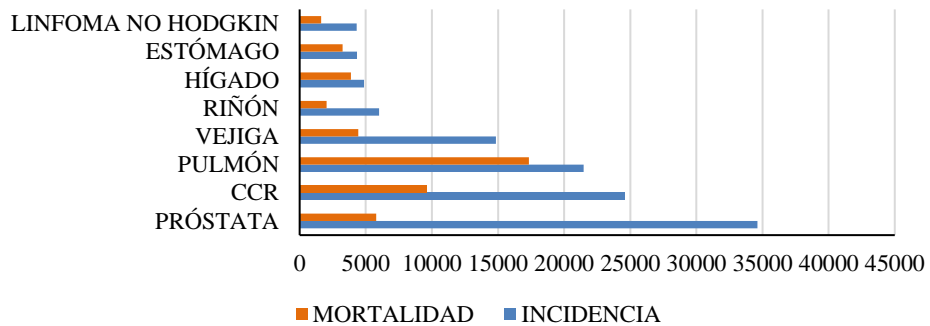
A

ESPAÑA (AMBOS SEXOS)



B

ESPAÑA (HOMBRES)



C

ESPAÑA (MUJERES)

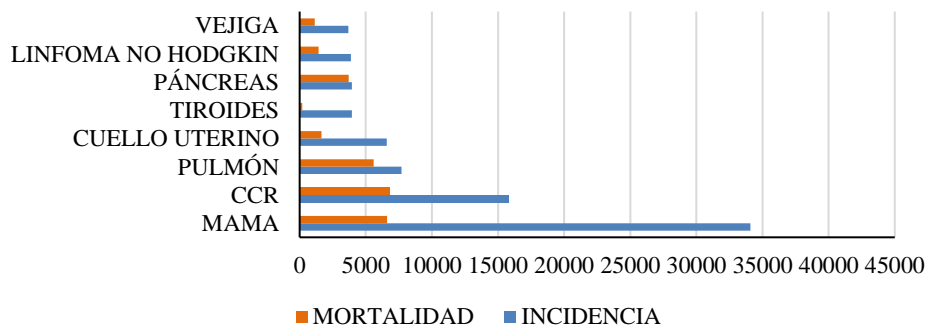


Figura 4. Incidencia y mortalidad de cáncer en España en el año 2020. Se tienen en cuenta ambos sexos (A), hombres (B) y mujeres (C), y en cualquier caso todas las edades. Datos obtenidos de GLOBOCAN, 2020.

1.3. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El CCR es una enfermedad multifactorial, ya que existen numerosos factores tanto extrínsecos como intrínsecos que juegan un papel importante en su desarrollo. Se ha demostrado que factores extrínsecos como el estilo de vida, la dieta y patologías previas están asociados con un mayor riesgo de desarrollar CCR (wcrf.org/cancer-preventability-estimates). Como factores intrínsecos destacan la edad, el sexo y la herencia genética.

1.3.1. EDAD Y SEXO

Numerosos estudios han demostrado que la probabilidad de diagnóstico de CCR aumenta con la edad. En población americana, se ha demostrado que la probabilidad de diagnóstico de CCR aumenta progresivamente a partir de los 40 años, aumentando considerablemente después de los 50. Sin embargo, el CCR parece estar aumentando entre las personas más jóvenes (Hagggar & Boushey, 2009).

Con respecto al sexo, la mayoría de los estudios muestran que los hombres tienen un riesgo ligeramente mayor de desarrollar CCR que las mujeres y, que el CCR derecho se observa más en mujeres, mientras que el CCR izquierdo se detecta principalmente en hombres (Kim SE et al, 2015).

1.3.2. ESTILO DE VIDA Y DIETA

Una variedad de factores de estilo de vida y ambientales, en gran medida modificables, influyen en el riesgo de desarrollar CCR. El riesgo se ve aumentado por el tabaquismo (Liang et al., 2009), el consumo de alcohol (Fedirko et al., 2011) y el aumento del peso corporal (Guraya, 2015). Sin embargo, el ejercicio físico (Arem et al., 2014) y la dieta (Song et al., 2015; Dahm et al., 2010) pueden disminuirlo.

1.3.3. OTROS FACTORES: ENFERMEDADES/SÍNDROMES DIGESTIVOS

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias intestinales (EII) que se desarrollan como resultado de una respuesta inmune desregulada hacia la microbiota comensal en un huésped. Estas EII aumentan el riesgo de CCR debido al efecto carcinogénico de la inflamación mucosa crónica y a otros factores de riesgo individual (Jess, Rungoe, et al., 2012; Fornaro et al., 2009).

La presencia de pólipos colorrectales también se ha asociado con un mayor riesgo de CCR, pues la mayoría de los tumores colorrectales proceden de un pólipo adenomatoso, y en menor medida, de un pólipo serrado (Strum, 2016). Así, los síndromes polipósicos aumentan el riesgo de CCR, dependiendo del tipo y grado de severidad de la poliposis.

1.3.4. FACTORES GENÉTICOS

El riesgo de desarrollar CCR también se ve influenciado por factores genéticos, y en mayor medida cuando hay antecedentes familiares de la enfermedad. La susceptibilidad heredada es un componente importante de la predisposición al CCR, con un riesgo estimado del 12 al 35% atribuido a factores genéticos (Peters et al., 2015). Durante las últimas dos décadas, se ha logrado un progreso sustancial hacia el descubrimiento de la arquitectura genética del CCR. Los factores de riesgo genéticos establecidos hasta ahora oscilan entre dos extremos: los alelos raros de alta penetrancia, cada uno de los cuales confiere aumentos marcados en el riesgo relativo (RR) de síndromes hereditarios (RR cercano a 10); a variantes comunes, también llamadas polimorfismos, que confieren efectos débiles (RR menor de 2) sobre el riesgo 'esporádico' en individuos con o sin antecedentes familiares de CCR (Figura 5).

Así, los factores genéticos o alelos de susceptibilidad al cáncer se pueden dividir en alelos de alta, moderada y baja penetrancia. Los alelos de alta penetrancia dan lugar a perfiles de herencia mendeliana dominantes o recesivos. Los alelos de penetrancia moderada confieren un riesgo algo menor presentando agregaciones familiares de cáncer, pero sin un claro patrón de herencia. En el caso de los alelos de baja penetrancia, sería la acumulación de varios alelos la que explicaría el aumento de riesgo en los pacientes portadores.

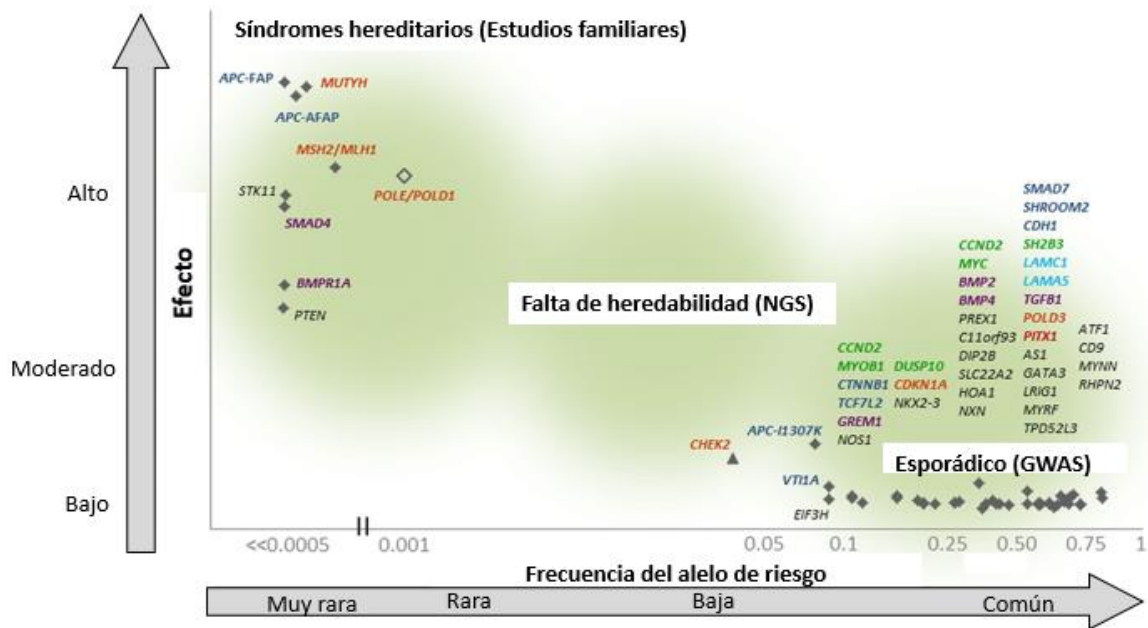


Figura 5. Arquitectura genética de loci conocidos de susceptibilidad al CCR. En el eje de las abscisas se muestra la frecuencia del alelo de riesgo de la etnia en la que se descubrió el locus, excepto para las variantes con efecto recesivo, para las cuales se muestra la frecuencia del alelo homocigoto raro. En el eje de las ordenadas se muestra el riesgo relativo de CCR. En azul oscuro: genes implicados en la vía Wnt, en verde: genes implicados en la vía MAPK, en azul claro: genes de la lámina estructural, en rojo: reparadores/fidelidad de la replicación del ADN, en morado: genes implicados en la vía TGF- β /BMP. Imagen adaptada de (Peters et al., 2015).

Alelos de alta penetrancia

Son aquellos loci que explican la existencia de síndromes hereditarios de cáncer y los únicos que, hasta fechas recientes, han tenido un impacto real en las consultas de cáncer familiar y consejo genético (CCG). Estos síndromes, raros en la población, pueden llegar a explicar en conjunto aproximadamente el 5-10% de todos los casos de cáncer (Nagy et al., 2004). Se suelen caracterizar por edades de diagnóstico más tempranas, múltiples casos de cáncer en un individuo y antecedentes familiares.

Al igual que el resto de los síndromes hereditarios, la mayor parte de los síndromes de predisposición al CCR se ajustan a un patrón de herencia dominante, y están causados por variantes que causan pérdida de función en genes supresores de tumores o genes reparadores. Algunos ejemplos clásicos son la Poliposis adenomatosa familiar (FAP) (OMIM: 175100) causada por mutaciones en el gen *APC* (OMIM: 611731) y el síndrome de Lynch (OMIM: 114500) causado mayoritariamente por variantes patogénicas/

probablemente patogénicas en los genes *MLH1* (OMIM: 120436), *MSH2* (OMIM: 120435), *MSH6* (OMIM: 600678) y *PMS2* (OMIM: 600259).

No obstante, existen síndromes hereditarios de CCR que se desvían de la norma, asociándose a patrones de herencia recesivos (Valle, 2014). Un ejemplo clásico de síndrome hereditario autosómico recesivo es la PA causada por variantes germinales bialélicas (homocigotas o heterocigotas compuestas) en *MUTYH* (OMIM:604933).

Alelos de moderada penetrancia

Los estudios de asociación pangenómicos (GWAS: del inglés, *whole-genome association studies*) en pacientes con CCR han permitido la identificación de alelos de moderada penetrancia, que presentan unas frecuencias alélicas mayores que los anteriores y un riesgo relativo moderado para CCR (valores de RR cercanos a 2). Ejemplos de alelos de moderada penetrancia son *CHEK2* y algunas variantes *missense* en *APC*, como la variante NM_000038.6(*APC*):c.3920T>A p.(Ile1307Lys) (I1307K), que es muy rara en la mayoría de las poblaciones, pero tiene una frecuencia del 6% en población Ashkenazi y un riesgo relativo moderado (RR de 2.17) para CCR (Liang et al., 2013).

Alelos de baja penetrancia

Los alelos de baja penetrancia, identificados también mediante estudios GWAS, son alelos comunes asociados con un riesgo ligeramente mayor de CCR que la población general (RR menor de 2) (Peters et al., 2013). La acumulación de variantes de baja penetrancia puede explicar en parte el riesgo de CCR familiar, o pueden modificar el riesgo de cáncer en pacientes con alelos de alta penetrancia.

Los distintos estudios publicados han identificado un amplio número de variantes genéticas comunes de baja penetrancia, distribuidas en más de 40 regiones cromosómicas distintas, asociadas con el riesgo de CCR en población caucásica (Theodoratou et al., 2012). Recientemente, se están desarrollando y evaluando modelos para la predicción y estratificación del riesgo al CCR, y se ha descrito una primera aproximación a la puntuación de riesgo poligénico (PRS: del inglés, *polygenic risk score*) utilizando datos GWAS de más de 120.000 sujetos sanos y afectados de ascendencia europea (M. Thomas et al., 2020). Estas predicciones se basan en la combinación de alelos de baja penetrancia

que presente un individuo, cada uno de ellos confiere un determinado riesgo, y la combinación de varios alelos confiere un riesgo igual a la suma del riesgo de cada uno de ellos.

1.4. CARCINOGENÉISIS COLORRECTAL

El modelo inicial de la carcinogénesis colorrectal fue propuesto en 1990 por Fearon y Vogelstein (Fearon & Vogelstein, 1990). En este modelo se plantea la participación de los siguientes eventos moleculares:

- Las mutaciones genéticas adquiridas que conducen al aumento de la función de los oncogenes (como *KRAS*) o la pérdida de función de genes supresores de tumores (como *APC*, *TP53*, y *SMAD4*) proporcionan una ventaja de crecimiento selectivo a los clones de células (Fearon, 2011). La expansión de estos clones de células inicia la transformación del epitelio colónico normal en neoplasias o pólipos benignos y la acumulación de más cambios genéticos conduce su progresión a neoplasias más grandes y avanzadas, y finalmente al carcinoma invasivo.
- Para la formación de un tumor maligno se requieren mutaciones en al menos 4 ó 5 genes, y aunque las alteraciones genéticas ocurren preferencialmente en un orden secuencial, la acumulación de estas mutaciones, y no el orden en que sucedan, es la responsable de las propiedades biológicas del tumor.
- Los genes supresores de tumor pueden actuar en algunos casos de manera “no recesiva” a nivel celular, ya que parecen perder su función incluso en heterocigosis.

Desde su descripción original, ha habido enormes avances en el conocimiento de los cambios genéticos involucrados en el CCR, y estos han llevado numerosas revisiones del modelo. Actualmente, se aceptan tres vías distintas de carcinogénesis colorrectal en función de las alteraciones moleculares subyacentes: vía de la inestabilidad cromosómica (CIN), vía de la inestabilidad de microsatélites (MSI) y vía del fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) o vía serrada. Estas vías no son excluyentes, puede haber interacciones entre ellas dando lugar a tumores que presenten características de más de una vía simultáneamente (Fearon, 2011).

Las tres vías se inician a partir de una lesión benigna y mediante la acumulación de alteraciones genéticas y/o epigenéticas a nivel tisular se desarrolla el carcinoma invasivo. La inestabilidad cromosómica, genética y/o epigenética son imprescindibles para el desarrollo y avance del tumor, y van a condicionar en gran medida la historia natural del tumor y el pronóstico del paciente.

1.4.1. Vía de la Inestabilidad cromosómica o Supresora

La mayoría de los CCR (65-70% de los casos) se originan por una inestabilidad a nivel cromosómico que implica la ganancia y/o pérdida de grandes regiones cromosómicas (Nguyen et al., 2020). Estos tumores se desarrollan siguiendo el modelo clásico de progresión adenoma-carcinoma propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990, en el que se producen numerosas alteraciones que implican la activación de determinados oncogenes (como *KRAS*) y la inhibición de genes supresores de tumor (como *APC*, *TP53* y *SMAD4*) (Fearon & Vogelstein, 1990). Estos tumores se vuelven aneuploides de manera temprana en la progresión, presentando pérdidas de material genético por errores de recombinación mitótica, así como grandes reordenamientos cromosómicos que conllevan a progresión tumoral.

La inactivación del gen supresor de tumores *APC* es el factor iniciador de la vía, teniendo lugar en la fase temprana del desarrollo del adenoma. Mutaciones en dicho gen se han identificado en aproximadamente el 80% de estos tumores (Guinney et al., 2015). Durante el estadio de adenoma, aparecen mutaciones en el oncogen *KRAS* (40% de los tumores colorrectales), que junto a mutaciones en *TP53*, *TGF- β* , *PIK3CA* y deleciones del cromosoma 18q favorecen la diferenciación a adenocarcinoma (Markowitz et al., 1995; Thiagalingam et al., 1996; Samuels et al., 2004; Baker et al., 1989).

1.4.2. Vía de la Inestabilidad de Microsatélites o Mutadora

La pérdida de función de cualquiera de las proteínas que intervienen en la vía de reparación de errores de desapareamiento de bases durante la replicación del ADN (MMR: del inglés, *Mismatch Repair*) produce la acumulación de errores de tipo inserción o deleción en secuencias microsatélites a lo largo de todo el genoma (De'angelis et al., 2018). Los microsatélites son secuencias repetitivas de ADN distribuidas a lo largo de

todo el genoma. Si estos microsatélites se encuentran en la región codificante de los genes, los errores cometidos en la replicación podrán ocasionar cambios en la pauta de lectura que conllevan la aparición de codones de parada prematuros y con ello, proteínas truncadas.

Genes que intervienen en los procesos clave de la carcinogénesis, como el control del ciclo celular, apoptosis o reparación del ADN (oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores) también pueden presentar microsatélites en su región codificante, siendo diana de este tipo de mutaciones. Así surgen los tumores con fenotipo MSI, con una elevada tasa de mutaciones puntuales (fenotipo hipermutador) y pocas anomalías cromosómicas (Boland & Goel, 2010), siendo la mayoría de ellos diploides, al contrario que los tumores con inestabilidad cromosómica. Estos tumores representan en torno al 15% de todos los CCR (Boland & Goel, 2010); de todos ellos, el 80-85% son esporádicos, donde el fenotipo MSI se debe fundamentalmente a la hipermetilación somática del promotor del gen *MLH1* (Cunningham et al., 1998), y el 15-20% son de origen hereditario, donde la alteración del sistema MMR ocurre a nivel germinal (Boland & Goel, 2010) dando lugar al Síndrome de Lynch.

La principal diana de inestabilidad en los tumores MSI es el gen supresor *TGFBR2*, que aparece alterado en el 80% de las lesiones avanzadas, como adenomas con displasia de alto grado (Grady et al., 1998) (Takayama et al., 2006). Otras dianas de inestabilidad frecuentes son *SMAD2* y *SMAD4* (Riggins et al., 1997), y el gen supresor de tumores *BAX* (Rampino et al., 1997).

1.4.3. Vía del fenotipo metilador de islas CpG o Vía Serrada

Las islas CpG son regiones ricas en dinucleótidos citosina-guanina, presentes en la región promotora de aproximadamente el 50% de los genes humanos, y cuya metilación puede producir el silenciamiento transcripcional de los genes que las contienen.

Esta vía oncogénica se caracteriza por la hipermetilación de islas CpG en zonas promotoras de genes supresores de tumores. En la mayoría de estos tumores, la metilación de estas regiones se origina de manera estocástica, pudiendo afectar a la expresión de genes importantes en el desarrollo neoplásico, como *MGMT*, *CDKN2A* y *MLH1*. (Wynter et al., 2004; Young & Jass, 2006; Hesson et al., 2010). En función del número de loci

metilados y de los niveles de metilación, podemos distinguir entre CIMP alto (CIMP-H), asociados con mutaciones en *BRAF*, y CIMP bajo (CIMP-L) asociados con mutación en *KRAS*, pudiendo existir una diferencia en la patogenia de la metilación del *ADN* entre ambos tipos de tumores (Kawasaki et al., 2008).

Parece ser que entre el 15 y 30% de todos los CCR podrían estar asociados a esta vía metiladora (CIMP-H) (Anderson, 2014), en la cual, los pólipos serrados sustituirían al adenoma clásico como lesión precursora del cáncer.

En la vía metiladora, la hipermetilación es el primer evento de la carcinogénesis. Existe una fuerte asociación entre los tumores MSI debidos al fenotipo CIMP y la mutación V600E en *BRAF*. Los tumores MSI debidos a una alteración hereditaria suelen ser portadores de mutación en *KRAS*, mientras que los tumores MSI debidos a hipermetilación del promotor de *MLH1* suelen ser portadores de mutación en *BRAF* (Minoo et al., 2007). Por otro lado, la mayoría de los CCR esporádicos MSI son CIMP-H, mientras que los adenomas clásicos estarían asociados generalmente a tumores estables (MSS), siguiendo la vía supresora de carcinogénesis (Jass, 2007b).

1.5. CLASIFICACIÓN DEL CCR

1.5.1. SUBTIPOS MOLECULARES DEL CCR

El análisis de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del CCR permitió la clasificación inicial de los tumores en cinco subtipos (Figura 6), cada uno con un perfil molecular y unas características clínico-patológicas diferentes (Jass, 2007a):

- **Grupo 1:** CIMP-H, MSI-H, metilación de *MLH1*, mutación en *BRAF*, estabilidad cromosómica. A menudo originados en pólipos hiperplásicos, lesiones serradas sésiles y adenomas serrados. Conocidos como MSI-H esporádicos (12%), son el grupo más homogéneo con respecto a sus características clínicas, morfológicas y moleculares.
- **Grupo 2:** CIMP-H, metilación parcial de *MHL1*, mutación en *BRAF*, estabilidad cromosómica, MSS o MSI-L, originados en pólipos serrados (8%).

- **Grupo 3:** CIMP-L, mutación en *KRAS*, metilación en *MGMT*, CIN, MSS o MSI-L, con origen en adenomas tubulares o túbulo-vellosos o en pólipos serrados (20%).
- **Grupo 4:** CIN, MSS, CIMP-negativo, originados en adenomas tradicionales (57%).
- **Grupo 5:** Mutación a nivel germinal en un gen implicado en la vía MMR. MSI-H, CIMP y mutación en *BRAF* negativos, estabilidad cromosómica y con origen en adenomas convencionales u ocasionalmente en adenomas serrados (3%).

No se excluyen las superposiciones entre los grupos. Por ejemplo, la mutación de *KRAS* en lugar de *BRAF* puede ocurrir ocasionalmente en asociación con CIMP-H (Weisenberger et al., 2006).

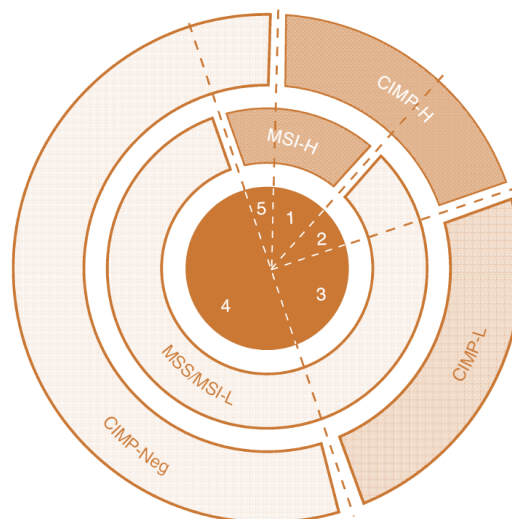


Figura 6. Clasificación molecular del CCR basado en el estado de CIMP, CIN y MSI. CIMP-H, alto; L, bajo; Neg, negativo. MSI-H, alto; -L, bajo; MSS, estable. Imagen adaptada de (Jass, 2007a).

Años más tarde se propusieron nuevas clasificaciones moleculares en función de distintos perfiles de expresión hasta que en el año 2015 se publicó una clasificación molecular consensuada, integrando conjuntos de datos de expresión, variables clínico-patológicas y las características biológicas del cáncer de los distintos trabajos en un total de 4151 pacientes (Guinney et al., 2015). La clasificación molecular del CCR es de gran importancia, ya que la identificación de estos subtipos sirve para generar y relacionar parámetros clínico-patológicos, supervivencia global, supervivencia libre de progresión y respuesta al tratamiento y recaída. Los 4 subtipos propuestos fueron los siguientes:

- Subtipo molecular 1 o MSI inmune (CMS1) (14 % de la cohorte): muestra MSI, CIMP-H, fenotipo hipermutado y mutación en *BRAF*. Se caracteriza por una expresión aumentada de genes asociados con infiltrados inmunes y fuerte activación de las vías de evasión inmune. Estos tumores son frecuentes en las mujeres, en colon derecho y con peor supervivencia después de la recaída.
- Subtipo molecular 2 o canónico-epitelial (CMS2) (37% de la cohorte): presenta alta frecuencia de alteraciones en el número de copias, alta expresión de Wnt y MYC. Estos tumores se presentan comúnmente en el lado izquierdo y los pacientes presentan mejores tasas de supervivencia después de la recaída.
- Subtipo molecular 3 o metabólico (CMS3) (13% de la cohorte): La mayoría de los tumores presentan MSI mixta, principalmente CIMP-L, y baja frecuencia de alteraciones en el número de copias, y alta frecuencia de mutaciones en *KRAS*.
- Subtipo molecular 4 o mesenquimal (CMS4) (23 % de la cohorte): caracterizado por la activación de TFG- β , invasión estromal y angiogénesis. Alta frecuencia de alteraciones en el número de copias. Los tumores tienden a ser diagnosticados en una etapa posterior y muestran una mayor recaída y menor supervivencia global.

1.5.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN LA HISTORIA FAMILIAR

Según la historia familiar, el CCR se puede clasificar en 3 tipos (Figura 8):

- 1) El **CCR esporádico** representa la gran mayoría de los CCR (70-80%) y aparece en personas sin antecedentes familiares de CCR y sin alteraciones genéticas germinales en genes de alta predisposición al cáncer. Posiblemente los factores medioambientales y los alelos de baja penetrancia jueguen un papel importante (Arvelo et al., 2015).
- 2) El **CCR familiar** se refiere a un grupo de casos con agregación familiar de la enfermedad, pero sin un patrón de herencia mendeliana. Estos casos representan del 15 al 20% de los CCR y se cree que son el resultado de una combinación de alelos de moderado riesgo y factores medioambientales (Arvelo et al., 2015).
- 3) El **CCR hereditario** comprende aquellos casos que muestran claro patrón de herencia mendeliana de CCR. Son causados por alelos de alta penetrancia en genes de predisposición al CCR, y representa el 5-10% de todos los CCR (Arvelo et al., 2015).

2. CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO

Se debe a alteraciones genéticas que van a conferir un riesgo alto de padecer CCR en comparación con la población normal, es decir, muestran una alta penetrancia. En la mayoría de los síndromes hereditarios de cáncer, los genes afectados son genes supresores de tumor o genes reparadores de ADN esenciales y la alteración se presenta generalmente en heterocigosis en vía germinal. El aumento del riesgo radica en que tan solo se necesita un evento mutacional a nivel somático en el alelo no portador para que se inactive el gen, desencadenando así el proceso carcinogénico según la **hipótesis de Knudson** (Figura 7). (L. H. Wang et al., 2018). Estos eventos pueden ser mutaciones genéticas, silenciamiento genético o pérdida de heterocigosidad.

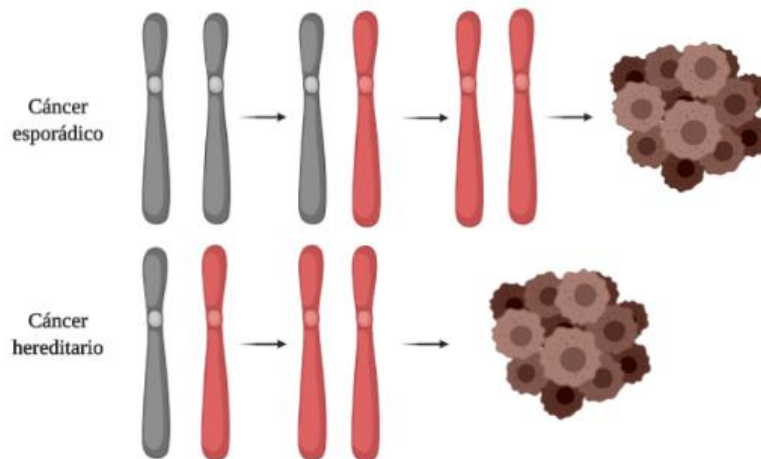


Figura 7. Hipótesis de Knudson. Para que un gen supresor de tumor desencadene un proceso carcinogénico es necesaria la inactivación de sus dos alelos a nivel somático mediante dos eventos independientes. a) Individuos con dos alelos normales necesitan dos eventos independientes para inactivarse. b) Individuos con una variante germinal en uno de los alelos solo necesitarán un evento para inactivarse. Imagen diseñada con la herramienta Biorender.

A nivel de excepción, existen síndromes de cáncer hereditario en los que el riesgo se ve aumentado en individuos portadores de alteraciones bialélicas en línea germinal, siguiendo un patrón de herencia autosómica recesiva. Este es el caso de ciertos genes reparadores del ADN que no son esenciales (*MUTYH* o *NTHL1*, por ejemplo), ya que su función puede cubrirse con otros genes reparadores en circunstancias de normalidad. Solo en ciertas situaciones su función se hace necesaria, dando lugar a una reparación deficiente del ADN y promoviendo la carcinogénesis (L. H. Wang et al., 2018).

2.1. CLASIFICACIÓN DEL CCR HEREDITARIO

Dentro del CCR hereditario se pueden distinguir dos grandes síndromes dependiendo del mecanismo subyacente de susceptibilidad (Figura 8): predisposición primaria al desarrollo de pólipos (CCR hereditario polipósico) y predisposición primaria al CCR sin presentar un exceso de pólipos (CCR hereditario no polipósico).

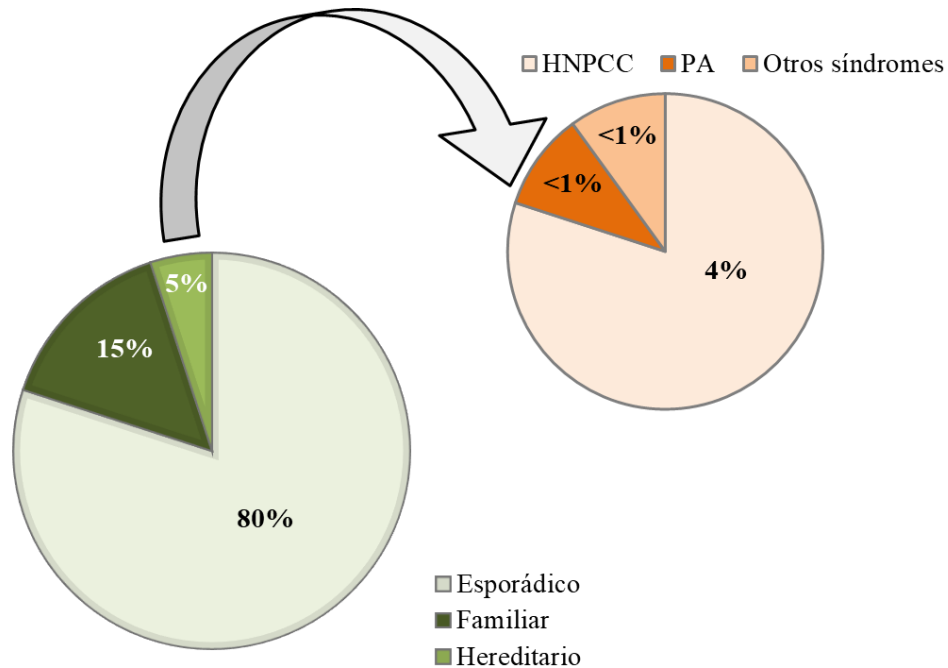


Figura 8. Clasificación del CCR según la historia familiar.

2.1.1. Cáncer colorrectal hereditario no polipósico (4%)

El CCR hereditario no polipósico o HNPCC (del inglés, *hereditary non-polyposis colorectal cancer*), se refiere al cáncer que no va acompañado de una poliposis y que muestra un claro patrón de herencia vertical respecto al CCR y/o tumores asociados.

En 1991 se desarrollaron los criterios clínicos Amsterdam I, que permitían la selección de familias con una fuerte evidencia de albergar un síndrome de CCR hereditario (Anexo 1) (Vasen et al., 1991). Posteriormente estos criterios se modificaron porque dejaban fuera muchas familias por no incluir ciertos tumores extracolónicos fuertemente asociados a las familias HNPCC; criterios Amsterdam II (Vasen et al., 1999).

En 1997 se crearon unos criterios menos estrictos con el fin de aumentar la sensibilidad diagnóstica (criterios de Bethesda) (Rodríguez-Bigas et al., 1997) (Umar et al., 2004). Estos criterios tienen una sensibilidad mucho más elevada que los criterios de Amsterdam

II (90% frente al 40%) aunque muestran un valor predictivo menor (10-20% frente al 50% de los criterios Amsterdam II) (Vasen et al., 2007).

En función de estos criterios clínicos y de la causa genética subyacente, se destacan tres entidades HNPCC: el síndrome de Lynch, el síndrome de Lynch-like y el CCR familiar tipo X (FCCT-X).

2.1.1.1. Síndrome de Lynch

Es la forma más frecuente de CCR hereditario, representando el 1-3% de todos los CCR (Lynch et al., 2009).

Está causado por la presencia de alteraciones germinales en alguno de los genes reparadores del ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*) implicados en la vía de reparación MMR, sistema clave para mantener la integridad del ADN durante la replicación celular. La vía MMR es la principal responsable de la reparación de los errores en el número de repeticiones de los microsatélites que se producen durante la replicación del ADN. Su deficiencia tiene como consecuencia la acumulación de numerosas mutaciones somáticas que afectan a microsatélites, dando lugar a tumores MSI (Giardiello et al., 2001).

Además de alteraciones inactivantes en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*, también se han descrito deleciones en el extremo 3' del gen *EPCAM* que se asocian al síndrome de Lynch, explicando en torno al 1-3% de las familias Lynch (Ligtenberg et al., 2009). *EPCAM* es un gen implicado en la interacción celular, que se localiza adyacente al extremo 5' del gen *MSH2* (Dollé et al., 2015) (Huang et al., 2018). Deleciones monoalélicas de los últimos exones de *EPCAM* suponen la pérdida de su señal de poliadenilación, y la generación de fusiones EpCAM-MSH2, dando lugar a la epimutación del promotor de *MSH2* y consiguiente inhibición de la expresión de *MSH2* (Ligtenberg et al., 2009).

Clínicamente, el síndrome de Lynch se caracteriza por el desarrollo precoz de CCR, generalmente antes de los 50 años, y una elevada tendencia a presentar neoplasias sincrónicas o metacrónicas. Desde el punto de vista anatomopatológico, los tumores colorrectales se localizan preferentemente en

el colon proximal (derecho) y presentan una histología mucinosa (Jenkins et al., 2007).

Los portadores de alteraciones patogénicas en alguno de estos genes presentan un riesgo de desarrollar CCR del 60-80% a lo largo de su vida, y también un riesgo de cáncer de endometrio entre el 40-60%, así como de otros tumores (gástricos, pancreáticos, del sistema urinario, ovario, vías biliares e intestino delgado) (Watson et al., 2008; Kastrinos & Stoffel, 2014). Con menor frecuencia, estos pacientes pueden desarrollar tumores cerebrales (principalmente glioblastomas) o cutáneos, combinaciones que reciben el nombre de síndrome de Turcot y de Muir-Torre respectivamente (Hamilton et al., 1995).

2.1.1.2. Cáncer colorrectal familiar tipo X

Es un subgrupo de HNPCC que comparte las mismas características clínicas que el síndrome de Lynch, pero no presenta déficit del sistema de reparación MMR. Los tumores no presentan MSI, no hay pérdida de expresión de las proteínas reparadoras y la heredabilidad no se explica por alteración patogénica en los genes de la vía MMR.

Muchos estudios han intentado identificar las causas genéticas en este grupo sin obtener grandes éxitos. Lo que se ha puesto de manifiesto es la alta heterogeneidad genética de las familias FCCT-X: en algunos casos se han identificado alteraciones truncantes germinales en genes implicados en vías de reparación del ADN, como *OGG1* de la vía BER (Garre et al., 2011) o *BRCA2* (Garre et al., 2015) y *FAN1* (Seguí et al., 2015), implicados en la vía de reparación por recombinación homóloga. También, se han detectado variantes potenciales en otros genes *CDKN1B*, *XRCC4*, *EPHX1*, *NFKBIZ*, *SMARCA4* y *BARD1* (Esteban-Jurado et al., 2015) o en la metiltransferasa *SETD6* (Martín-Morales et al., 2017).

Estudios iniciales detectaron un riesgo menor que en el síndrome de Lynch de desarrollar CCR y neoplasias extracolónicas (Lindor et al., 2005; Llor et al., 2005), determinando una edad media al inicio del cáncer de alrededor de 55 años en FCCT-X frente a los 45 años en el síndrome de Lynch (Dominguez-Valentin et al., 2015). Estudios más recientes han estimado una mayor

supervivencia global en estas familias, con una edad media de diagnóstico de $55,1 \pm 12,6$, una ubicación distal preferencial (76%) y una detección de pólipos en el 45% de los casos (Garre et al., 2014).

2.1.1.3. Síndrome de Lynch-like

Son casos con criterios clínicos HNPCC, que presentan una deficiencia en la vía MMR, pero en los que no se logra identificar la causa de tal deficiencia en la vía MMR, y por lo tanto, no se puede realizar el estudio presintomático en los familiares (Carethers, 2014).

La etiología no está clara, aunque hay estudios que sugieren que mutaciones somáticas esporádicas pueden justificar hasta el 50-60% de los casos (Carethers & Stoffel, 2015). Sin embargo, existen otras explicaciones como variantes germinales en genes no relacionados hasta el momento o solapamiento con otros síndromes hereditarios. Alrededor del 1-3% de los casos de Síndrome de Lynch-like son secundarios a variantes patogénicas/probablemente patogénicas bialélicas en *MUTYH* (Morak et al., 2014), monoalélicas en *POLE*, *POLD1*, *SETD2* o *FAN1* (A. M. Jansen et al., 2016; Vargas-Parra et al., 2017), y también a epimutaciones en *MLH1* (Hitchins, 2016; Dámaso et al., 2020).

2.1.2. Cáncer colorrectal hereditario polipósico (1%)

Los síndromes de poliposis familiar se caracterizan por la aparición de múltiples pólipos colorrectales. Estos síndromes son muy heterogéneos y la prevalencia de los mismos es muy baja. Cada síndrome de poliposis colorrectal presenta un patrón de herencia, unas características fenotípicas y unas manifestaciones extracolónicas propias (Long et al., 2022). Existen numerosos síndromes polipósicos, los cuales se describen detalladamente en el apartado 3.

3. POLIPOSIS COLORRECTALES

Las poliposis colorrectales constituyen un grupo de síndromes caracterizados por la aparición de múltiples pólipos en el colon y/o en el recto. Un pólipo es una masa de tejido anormal, visible macroscópicamente, y que se proyecta en la superficie de la mucosa. Estas lesiones presentan diferentes tamaños y morfologías, y algunas son capaces de progresar durante periodos determinados de tiempo hasta desarrollar CCR (Strum, 2016).

Los pólipos se pueden clasificar según su forma de crecimiento en: pediculados, sésiles o planos; y por sus características histológicas en: adenomatosos, serrados (serrado sésil, serrado tradicional e hiperplásico), hamartomatosos, juveniles e inflamatorios (Archanioti et al., 2019).

En función de la histología del pólipo que las constituye, las poliposis se clasifican en: poliposis adenomatosas (pólipos adenomatosos o adenomas), poliposis serradas (pólipos serrados), hamartomatosas (hamartomas o pólipos juveniles) y poliposis mixtas.

3.1. POLIPOSIS ADENOMATOSAS

La poliposis adenomatosa (PA), objeto de estudio de esta tesis doctoral, se define como aquella condición en la que un individuo desarrolla múltiples pólipos adenomatosos (adenomas) a lo largo del colon y/o recto.

Aunque la mayoría de los pólipos no progresa a cáncer, más del 80-90% de los tumores de colon y recto proceden de un adenoma previo. Los adenomas son proliferaciones en un principio benignas que pueden malignizarse en un 5% de los casos y transformarse en adenocarcinomas (Strum, 2016). Son lesiones precursoras del CCR y, por lo tanto, los individuos que presentan PA tienen un riesgo acumulado de padecer CCR a lo largo de su vida que oscila entre el 40 % y el 100 % según la gravedad de la poliposis.

Los adenomas se pueden clasificar según su arquitectura en tubulares, tubulovelloso y vellosos. Esta clasificación se basa en el porcentaje de componente vellosos, el cual se define como proyecciones digitiformes de epitelio que son por lo menos dos veces más altas que el grosor de la mucosa normal (Myers & Arora, 2022).

- Los adenomas tubulares presentan una arquitectura con menos del 25% de componente vellosos.

- Los adenomas tubulovelloso muestran una arquitectura entre el 25 y 75% de componente veloso.
- Los adenomas vellosos ostentan una arquitectura con más del 75% de componente veloso.

Independientemente de su arquitectura, los adenomas pueden presentar distintos grados de displasia. Clásicamente, se distinguía entre displasia leve, moderada y severa; actualmente se diferencia únicamente entre displasia de alto y bajo grado: en la displasia de alto grado se incluye a la displasia severa y adenocarcinoma in situ, y en la displasia de bajo grado a la displasia leve y moderada. Esta diferenciación se realiza siguiendo los criterios histológicos mostrados en la Tabla 1.

GRADOS DE DISPLASIA		
Bajo grado	Atipia citológica	Núcleos alargados hipercromáticos y pseudoestratificados, disminución o ausencia de mucina.
	Atipia arquitectural	Criptas aglomeradas de disposición tubular o vellosa.
Alto grado	Atipia citológica	Núcleos más redondos y nucleolo prominente, pérdida total de la polaridad, aumento considerable de apoptosis, mitosis atípicas, mayor pseudoestratificación.
	Atipia arquitectural	Criptas aglomeradas en formas cribiformes, tortuosas, ramificadas, asimétricas y sin estroma interpuesto entre ellas.

Tabla 1. Criterios histológicos para distinguir los grados de displasia de adenomas colorrectales.

Los factores que condicionan el riesgo de progresión a cáncer son el número de lesiones, el tamaño de estas (mayor cuando la lesión supera 1cm de diámetro) y la presencia de componente veloso y displasia de alto grado (ambas son características microscópicas evaluadas por el patólogo) (Myers & Arora, 2022).

Clínicamente, las PA suelen clasificarse según la carga de adenomas en dos grandes grupos: clásicas y atenuadas.

3.1.1. Poliposis adenomatosa clásica (PAC)

Las formas clásicas se caracterizan por la detección de cientos o miles de adenomas, y tienen una prevalencia muy baja en la población (1/10000) (Vasen et al., 2008). La PAC muestra fenotipos agresivos, generalmente desencadenados durante la segunda década de la vida, y con un riesgo del 100% a desarrollar cáncer si no se extirpan los adenomas. Las

manifestaciones extracolónicas son frecuentes y la mayoría de los casos muestran un patrón de herencia dominante (Lucci-Cordisco et al., 2013). La probabilidad de detectar una alteración genética responsable del fenotipo es mucho mayor en las formas clásicas de la enfermedad, y son debidos, en su vasta mayoría, a alteraciones truncantes en el gen supresor de tumores *APC*. Con menor frecuencia, se han descrito alteraciones germinales bialélicas en el gen *MUTYH*, con patrones de herencia recesivos.

3.1.2. Poliposis adenomatosas atenuadas (PAA)

Las formas atenuadas son un grupo mucho más heterogéneo en cuanto a la gravedad de la poliposis y los antecedentes familiares y son más frecuentes en la población adulta que las PAC (Mongin et al., 2012; de Leon et al., 2017). La carga de adenomas es más baja, con un rango de 10 a 100 adenomas. En ocasiones resulta difícil discriminar entre formas atenuadas y clásicas en pacientes con recuentos de adenomas cercanos a 100, que podríamos distinguirlas como poliposis moderadas (51-100 adenomas). Lo mismo ocurre en pacientes con oligopoliposis (<10 adenomas) y PAA con baja carga de adenomas.

La edad de diagnóstico de la PAA es significativamente más alta que la PAC. El riesgo de cáncer también es menor y más tardío, oscilando entre el 40% y el 80% según la carga de adenomas y, con frecuencia, no hay antecedentes familiares de poliposis. A veces, se acompaña de otros tipos de pólipos, como los pólipos hiperplásicos o serrados (Jasperson et al., 2010).

Hasta hace poco, *APC* y *MUTYH* eran los únicos genes de predisposición primaria a la PAA conocidos. A pesar de que ambos genes explican la gran mayoría de PAC, juntos solo pueden explicar entre el 10% y el 20% de PAA (Grover et al., 2012).

Recientemente, se han descrito nuevos genes de predisposición primaria a la PAA, en gran parte, gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación masiva (NGS: del inglés, *Next Generation Sequencing*) que han permitido el estudio individual de familias. Actualmente hay tres nuevos genes suficientemente validados e integrados en la clínica (*POLE*, *POLD1*, *NTHL1*) y cuatro más que han sido descritos, pero aún no hay evidencias suficientes que confirmen su asociación (*AXIN2*, *MSH3*, *MLH3* y *GALNT12*) (Adam et al., 2016a; Guda et al., 2009; Olkinuora et al., 2019; Palles et al., 2013; Rivera et al., 2014; Weren et al., 2015) (Figura 9).

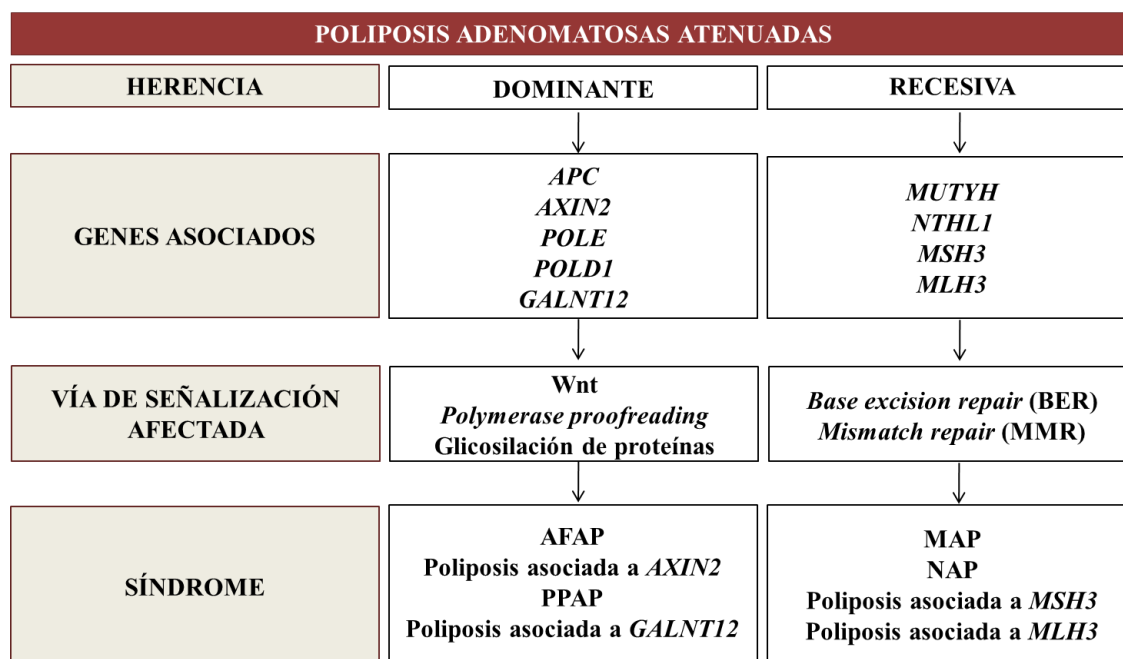


Figura 9. Poliposis adenomatosas atenuadas agrupadas en función de su patrón de herencia. Se indican los genes asociados a dichos síndromes junto a la vía de señalización que está alterada. Imagen adaptada de (Valle et al., 2019). AFAP=Poliposis adenomatosa familiar atenuada, PPAP=Poliposis asociada a la región exonucleasa de las polimerasas, MAP=Poliposis asociada a *MUTYH*, NAP=Poliposis asociada a *NTHL1*.

3.2. POLIPOSIS HAMARTOMATOSAS

Las poliposis hamartomatosas representan un grupo muy poco frecuente de síndromes hereditarios con predisposición al CCR y a otros tumores. Es importante destacar el síndrome de Cowden, que forma parte del grupo de síndromes tumorales hamartomatosos asociados a *PTEN* (PHTS), junto al síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, el síndrome de Proteus y Proteus-like. También se incluyen en el grupo de poliposis hamartomatosas al Síndrome de Peutz-Jeghers y el síndrome de poliposis juvenil.

3.2.1. Síndromes tumorales hamartomatosos asociados a *PTEN*

Grupo de síndromes de poliposis hamartomatosas causados por alteraciones heterocigotas en el gen *PTEN* (MIM:601728). Se incluyen el síndrome de Cowden, síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba y el síndrome de Proteus.

El síndrome de Cowden se caracteriza por el desarrollo de múltiples pólipos de tipo hamartoma, lesiones cutáneas y riesgo incrementado de tumores de mama, tiroides, endometrio, riñón, melanoma y colorrectal, siendo el riesgo acumulado de por vida de cualquier tipo de cáncer del 89%, y en concreto para el CCR del 9-16% (Heald et al.,

2010) (Pilarski et al., 2013). Los individuos afectados de este síndrome pueden desarrollar pólipos muy heterogéneos, tanto por el número de lesiones como por su histología, pudiendo coexistir hamartomas, pólipos juveniles, ganglioneuromas, adenomas y pólipos inflamatorios. Se han detectado pólipos adenomatosos en el 30% de los individuos afectados (Levi et al., 2011). La mayoría de los pacientes suelen presentar lesiones mucocutáneas como lipomas subcutáneos, queratosis acra o palmoplantar y papilomas orales, y también es frecuente la presencia de malformaciones craneales, como la macrocefalia o dolicocefalia. Un menor número de pacientes puede presentar también lesiones estructurales de tiroides (como adenomas o incluso cáncer de tiroides) (Adán Merino et al., 2018).

En los síndromes de Bannayan-Riley-Ruvalcaba y Proteus las manifestaciones clínicas se ponen de manifiesto durante la etapa infantil, a diferencia de lo que ocurre en el síndrome de Cowden (Macken et al., 2019).

3.2.2. Síndrome de Peutz-Jeghers

Es un síndrome hereditario autosómico dominante asociado, en la mayoría de los casos, a variantes en el gen *STK11* (MIM:602216), también conocido como *LKB1* (Hemminki et al., 1998). Se caracteriza por la presencia de pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal, además de una hiperpigmentación cutáneo-mucosa alrededor de labios, mucosa labial y dedos, y un riesgo elevado de cáncer de colon (39%), páncreas, estómago, mama, ovario y testículo (Giardiello et al., 2000) (Giardiello & Trimbath, 2006). De la misma forma que otros síndromes hamartomatosos, se han descrito grandes áreas de transformación adenomatosa e incluso pólipos adenomatosos, lo que demuestra el solapamiento frecuente entre síndromes polipósicos (McGarrity et al., 2000).

3.2.3. Síndrome de poliposis juvenil

Es una enfermedad hereditaria autosómica dominante caracterizada por la presencia de múltiples pólipos juveniles a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (colon y recto, estómago e intestino delgado) (Schreibman et al., 2005). Los pólipos juveniles, tradicionalmente considerados pólipos hamartomatosos no neoplásicos, pueden presentar en ocasiones focos de displasia (Archanioti P et al., 2019). Suelen aparecer en la primera década de la vida y los primeros síntomas suelen debutar dentro de las dos primeras décadas (edad media de diagnóstico de 18,5 años). Los pacientes con dicho síndrome tienen un riesgo incrementado de CCR que oscila entre el 38 y el 68%, debido al

componente adenomatoso presente en los pólipos juveniles (Schreibman et al., 2005), además de otros tumores gástricos o duodenales.

Este síndrome se ha asociado con alteraciones en genes de la vía BMP, como *SMAD4* (MIM:600993) o *BMPRIA* (MIM:601299), y en menor grado en los genes *ENG* (MIM:131195) y *BMP4* (MIM:112262) (Howe et al., 1998, 2001, 2007; Lubbe et al., 2011).

3.3. POLIPOSIS SERRADAS

El síndrome de poliposis serrada se caracteriza por la tendencia al desarrollo de pólipos hiperplásicos, pólipos serrados sésiles y pólipos serrados tradicionales múltiples o de gran tamaño. Constituyen un grupo heterogéneo con gran potencial de transformación a CCR a través de la vía serrada de carcinogénesis (Rex et al., 2012; Boparai et al., 2010; Hyman et al., 2004; Moreira et al., 2013). Las alteraciones moleculares propias de esta vía serrada incluyen: la activación de la vía de señalización de las MAPK (mutación somática en *BRAF* y *KRAS*), el silenciamiento epigenético de genes a través de la hipermetilación de sus regiones promotoras (CIMP) y la adquisición del fenotipo MSI, secundaria principalmente a la metilación del promotor del gen *MLH1* (Carballal et al., 2012).

Actualmente se desconoce su etiología, aunque se han descrito tanto características que sugieren una predisposición genética (alteraciones en el gen *RNF43*) (Quintana et al., 2018) como factores ambientales (principalmente el tabaco) (IJspeert et al., 2017). Por ello, la hipótesis más aceptada es que el síndrome de poliposis serrada es una enfermedad con una etiología compleja en la que interaccionan la genética y el ambiente.

3.4. POLIPOSIS MIXTAS

El síndrome de poliposis mixta hereditaria se caracteriza por la presencia de múltiples pólipos de distintos subtipos histológicos y un mayor riesgo de CCR (Whitelaw et al., 1997). Está causado por grandes duplicaciones en la región reguladora 5' de *GREM1* (MIM:603054), que conlleva un aumento de la expresión de la proteína (Jaeger et al., 2012). En ocasiones esta duplicación abarca el extremo 3' del gen *SCG5* (MIM:173120) y una región *upstream* del locus *GREM1* (Plesec et al., 2017). *GREM1* es un antagonista de la proteína morfogénica de hueso (*bmp*), por lo que su sobreexpresión puede conducir a la inactivación de la vía BMP y con ello a la hiperproliferación del epitelio colónico (Jaeger et al., 2008).

4. GENES DE PREDISPOSICIÓN A LA PA

La PA, puede ser causa de la alteración en un gen de predisposición primaria a la PA, como *APC*, *MUTYH*, *POLD1*, *POLE*, *NTHL1*, *MSH3*, *MLH3*, *AXIN2* y *GALNT12*, o puede originarse como una manifestación secundaria de un síndrome polipósico no adenomatoso o HNPCC (*PTEN*, *STK11*, *SCG5*, *ENG*, *BMP4*, *BMPR1A*, *SMAD4*, *GREM1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*). Todos estos genes se pueden englobar en dos grandes grupos según su función biológica: genes supresores de tumor y genes reparadores de ADN (Figura 10 y 11). Los mecanismos moleculares que conllevan la formación de adenomas en ambos grupos son distintos:

- Los genes supresores de tumor que se han visto implicados en la PA participan en la regulación de vías de señalización importantes para la homeostasis y proliferación del epitelio colónico como son la vía Wnt, BMP/BMPR1A, PI3K/PTEN y Notch. Alteraciones en estos genes van a producir la desregulación de estas vías y por tanto una hiperproliferación del epitelio colónico dando lugar al desarrollo de adenomas u otros pólipos.
- Por otro lado, las alteraciones en los genes reparadores de ADN dan lugar a un aumento en la tasa de alteraciones genéticas que puede afectar a genes supresores de tumor u oncogenes implicados también en el proceso de carcinogénesis colorrectal.

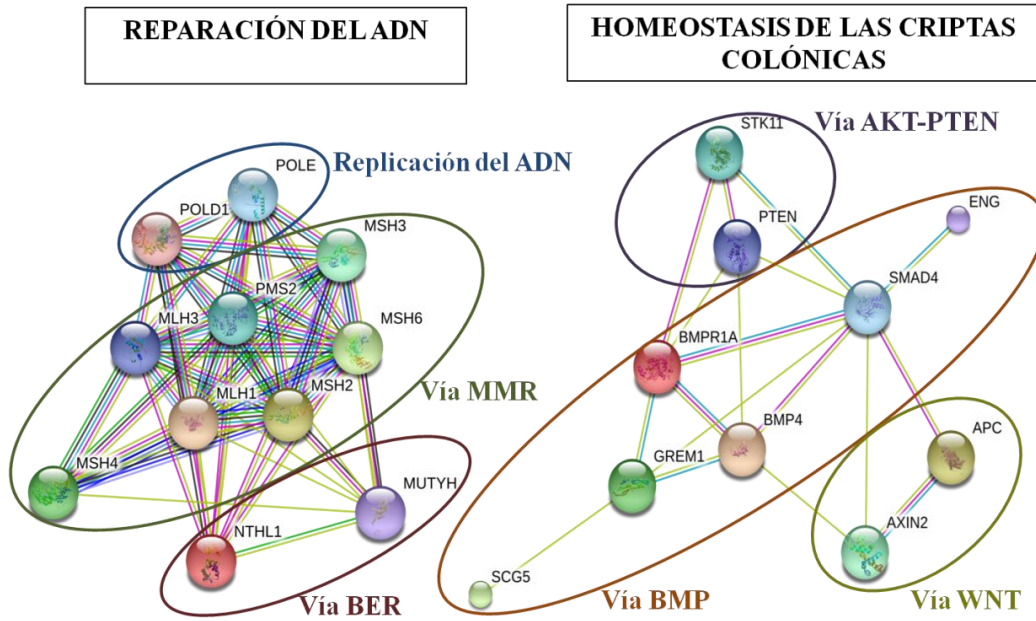


Figura 10. Interactoma de los genes asociados con el desarrollo de adenomas. Aparecen divididos en dos grupos: los genes reparadores del ADN y los que intervienen en la homeostasis de las criptas colónicas; y se agrupan en función de la vía de señalización en la que participan. Figura obtenida de STRING database (Szklarczyk et al., 2019).

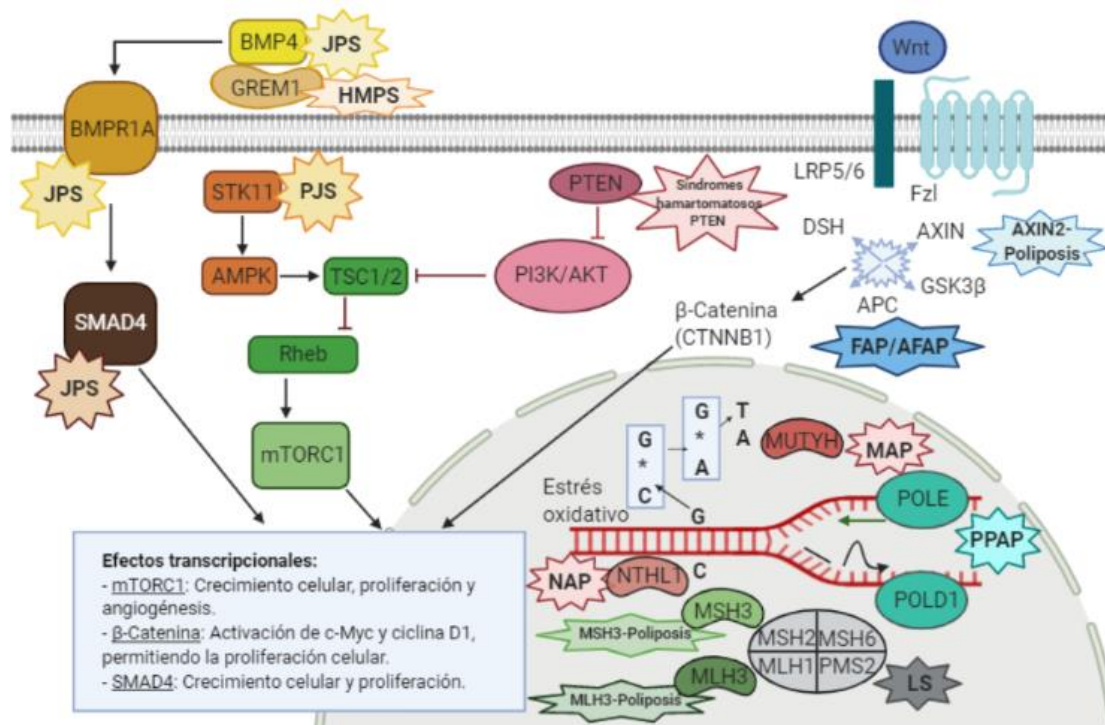


Figura 11. Diagrama que ilustra las relaciones entre los genes, vías de señalización implicadas y síndromes hereditarios de CCR. JPS: Síndrome de Poliposis Juvenil, HMPS: Síndrome de poliposis mixta hereditaria, PJS: Síndrome de Peutz-Jeghers, FAP: Poliposis adenomatosa familiar, AFAP: Poliposis adenomatosa familiar atenuada, MAP: Poliposis asociada a *MUTYH*, PPAP: Poliposis asociada a la región exonucleasa de las polimerasas, MSH3-Poliposis: Poliposis asociada a *MSH3*, MLH3-Poliposis: Poliposis asociada a *MLH3*, LS: Síndrome de Lynch, AXIN2-Poliposis: Poliposis asociada a *AXIN2*. Diseñada con BioRender.com.

4.1. APC (Regulador de la vía de señalización WNT)

APC (MIM:611731) es un gen supresor de tumores implicado en la carcinogénesis colorrectal. Una mutación somática en dicho gen es el primer evento en el modelo canónico de carcinogénesis colorrectal, que tiene lugar en más del 80% de los tumores colorrectales (Fearon & Vogelstein, 1990).

Codifica para una proteína multifuncional que está involucrada en la transmisión de señales, adhesión y migración celular, en el ensamblaje de los microtúbulos y en la segregación de los cromosomas (Hankey et al., 2018). Su principal función en el epitelio colónico es la regulación negativa de los niveles intracelulares de beta-catenina, principal efector de la vía Wnt, implicada en la homeostasis de las criptas colónicas. La inactivación de *APC* supone un incremento de los niveles de beta-catenina, lo que conlleva la activación constitutiva de la vía y la expresión de los diferentes genes diana implicados en proliferación, diferenciación, migración y apoptosis (Figura 12) (Fodde, 2002).

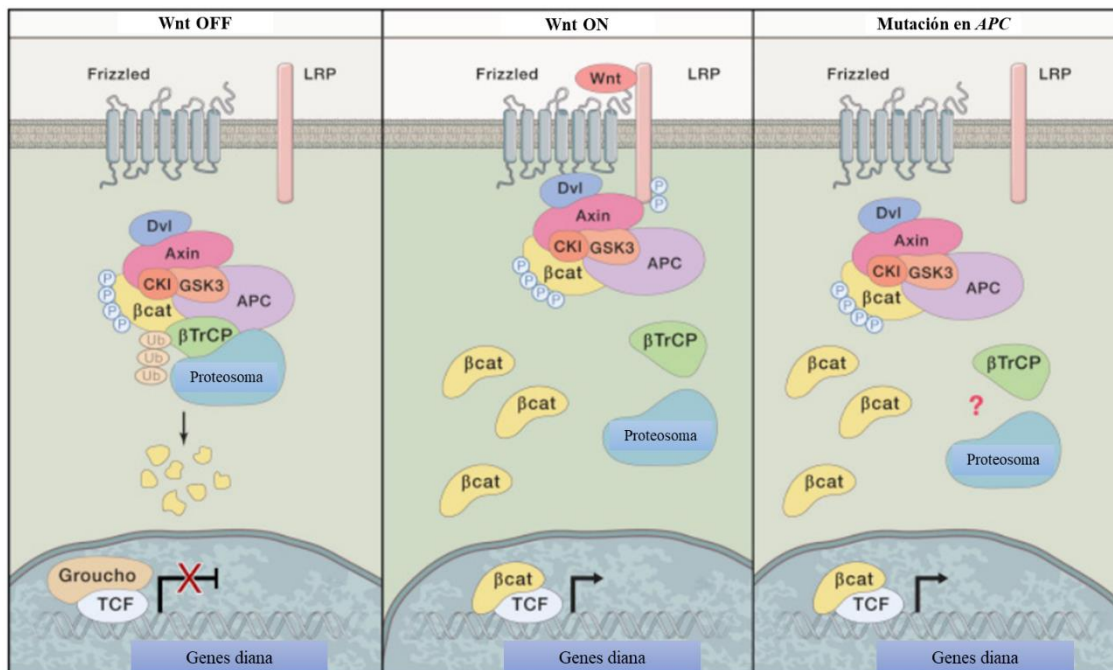


Figura 12. Esquema de la vía de señalización Wnt. En ausencia de señal, un complejo formado principalmente por APC, GSK3 β , CK1 y axina permite la fosforilación de β -catenina por GSK3 que conlleva su ubiquitinización y degradación. En presencia de señal, β -catenina no se fosforila, entra en el núcleo y activa la expresión de genes implicados en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Cuando APC está alterado, β -catenina escapa a la degradación en ausencia de señal y por lo tanto permanece constitutivamente activa.

APC se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 (5q21) y está formado por 15 exones, que codifican una proteína de 2843 aminoácidos (Grodén et al., 1991). La mayoría de las mutaciones somáticas se localizan en una región concreta del gen, denominada *Mutation Cluster Region* (MCR), entre los aminoácidos 1286 y 1513, que coincide con la región de unión a la beta-catenina (Miyoshi et al., 1992).

Alteraciones genéticas inactivantes y en heterocigosis a nivel germinal se han asociado con la predisposición a la PA, de una manera dependiente de la localización en el gen (Nagase et al., 1992). La mayoría de las alteraciones germinales patogénicas son truncantes y se localizan entre los codones 168 y 1580, dando lugar a péptidos aberrantes que ejercen un efecto dominante negativo sobre la proteína *wild type* (Dihlmann et al., 1999; Sieber et al., 2006). Estas alteraciones se han asociado con las formas clásicas de la enfermedad, la cual recibe el nombre de poliposis adenomatosa familiar (FAP). Un fenotipo profuso (miles de pólipos) se asocia con variantes en los codones 1250 a 1464 y un fenotipo intermedio (100–1000 pólipos) está vinculado al resto de la región (Figura 13) (Nieuwenhuis & Vasen, 2007). Las estimaciones de la prevalencia de FAP varían de 1:333 a 1:43.478 nacidos vivos, y el riesgo de CCR se estima en el 90-100% en individuos no tratados.

Alteraciones localizadas en los extremos 5' y 3' del transcrito, y alteraciones de *splicing* que conllevan una pérdida parcial del exón 9 se han asociado con formas atenuadas de la enfermedad, síndrome que recibe el nombre de poliposis adenomatosa familiar atenuada (AFAP). Es probable que AFAP esté infradiagnosticada dada la menor cantidad de pólipos y el menor riesgo de CCR en comparación con la FAP; se estima un riesgo al CCR cercano al 70% a los 80 años.

Se ha visto que las alteraciones truncantes en el extremo 3' dan lugar a proteínas estables con una cierta capacidad para mediar la regulación de los niveles de beta-catenina (Dihlmann et al., 1999) mientras que variantes en el extremo 5', anteriores al codón 157 producen proteínas funcionales mediante el uso de un codón alternativo de inicio de la traducción (codón 184) (Heppner Goss et al., 2002; Sieber et al., 2006). Este inicio alternativo de la traducción es relativamente ineficiente, dando lugar a un fenotipo haploinsuficiente en lugar de un fenotipo dominante negativo, y por lo tanto a un fenotipo atenuado de poliposis. Por otro lado, variantes en el donador de *splicing* del intrón 9

conducen a la pérdida parcial del exón generando algunos transcritos normales y, por lo tanto, una forma atenuada de la enfermedad (Varesco et al., 1994).

La mayoría de los pacientes con FAP (más del 70%) desarrollan manifestaciones extracolónicas, que incluyen tumores desmoides, osteomas, anomalías dentales, hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina (CHRPE), lipomas, quistes epidermoides y pólipos gastrointestinales superiores (Ficari et al., 2000). La CHRPE parece estar restringida a alteraciones en los codones 311-1444 (Caspari et al., 1995) y los tumores desmoides generalmente están relacionados con alteraciones posteriores al codón 1444 (Moisio et al., 2002) (Figura 13).

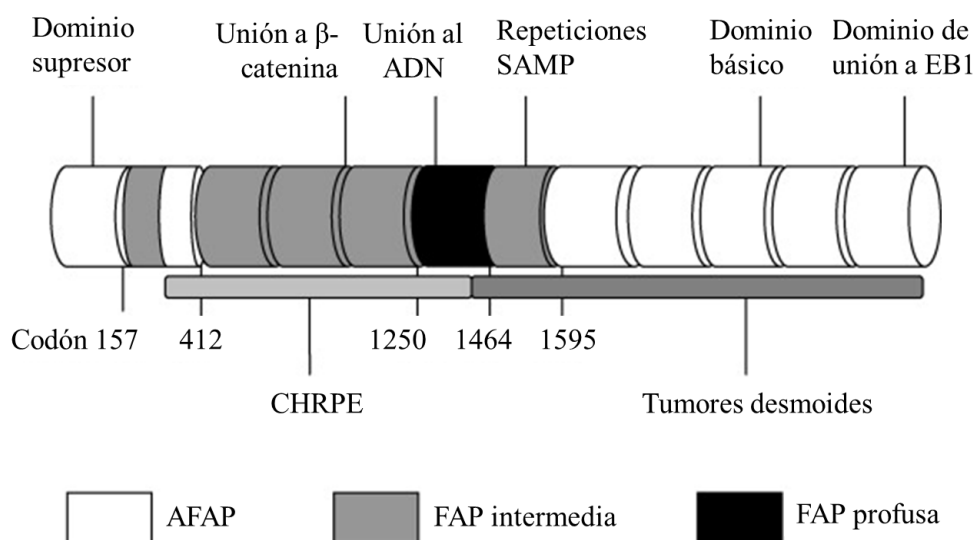


Figura 13. Correlaciones genotipo-fenotipo y manifestaciones extracolónicas en pacientes FAP y AFAP. Adaptada de (Nieuwenhuis & Vasen, 2007).

Tanto FAP como AFAP muestran patrones de herencia autosómica dominante. Sin embargo, hay algunas excepciones sin antecedentes familiares. Se han descrito alteraciones de *novo* en el 10-25% de los portadores de *APC* (Aretz et al., 2004; Rustin et al., 1990), y estudios recientes sugieren tasas de mosaicismo de *APC* en el epitelio colónico en el 20-50% de los casos no explicados de PA sin historia familiar (A. M. L. Jansen et al., 2017; Spier et al., 2016). A pesar de que las alteraciones de *novo* se han observado tanto en casos de FAP como de AFAP, cabe destacar que los portadores de un mosaico en *APC* presentan una forma atenuada de la enfermedad, probablemente debido a la distribución no ubicua del alelo mutado (Spier et al., 2016).

4.2. MUTYH

MUTYH (MIM:604933) es un gen implicado en la vía de reparación por escisión de bases o vía BER (del inglés, *Base Excision Repair*), que codifica una glicosilasa capaz de reconocer y escindir las desoxiadenosinas mal apareadas con las 8-hidroxi-2'-desoxiguanosinas (8-OHdG) en la molécula del ADN (Slupska et al., 1996). La 8-OHdG se produce como consecuencia de la oxidación de la desoxiguanosina, su capacidad mutagénica radica en su misma afinidad de unión por la desoxicitosina que por la desoxiadenosina, produciendo un incremento de transversiones G>T (Figura 14) (Shibutani et al., 1991) que puede afectar a genes *driver* como *KRAS* y *APC* (Lipton et al., 2003).

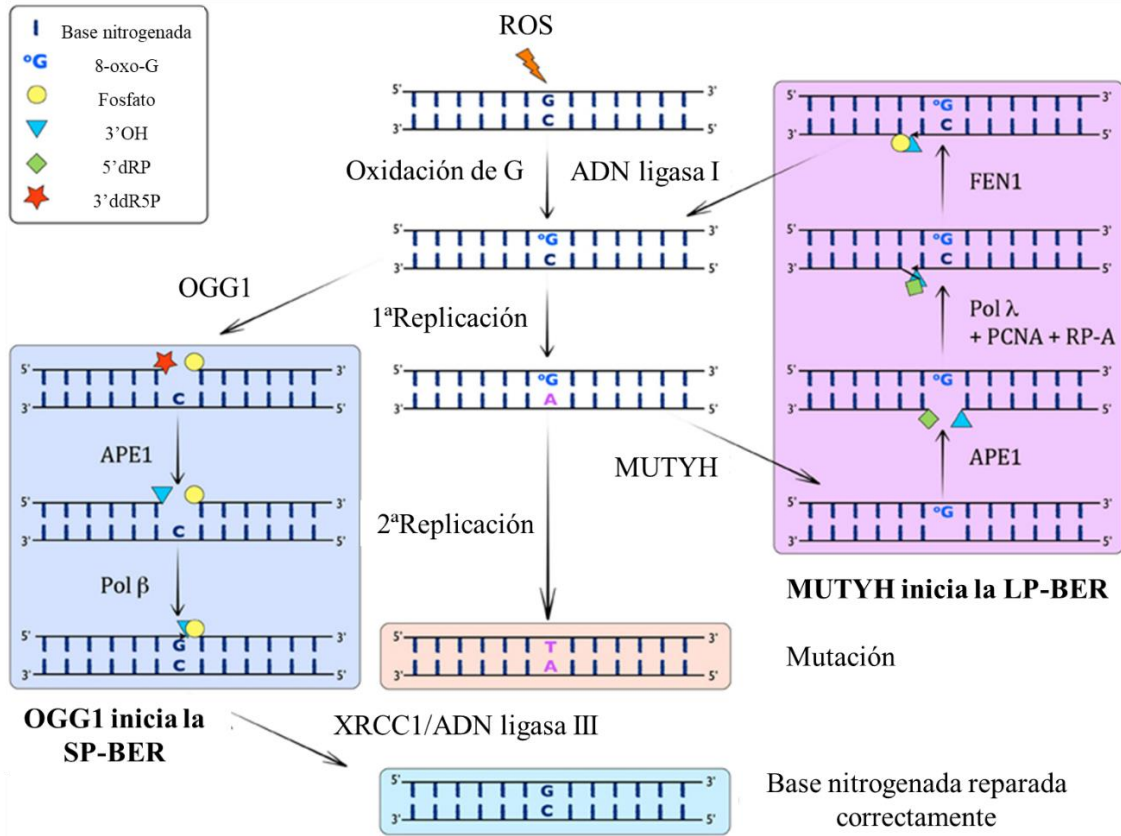


Figura 14. Esquema de la vía BER. Se muestra la vía corta (SP-BER: del inglés, *short pathway-base excision repair*) iniciada por OGG1 y la vía larga (LP-BER: del inglés, *long pathway-base excision repair*) por MUTYH. OGG1 corrige los emparejamientos 8-OHdG-C, mientras que la glicosilasa MUTYH reconoce los apareamientos de 8-OHdG con A y elimina la A dejando un sitio abásico que puede volver a emparejarse. Imagen adaptada de (Markkanen et al., 2013).

MUTYH se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p34.1) y está formado por 16 exones que dan lugar a dos transcritos mayoritarios, los cuales codifican dos proteínas de 546 y 535 aminoácidos.

Alteraciones germinales bialélicas inactivantes en este gen se han asociado con una predisposición a la PA que sigue un patrón de herencia recesivo, por lo que no hay transmisión vertical del riesgo y los antecedentes familiares están ausentes o se presentan horizontalmente (entre hermanos) (Sampson et al., 2003).

Este síndrome, conocido como MAP (del inglés, *MUTYH associated polyposis*) se caracteriza por la presencia de un número de adenomas generalmente comprendido entre 10 y 100 a lo largo del colon y/o recto. Se estima una prevalencia de portadores bialélicos en *MUTYH* de 1:40 000-1:10 000 y un riesgo de CCR del 43 al 100%. Clínicamente se asemeja a la AFAP pero en algunos casos puede ir acompañado de la presencia de pólipos hiperplásicos o serrados, asociándose a la poliposis serrada (Boparai et al., 2008). Un pequeño porcentaje de pacientes con MAP presentan formas clásicas de la enfermedad, presentando más de 100 adenomas. Al contrario que para el gen *APC*, no se ha observado una relación entre la localización de la variante en el gen y el fenotipo de la enfermedad. Se han descrito variantes patogénicas a lo largo de todo el gen. En población caucásica se han descrito dos variantes recurrentes, NM_001128425: c.1187G>A p.(Gly396Asp) y c.536A>G p.(Tyr179Cys), las cuales representan más del 80% de las variantes detectadas en pacientes con MAP (Poulsen & Bisgaard, 2008), así como también se han descrito otras variantes recurrentes en distintas poblaciones (Tabla 2).

Variantes recurrentes en <i>MUTYH</i>	Población	Referencia
NM_001128425: c.1187G>A; p.(Gly396Asp)	Caucásica	(Al-Tassan et al., 2002)
NM_001128425: c.536A>G; p.(Tyr179Cys)	Caucásica	(Al-Tassan et al., 2002)
NM_001128425: c.312C>A; p.(Tyr104*)	Pakistaní	(Jones et al., 2002)
NM_001128425: c.1438G>T; p.(Glu480*)	India	(Jones et al., 2002)
NM_001128425: c.1437_1439delGGA; p.(Glu480del)	Italiana	(Halford et al., 2003)
NM_001128425: c.1227_1228insGG; p.(Glu410Gly*43)	Española y portuguesa	(Venesio et al., 2004)

Tabla 2. Variantes patogénicas recurrentes en el gen *MUTYH*. Se detalla la nomenclatura de estas variantes, indicando la/s población/es en las que se han detectado.

4.3. *POLE* y *POLD1*

POLE (MIM:174762) y *POLD1* (MIM:174761) codifican las subunidades catalíticas (dominios exonucleasa) de los complejos enzimáticos de las polimerasas ϵ (Pol ϵ) y δ (Pol δ) respectivamente. Pol ϵ y Pol δ son las responsables de la replicación del ADN durante la fase S de la división celular, y también participan en distintas vías de reparación del ADN, como en la vía de reparación por escisión de nucleótidos NER (del inglés, *Nucleotide Excision Repair*), BER o la MMR (Preston et al., 2010).

Ambas polimerasas presentan dos dominios bien establecidos: un dominio polimerasa, responsable de la replicación del ADN propiamente dicha, y un dominio exonucleasa, capaz de reconocer y reparar los errores cometidos durante la replicación (Reha-Krantz, 2010). La actividad reparadora de estas polimerasas y la vía MMR son los principales mecanismos celulares responsables de reducir los errores durante la replicación del ADN (Henninger & Pursell, 2014).

POLE se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 (12q24.33) y presenta 49 exones que codifican una proteína de 2286 aminoácidos, con un dominio exonucleasa localizado entre los codones 268 y 471 (Kesti et al., 1993).

POLD1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.33) y consiste en 27 exones que codifican una proteína de 1133 aminoácidos, con un dominio exonucleasa comprendido entre los codones 304 y 517 (Yang et al., 1992).

Se han descrito alteraciones puntuales en el dominio exonucleasa de estas polimerasas en tumores humanos con una alta carga mutacional (Cancer Genome Atlas Network, 2012). En concreto, se han identificado mutaciones en el dominio exonucleasa de *POLE* en el 1-2% de CCR esporádicos y en el 7-12% de tumores de endometrio, además de observarse en tumores cerebrales, pancreáticos, de ovario, mama y estómago, todos ellos tumores ultramutados y generalmente estables (Church et al., 2015).

Alteraciones germinales inactivantes, pero no truncantes, localizadas en el dominio exonucleasa de *POLE* y *POLD1*, se han asociado con PAA, dando lugar a un síndrome con un patrón de herencia dominante, conocido como poliposis asociada a las regiones exonucleasas de las polimerasas (PPAP: del inglés, *proof-reading polymerase associated poliposis*). Estas variantes originan una inactivación del dominio exonucleasa, conservando la actividad del dominio polimerasa, lo que implica un desequilibrio entre

la función polimerasa y exonucleasa de la proteína. Al perder la actividad correctora de una de las polimerasas, aumenta la frecuencia de mutaciones durante la replicación del ADN, originándose una inestabilidad genética que podría afectar a genes supresores de tumor u oncogenes como *APC* y *KRAS*, respectivamente (Palles et al., 2013).

La PPAP se asocia no solo a una alta predisposición al desarrollo de múltiples adenomas, sino también a CCR temprano u otros tumores extracolónicos como tumores endometriales (Briggs & Tomlinson, 2013).

Desde la primera asociación de estos genes con la PAA, varios trabajos han validado esta asociación, detectando nuevas variantes patogénicas germinales en el dominio exonucleasa de ambas proteínas (Spier et al., 2015; Bellido et al., 2016; Esteban-Jurado et al., 2017; Rohlin et al., 2016; K. Wimmer et al., 2017; Hansen et al., 2015). Sin embargo, debido al reducido número de familias descritas hasta la fecha, su contribución y estimaciones de riesgo a la PAA no están aún bien definidas.

4.4. *NTHL1*

Al igual que *MUTYH*, *NTHL1* (MIM:602656) es un gen implicado en la vía BER. Dicho gen codifica para una N-glicosilasa bifuncional, que reconoce y elimina pirimidinas oxidadas, como la 2'-deoxi-5-hidroxicitidina (5-OHdC), y purinas de anillo abierto (Chan et al., 2009).

La 5-OHdC se produce como consecuencia de la oxidación de la deoxicitosina, y tiene la capacidad de aparearse con la deoxiadenina, por lo que la pérdida de función de dicha proteína supone un aumento en la tasa de transiciones C>T (Figura 15).

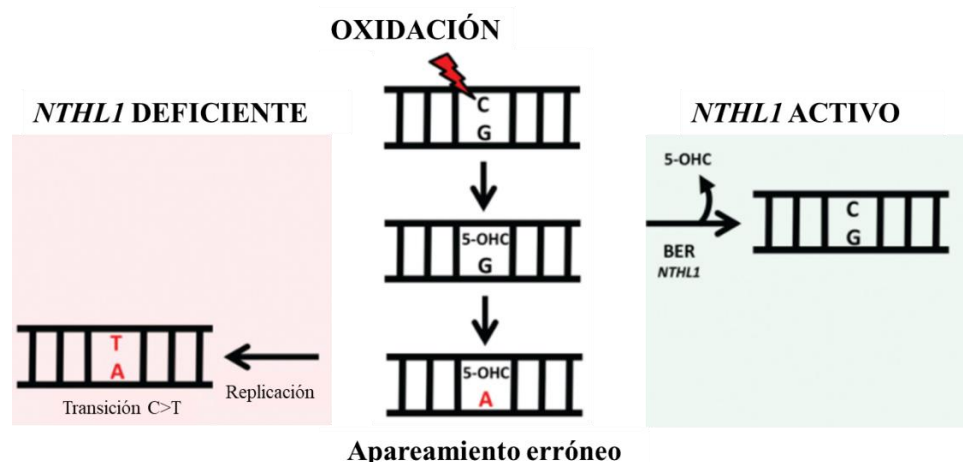


Figura 15. Papel de *NTHL1* en la vía BER. *NTHL1* detecta y elimina la 5-OHdC, la cual generaría un apareamiento erróneo por su afinidad con la desoxiadenina.

NTHL1 se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3) y consta de 6 exones que codifican una proteína de 312 aminoácidos (Imai et al., 1998). Se han descrito alteraciones inactivantes bialélicas o en homocigosis en pacientes con poliposis atenuadas, lo que se conoce como poliposis asociadas a *NTHL1* o NAP (del inglés, *NTHL1 associated polyposis*) (Weren et al., 2015). Todos los pacientes bialélicos descritos hasta ahora presentan PAA, y con frecuencia, otros tumores extracolónicos como tumores endometriales o de mama (Grolleman, de Voer, et al., 2019). Existe una variante *nonsense* recurrente en población holandesa, NM_002528: c.268C>T p.(Gln90*), y presente en la mayoría de los portadores bialélicos descritos hasta ahora (Belhadj et al., 2017; Chubb et al., 2016; Rivera et al., 2015).

Estimaciones teóricas del síndrome NAP sugieren una prevalencia de al menos cinco veces menor que la poliposis asociada a *MUTYH* (Weren et al., 2018). Sin embargo, el espectro fenotípico y la estimación de riesgo al cáncer no están aún bien establecidos para este síndrome.

4.5. *MSH3*

MSH3 (MIM:600887) es uno de los 6 genes de la vía MMR identificados hasta la fecha en células eucariotas (Kolodner & Marsischky, 1999). Dicho gen está implicado en la detección de errores de replicación en secuencias microsatélite junto a *MSH2* (MIM:609309) y *MSH6* (MIM:600678) (Burdova et al., 2015). *MSH2* dimeriza con *MSH6* o *MSH3* para ejercer su función. Los dímeros *MSH2-MSH6* reconocen los errores de replicación en microsatélites de uno o dos nucleótidos, mientras que los dímeros *MSH2-MSH3* reconocen los errores en microsatélites de cuatro o cinco nucleótidos (Figura 16) (Haugen et al., 2008).

El gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 (5q14.1) y está formado por 24 exones que codifican una proteína de 1137 aminoácidos. Se han descrito dos casos de variantes germinales inactivantes bialélicas que producen una alta inestabilidad de tetramicrosatélites (EMAST; del inglés *elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats*) en pacientes con PAA, sugiriendo un nuevo subtipo recesivo de poliposis adenomatosa colorrectal (Adam et al., 2016). En este último año se ha publicado un nuevo estudio que valida estos resultados, en el cual se describen 4 nuevos portadores de variantes heterocigotas bialélicas en una familia (rango de adenomas de 18 a 54 y edad

de diagnóstico de 46-59 años), y también se ha demostrado que sus tejidos adenomatosos/adenocarcinomatosos presentan EMAS (Aelvoet et al., 2022).

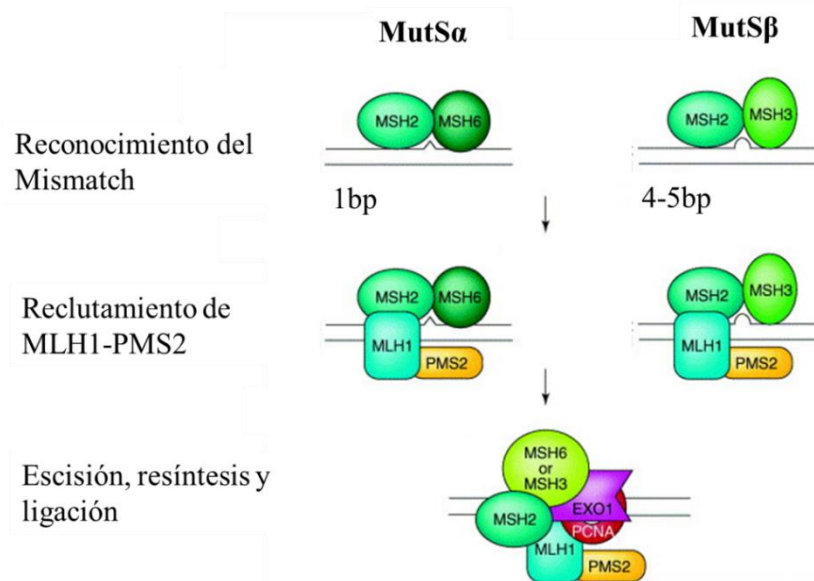


Figura 16. Representación esquemática de la vía de reparación MMR en células humanas. La vía canónica comienza por la unión del heterodímero MSH2/MSH6, MutS α , a un *Mismatch*. Tras la unión, MutS α recluta al heterodímero MLH1/PMS2 (MutL α). Este complejo puede translocar en cualquier dirección a lo largo de la hebra de ADN. Cuando se encuentra con una discontinuidad de hebra, la unión del PCNA y la exonucleasa EXO1 inician la degradación de la hebra. La mella es rellenada por la polimerasa replicativa δ y sellada por la ADN ligasa I. Los bucles más grandes se corrigen de manera similar mediante un proceso iniciado por MutS β (MSH2/MSH3). Imagen adaptada (Wei et al., 2002)

4.6. MLH3

MLH3 (MIM:604395) es un miembro de la familia homóloga de MutL implicada en la vía MMR (Kolodner & Marsischky, 1999). *MLH3* dimeriza con *MLH1* (MIM:120436) formando un complejo implicado en la formación de quiasmas durante la recombinación meiótica (T. F. Wang et al., 1999).

Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 14 (14q24.3) y consta de 13 exones que codifican una proteína de 1453 aminoácidos. Inicialmente, se detectó una variante truncante en homocigosis (S1188*) en un individuo de origen sueco con PAA (Rohlin et al., 2017a). En un segundo trabajo se detectaron 3 pacientes con PAA y portadores homocigotos de la variante S1188*, a la cual le atribuyeron un efecto fundador tras comprobar que compartían un haplotipo común (Olkinuora et al., 2019). En este último estudio vinculan la variante nonsense bialélica S1188* con una poliposis adenomatosa estable en microsatélites y que presenta inestabilidad cromosómica. La falta de MSI en los portadores de la variante es compatible con la menor contribución descrita para el

complejo MLH1-MLH3 en MMR, y les permite plantear la hipótesis de que las funciones relevantes que pueden fallar en los portadores serían la respuesta al daño en el ADN (defectuosa en ratones Mlh3 -/-)(Chen et al., 2005) o procesos relacionados con la recombinación (Jahid et al., 2017). Sin embargo, se necesitan más estudios en cohortes adicionales para validar estos resultados.

4.7. AXIN2

AXIN2 (MIM:604025) codifica para una proteína implicada en la vía de señalización Wnt, en concreto para una proteína estructural del complejo de degradación de la β -catenina que actúa como un regulador negativo de la vía (Dong et al., 2001). Se han descrito variantes germinales inactivantes en pacientes con CCR, que conllevan la falta de regulación y aumento de los niveles de β -catenina y, por tanto, la activación constitutiva de la vía de señalización de *beta-catenin/T-cell factor* favoreciendo la carcinogénesis colorrectal (W. Liu et al., 2000).

Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 17(17q24.1) y está compuesto de 11 exones que codifican para dos transcritos mayoritarios, generando proteínas de 843 y 778 aminoácidos (Dong et al., 2001).

Se han descrito variantes deletéreas a nivel germinal en cuatro familias, mostrando una fuerte asociación con neoplasias gastrointestinales, así como con la oligodoncia (Lammi et al., 2004; Marvin et al., 2011; Renkonen et al., 2005). Otros estudios han analizado este gen en diferentes poblaciones de CCR (polipósico y no polipósico). Peterlongo y col. analizaron una población de 82 individuos con CCR no polipósico y no detectaron ninguna variante patogénica/probablemente patogénica (Peterlongo et al., 2005). Por otro lado, Renkonen y col. analizaron una cohorte de 38 pacientes (procedentes de 29 familias con PA) y detectaron una alteración germinal (R656*) en un paciente con PAA (Renkonen et al., 2005). Posteriormente, se describió una alteración *missense* novel en una familia con PAA sin oligodoncia o displasia ectodérmica, proponiendo una variabilidad fenotípica en función del dominio proteico afectado (Rivera et al., 2014). Más recientemente, en este último año se han descrito 4 variantes truncantes germinales en 4 familias con CCR/poliposis (mediana de 12,5 pólipos adenomatosos, pero también serrados), mostrando también oligodoncia en dos de estas cuatro familias (J. M. Chan et al., 2022).

4.8. *GALNT12*

GALNT12 (MIM:610290) es un gen que codifica una hexosiltransferasa implicada en las etapas iniciales del proceso de O-glicosilación de mucinas (J.-M. Guo et al., 2002). Alteraciones en este proceso conllevan una glicosilación aberrante, lo que se ha asociado con el crecimiento celular, la diferenciación, transformación, adhesión, metástasis y evasión del sistema inmune en determinados tipos de cáncer (Brockhausen, 2006). *GALNT12* muestra unos niveles altos de expresión en el tracto digestivo, y se ha visto que estos niveles disminuyen en el carcinoma colorrectal (J. M. Guo et al., 2004).

El gen *GALNT12* se localiza en el brazo largo del cromosoma 9 (9q22.33) y está formado por 10 exones que codifican una proteína de 581 aminoácidos (J.-M. Guo et al., 2002). Se han descrito ciertas evidencias sobre la asociación del gen con CCR (Guda et al., 2009), sin embargo, su asociación con la PA es un hecho aún controvertido. Concretamente se ha descrito la variante NM_024642.4:c.907G>A, p.(Asp303Asn), que supone una inactivación parcial de la proteína en pacientes con CCR familiar y poliposis, sugiriendo un papel en la predisposición al CCR polipósico (Clarke et al., 2012).

4.9. PAA SECUNDARIAS A OTROS SÍNDROMES DE RIESGO AL CÁNCER

Aunque los fenotipos de muchos de los síndromes conocidos de riesgo al cáncer están bien definidos, existe un solapamiento entre síndromes que puede llevar a fenotipos confusos que dificultan el diagnóstico genético.

El **síndrome de Lynch**, principal síndrome HNPCC debido a alteraciones deletéreas en los genes MMR, puede verse acompañado de adenomas en edades tempranas (Jass et al., 1994). Normalmente, el número de adenomas no supera a 10, pero en algunos casos puede llegar a superarlos, confundiéndose clínicamente con una PAA.

El **síndrome de deficiencia constitucional MMR (CMMRD)** se debe a una inactivación a nivel germinal, por alteraciones bialélicas u homocigotas, en cualquiera de los principales genes de la vía MMR. Es un síndrome muy agresivo que sigue un patrón de herencia recesivo y presenta un espectro tumoral muy amplio a edades de diagnóstico tempranas, entre los que destacan los gliomas cerebrales (edad media de diagnóstico de 9,5 años), linfomas (5 años) y CCR (16 años), con un mal pronóstico (Abedalthagafi, 2018). Cerca del 36% de los sujetos afectados desarrollan adenomas colorrectales que varían desde unos pocos a cientos (Wimmer et al., 2014).

De la misma forma, los síndromes de **poliposis hamartomatosas, serradas o mixtas** pueden presentar fenotipos superpuestos con la PAA debido, por un lado, a la detección de pólipos adenomatosos en estos pacientes y, por otro, a la presencia de grandes áreas de transformación adenomatosa en pólipos no adenomatosos, hallazgo que tiene lugar principalmente en distintos síndromes hamartomatosos como los síndromes tumorales asociados a *PTEN*, el síndrome de Peutz-Jeghers y las poliposis juveniles (Whitelaw et al., 1997; Levi et al., 2011; McGarrity et al., 2000; Schreiber et al., 2005).

4.10. POLIPOSIS ADENOMATOSAS NO EXPLICADAS

El resto de PA no explicadas (PAX) conforma un grupo muy heterogéneo en términos de gravedad de la poliposis e historia familiar. Seguramente factores medioambientales, herencias poligénicas, fallos en la detección de alteraciones en los genes de susceptibilidad conocidos, fenómenos de mosaicismo y alteraciones germinales en otros genes contribuyan a explicar la susceptibilidad a la PA en estos pacientes (Carvajal-Carmona et al., 2013; Nieminen et al., 2016; Rohlin et al., 2011; Shirts et al., 2014).

4.10.1. Variantes en zonas promotoras y desequilibrio alélico (AI)

El gen *APC* tiene dos regiones promotoras, 1A y 1B (Rohlin et al., 2011), siendo el promotor 1A el que marca el inicio de la transcripción (Charames et al., 2008). Las variantes genéticas que se producen en estos promotores pueden conducir a una expresión génica reducida, por lo tanto, predisponen a la formación de adenomas colorrectales.

El desequilibrio alélico (IA) se refiere a una situación en la que los dos alelos de un gen se expresan en diferentes niveles en una célula determinada (Wagner et al., 2010). Puede ocurrir por la inactivación epigenética de uno de los alelos, o por variantes genéticas en las regiones reguladoras (Wagner et al., 2010). El IA puede implicar la inactivación completa de un alelo como, por ejemplo, en la impronta genética (Wagner et al., 2010).

4.10.2. Variantes intrónicas

Las variantes intrónicas profundas, pueden afectar al proceso de *splicing*. Este tipo de variantes no se suele detectar ya que solo las regiones consenso de *splicing*, adyacentes a los exones, son examinadas en los protocolos de diagnóstico genético de rutina.

En el año 2000 se publicó un trabajo que trataba de identificar nuevos reordenamientos intragénicos en *APC* en pacientes con un fenotipo clínico de FAP o AFAP. Estos estudios

detectaron cuatro variantes patogénicas en *APC* a nivel germinal, una de las cuales consistía en una deleción localizada completamente en el intrón 14 (Su et al., 2000).

En el año 2010, se identificó una deleción de 1,4 kb en el intrón 14 en una familia con AFAP. La amplificación por PCR del exón 13 al exón 15 del ADN complementario (ADNc) mostró que dicha alteración intrónica daba lugar a fenómenos de *splicing* anormales, perdiéndose con ello el exón 14. Esto causaba un cambio en la pauta de lectura y con ello un truncamiento de la proteína en el codón 673, generando una proteína que carecía de todos los dominios de unión a la β -catenina, a los microtúbulos y EB-1 (T. M. F. Tuohy et al., 2010).

En 2012, el análisis de transcritos en 125 pacientes PAX detectó que el 8% tenía un patrón de transcripción aberrante, lo que sugería la implicación de variantes intrónicas, y en el 80% de ellos se confirmaba una inserción en una región intrónica (Spier et al., 2012).

4.10.3. Variantes en regiones UTR

Las regiones UTR, en particular las 3'UTR, tienen múltiples funciones en la regulación post-transcripcional de la expresión génica, incluidos los efectos en el transporte del ARNm fuera del núcleo, la eficiencia de la traducción, la localización subcelular y la estabilidad del ARNm (Mignone et al., 2002). Además de los efectos intracelulares fisiológicos normales, cada vez hay más evidencia de que las variantes en regiones UTR pueden estar involucradas en enfermedades, por ejemplo, se ha descrito una variante somática en la región 5'UTR que reduce la eficiencia de traducción de *BRCA1* en un cáncer de mama esporádico altamente agresivo (Signori et al., 2001).

4.10.4. Mosaicismo genético

Un mosaico es un individuo que tiene al menos dos líneas celulares genéticamente diferentes a pesar de desarrollarse a partir de un solo cigoto. Las consecuencias moleculares y fenotípicas del mosaicismo dependen del momento del evento mutacional. Durante el desarrollo embrionario, las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo, dan lugar a todos los tejidos humanos. Las capas ectodérmica y endodérmica se diferencian a partir del día 8, y posteriormente las células germinales primordiales (CGP) surgen del ectodermo durante la segunda semana de la embriogénesis, dando lugar a la capa mesodérmica, que se diferencia alrededor del día 16 (T. M. Tuohy & Burt, 2008). En general, las alteraciones somáticas adquiridas en etapas

muy tempranas del desarrollo se propagan a través de más divisiones celulares, afectando así a una mayor proporción de células con distintos orígenes embrionarios que dan lugar a tejidos más diversos. Por el contrario, las alteraciones somáticas tardías en el desarrollo afectan a regiones más restringidas del cuerpo, lo que resulta en mosaicismo confinado a tejidos específicos (Thorpe et al., 2020).

Las variantes en mosaico pueden no detectarse con técnicas de diagnóstico molecular estándar, por ejemplo; si presentan una fracción alélica (FA) menor al límite de detección (LD) de la técnica diagnóstica empleada, o si solo están presentes en un tejido específico y por lo tanto no son detectables en la muestra biológica que se está analizando:

- Dependiendo de la FA de la alteración, es probable que no se detecte utilizando técnicas de diagnóstico actuales. Rohlin y col. evaluaron la sensibilidad de diferentes técnicas en la detección de mosaicos; analizaron la secuenciación de Sanger, el análisis de heteroduplex (HA), la prueba de truncamiento de proteínas (PTT), la cromatografía líquida de alto rendimiento (DHPLC) y la NGS, y mostraron que la NGS era la técnica más sensible permitiendo detectar variantes con FA tan bajas como el 1-4%, y que la secuenciación Sanger era el método menos sensible para detectar mosaicos no siendo posible identificar variantes con una FA menor del 20% (Rohlin et al., 2009).
- Por otro lado, las pruebas genéticas rutinarias generalmente se llevan a cabo en el ADN extraído de sangre periférica. Para algunos pacientes, una variante en mosaico puede estar sólo representada en un tejido determinado, como por ejemplo el colon, y no ser detectable mediante ninguna técnica llevada a cabo en el ADN extraído de sangre periférica (A. M. L. Jansen et al., 2017).

Se ha descrito que el mosaicismo somático en el gen *APC* puede ocurrir en el 10-20% de los casos de PAA sin historia familiar (Aretz et al., 2007; Hes et al., 2008; Rohlin et al., 2009). El momento en el que se produce una alteración en el gen *APC*, puede tener diferentes implicaciones en el fenotipo del paciente; si surge en una sola célula madre epitelial del colon, la única consecuencia serán los adenomas en el segmento del colon correspondiente (T. M. Tuohy & Burt, 2008). En el otro extremo, si la alteración ocurre al principio de la embriogénesis, se podría encontrar en las tres capas germinales. Esto resultaría en manifestaciones clínicas extracolónicas propias del síndrome, y en la posibilidad de transmitir la alteración a las generaciones futuras si es que el mosaico llega a afectar a las células germinales (T. M. Tuohy & Burt, 2008).

5. ACTUALIDAD EN EL CRIBADO ASISTENCIAL DE LA PA

5.1. Importancia del estudio genético

Aunque los síndromes hereditarios de poliposis solo suponen un 1% del total de casos de CCR, el conocimiento de la etiología de la poliposis y de los alelos de riesgo, permite la individualización del seguimiento y profilaxis de los portadores, así como la discriminación entre individuos de alto y bajo riesgo entre los miembros familiares. Todo esto conlleva a un seguimiento efectivo, una disminución del grado de ansiedad en los pacientes y familiares, y a una disminución del gasto sanitario.

En la actualidad, las PAA son uno de los grupos más problemáticos en las CCG. El número de pacientes a los que se les diagnostica PAA es cada vez mayor, en parte por la implantación de los programas de cribado colorrectal y en parte por la mejora de la sensibilidad en las técnicas de imagen. Esto se traduce en un aumento de la demanda de estudios genéticos para *APC* y *MUTYH* en el laboratorio asistencial. Debido a la alta heterogeneidad de las PAA, y la escasa contribución de *APC* y *MUTYH* en la explicación de los casos atenuados (10-20%), el número de pacientes con PAA no explicada (PAAX) se multiplica.

5.2. Recomendaciones clínicas de estudio genético en las PA

Hasta la fecha, no existe un consenso sobre los criterios clínicos que deben indicar la realización del estudio genético en pacientes con PA. Sin embargo, existen varias guías de práctica clínica que recomiendan un análisis genético similar:

- *Clinical Utility Gene Card (CUGC)* recomienda el análisis de los genes *APC* y *MUTYH* en pacientes con diagnóstico clínico de PA colorrectal atenuada o clásica (al menos 10 adenomas sincrónicos o 20 acumulados, independientemente de la edad). Además, en familias consistentes con un patrón de herencia autosómico recesivo, la detección de variantes en *MUTYH* debe realizarse preferiblemente antes del estudio de *APC* (Aretz et al., 2015).
- *American College Of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* propone estudiar el gen *APC* en pacientes con más de 10 adenomas, sincrónicos o metacrónicos, y un patrón de herencia dominante, o con más de 10 adenomas y manifestaciones extracolónicas típicas de FAP. Por otro lado, recomienda el estudio de *MUTYH* en pacientes con más de 10 adenomas y negativos para el gen *APC*, en pacientes

con un CCR antes de los 40 años y una historia familiar de CCR con patrón recesivo (Hegde et al., 2014).

- *American College of Gastroenterology (ACG)* recomienda el estudio de *APC* y *MUTYH* en pacientes con más de 10 adenomas acumulados, una historia familiar de síndrome de poliposis adenomatosa o en pacientes con adenomas y manifestaciones extracolónicas características de FAP, entre las que se incluyen los adenomas duodenales, tumores desmoides, cáncer papilar de tiroides, osteomas y quistes epidermoides, entre otros (Syngal et al., 2015).

5.3. Diagnóstico molecular de las PA en el Hospital Clínico San Carlos

En los inicios de esta tesis doctoral, en el Hospital Clínico San Carlos se llevaba a cabo el estudio tradicional de las PA siguiendo el siguiente algoritmo (Figura 17):

- En pacientes con más de 100 adenomas, con sospecha de FAP, se llevaba a cabo el estudio de variantes puntuales y grandes reordenamientos en *APC* completo.
 - o Si el paciente era portador de una variante patogénica/probablemente patogénica en este gen, se llevaba a cabo el cribado en familiares directos y un seguimiento exhaustivo en portadores.
 - o Si el resultado del estudio era no informativo, se llevaba a cabo el estudio de las 4 variantes patogénicas recurrentes en *MUTYH* descritas en población caucásica, y mencionadas en el apartado 4.2.
- En pacientes con un número de adenomas comprendido entre 10 y 100, un patrón de herencia recesiva y una sospecha de MAP se llevaba a cabo el estudio de las cuatro variantes patogénicas recurrentes en *MUTYH*.
 - o Si el paciente resultaba ser portador de variantes patogénicas bialélicas, se diagnosticaba al paciente como MAP y se llevaba a cabo el seguimiento de alto riesgo y cribado familiar.
 - o Si el paciente resultaba negativo o portador de una variante monoalélica, se llevaba a cabo un seguimiento de riesgo según la historia personal y familiar o se consideraba el estudio de *APC* en casos con poliposis moderadas (número de adenomas cercano a 100), ya que un 20% puede deberse a casos de novo.

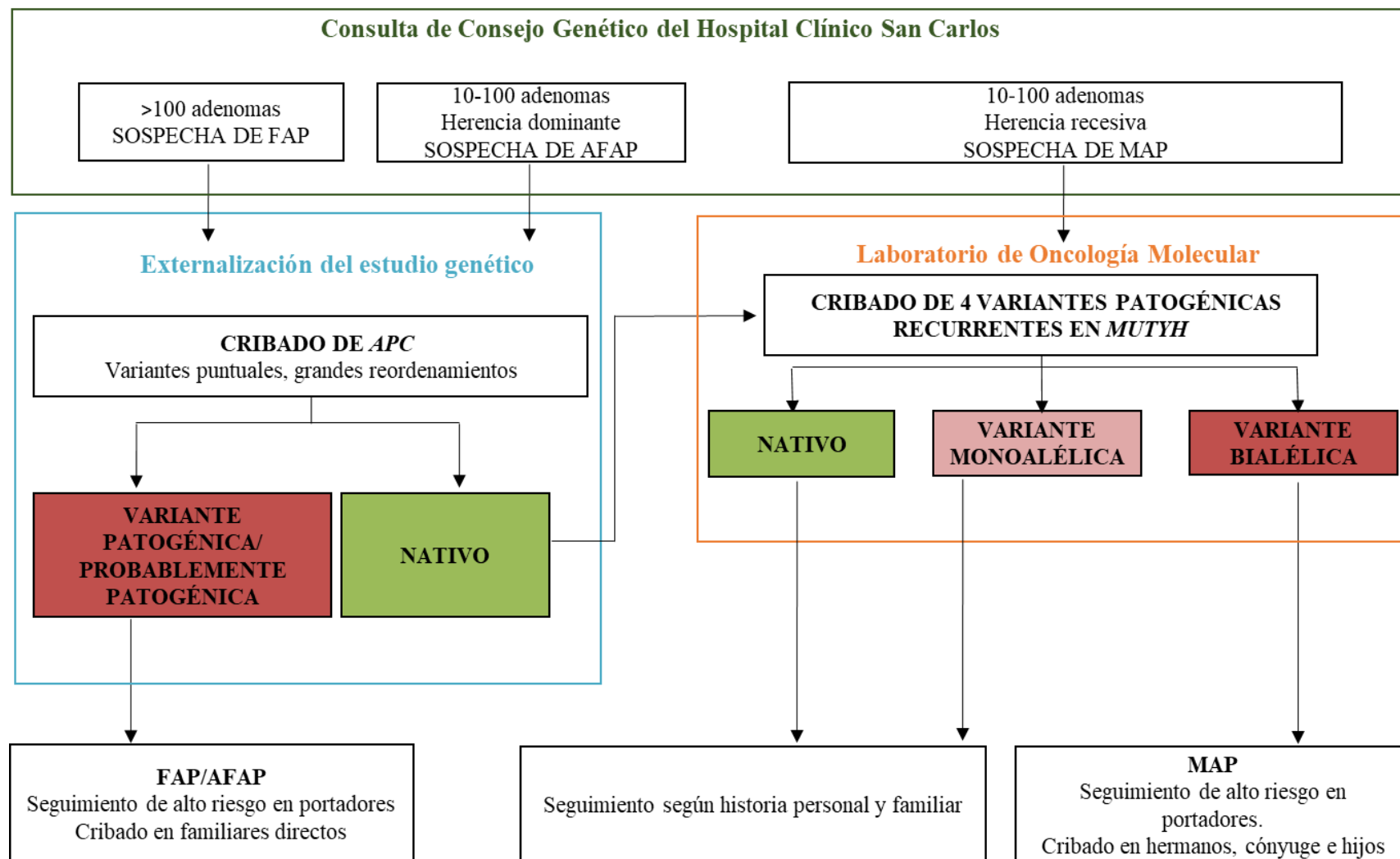


Figura 17. Algoritmo empleado en el diagnóstico molecular de las PA en el Hospital Clínico San Carlos hasta el año 2020.

6. SECUENCIACIÓN MASIVA Y SU APLICACIÓN PARA LA BÚSQUEDA DE VARIANTES GENÉTICAS

En esta última década se ha evolucionado desde la secuenciación capilar de un máximo de 96 secuencias de unos 800 nucleótidos (método Sanger), a la secuenciación de millones de fragmentos de ADN con equipos de segunda generación (Levy & Myers, 2016).

La NGS surgió junto con el desarrollo del proyecto genoma humano (2005-2010) con la necesidad de reducir el coste y el tiempo de la secuenciación genómica (Mardis, 2008). Básicamente, consiste en la secuenciación en paralelo de un gran número de secuencias de ADN diferentes en una sola carrera. Existen varios sistemas que se diferencian en la química de secuenciación que utilizan, lo que provoca diferencias en el tamaño de los fragmentos que son capaces de secuenciar, la cobertura que son capaces de alcanzar o el número de lecturas que pueden hacer en cada carrera (Ballester et al., 2016; L. Liu et al., 2012). Todos ellos tienen en común la preparación de librerías y la amplificación clonal.

Una librería es el conjunto de diferentes secuencias enriquecidas de ADN de uno o diferentes pacientes, debidamente identificadas, que queremos secuenciar en una única carrera. Existen distintos tipos de librerías según el método de enriquecimiento, y su elección dependerá del tamaño de la región a secuenciar (panel de genes, exoma o genoma completo) y de la procedencia del material inicial (ADN de sangre, parafina, tejido fresco, biopsia líquida, etc) (van Dijk et al., 2014; Ravi et al., 2018).

6.1. SECUENCIACIÓN DE EXOMA (WES) Y GENOMA COMPLETO (WGS)

WGS y WES son los dos enfoques principales de NGS para la búsqueda de nuevos genes implicados en enfermedades mendelianas (Petersen et al., 2017). WES cubre las regiones codificantes del genoma, por lo que se perdería cualquier defecto que afecte a las regiones reguladoras, como los promotores y los *enhancers*. Por el contrario, WGS además de la identificación de variantes de único nucleótido (SNVs) e indels, permite la identificación de variantes estructurales y variantes de número de copias (CNVs) tanto en regiones codificantes como no codificantes del genoma. Asimismo, WGS, al no requerir de un enriquecimiento, tiene una cobertura de secuencia más fiable y uniforme que WES, dado que las diferencias en la eficiencia de hibridación de las sondas de captura en el exoma

completo pueden dar como resultado regiones con poca o nula cobertura. Esta diferencia en la cobertura también hace que WGS sea una mejor opción para el análisis de CNVs (Yao et al., 2017).

Sin embargo, el hecho de que WES esté dirigido a regiones codificantes de proteínas implica que sus lecturas representan menos del 2% del genoma, reduciendo el coste de la secuenciación, de almacenamiento y análisis, haciendo factible aumentar el número de muestras secuenciadas y estudiar poblaciones más grandes (Petersen et al., 2017).

6.2. PANELES MULTIGÉNICOS

Los paneles multigénicos son la tercera opción de NGS para buscar variantes causales que expliquen potencialmente la herencia de las enfermedades mendelianas. Esta opción de secuenciación dirigida es la más adecuada para la práctica clínica en el diagnóstico de síndromes de cáncer hereditario, ofreciendo una mayor cobertura, uniformidad y análisis de CNVs, y disminuyendo la complejidad técnica y el coste (Jamuar & Tan, 2015).

Otra ventaja es la menor detección de VSDs, dado que, por lo general, los genes incluidos en paneles ya se han relacionado con la condición estudiada o están involucrados en vías relevantes. Esto elimina el desafío de lidiar con genes con funciones aún desconocidas o cuya asociación con la enfermedad es cuestionable. Por lo tanto, simplifica enormemente los pasos de filtrado y priorización, ahorrando mucho tiempo en el análisis de datos y permite una traslación más rápida a la clínica de los resultados obtenidos (Jamuar & Tan, 2015). Por esa razón, los paneles multigénicos son útiles para la validación y detección de variantes en genes candidatos previamente identificados por otros enfoques, y por ello, son la herramienta utilizada a lo largo de esta tesis doctoral.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El estudio genético rutinario de la PA en la mayoría de los hospitales se centra, principalmente, en los genes *APC* y *MUTYH*, los cuales tan solo explican entre un 10-20% de las PAA. Este grupo de pacientes se ha visto incrementado en las consultas de CCG en los últimos años, aumentando el volumen de estudio y el número de pacientes con resultados no informativos. La **hipótesis** de este trabajo es que una fracción importante de las PAA no explicadas en el entorno hospitalario puede ser causada por alteraciones en otros genes de susceptibilidad menos conocidos.

El **objetivo primario** de esta tesis doctoral es definir la susceptibilidad genética en los casos de PAA no explicada en nuestro entorno hospitalario contribuyendo así en la mejora de las medidas de detección, profilaxis y seguimiento.

Como **objetivos secundarios** nos planteamos los siguientes:

1. Identificación de variantes en 22 genes descritos de predisposición a la PAA mediante un panel de NGS, en aquellos casos no explicados.
2. Caracterización genética de las variantes detectadas en el objetivo 1.
3. Análisis molecular del tejido adenomatoso de la población de estudio.
4. Identificación de posibles mosaicos en los casos PAA no explicados y aparentemente esporádicos, mediante el cribado de mutaciones somáticas en el gen *APC*.
5. Correlación de los resultados obtenidos con los datos clínicos y anatomopatológicos y establecimiento de un algoritmo adecuado para el diagnóstico genético asistencial de la PAA.

METODOLOGÍA

1. POBLACIONES Y CRITERIOS DE SELECCIÓN

1.1. POBLACIÓN PAA-HCSC

Para llevar a cabo el estudio descriptivo asistencial se tuvieron en cuenta todos aquellos pacientes que acudieron a la CCG del Hospital Clínico San Carlos y que se les realizó el diagnóstico molecular de PAA. A todos ellos se les llevó a cabo, al menos, el cribado genético en ADN germinal para las cuatro variantes recurrentes en el gen *MUTYH* en población caucásica y del sur de Europa: c.1187G>A p.(Gly396Asp) (G396D); c.536A>G p.(Tyr179Cys) (Y179C); c.1227_1228dup p.(Glu410Glyfs*43) y c.1437_1439delGGA p.(Glu480del) (Tabla 2).

1.2. COHORTE PAAX

Para llevar a cabo los objetivos propuestos en esta tesis doctoral, se reclutaron, previo consentimiento informado, 159 pacientes con PAA no explicada procedentes de las CCG del Hospital Clínico San Carlos y Hospital 12 de Octubre de Madrid (124 y 35 pacientes respectivamente) que cumpliesen los siguientes criterios:

1.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Criterios clínicos:

- Presencia de más de 20 adenomas acumulados independientemente de la edad.
- Detección de 10 adenomas en una única colonoscopia independientemente de la edad.
- Presencia de más de 10 adenomas acumulados antes de los 70 años.

Criterios moleculares:

- Estudio negativo de variantes patogénicas recurrentes en *MUTYH*.

1.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Portadores de variantes patogénicas/probablemente patogénicas detectadas previamente en *MUTYH* o en otros genes de predisposición a la poliposis/CCR, y que justifiquen la PA.

1.3. COHORTES DE VALIDACIÓN

Para los estudios caso-control, realizados para la caracterización de variantes, se dispuso de una cohorte de validación de casos de PAA y una cohorte control, libre de PA.

Cohorte de validación PAAX: 292 casos de PAA, con los mismos criterios de inclusión y exclusión que la cohorte PAA, reclutados por la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX) (19 casos) y el Hospital 12 de Octubre (249 pacientes).

Cohorte control: 714 pacientes libres de poliposis/CCR, comparables a las cohortes de estudio en cuanto a raza, edad y sexo, reclutados en el Hospital Clínico San Carlos.

2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

2.1. EXTRACCIÓN DE ADN

2.1.1. ADN de sangre periférica

A cada participante del estudio se le extrajeron 9mL de sangre venosa periférica en tubos con anticoagulante EDTA K3 y bajo consentimiento informado.

La extracción de ADN germinal a partir de sangre venosa se realizó de forma automatizada mediante el robot *MagNA pure System (Roche Life Science)*, según el protocolo recomendado por el fabricante.

Una vez extraído el ADN, se cuantificó mediante la lectura de absorbancia a 260nm con el espectrofotómetro *NanoDrop® 1000 (ThermoScientific)*. Su pureza se estimó hallando el cociente Abs_{260}/Abs_{280} , considerándose adecuados los cocientes por encima de 1,8. Seguidamente, se comprobó la integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 0,5X. Por último, se volvió a estimar la concentración de forma más precisa utilizando el fluorímetro *Qubit 3.0 (Invitrogen)*, que mide ADN de doble cadena.

2.1.2. ADN de tejido tumoral/adenomatoso

Se solicitaron al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital, previo consentimiento informado, bloques parafinados de tejido adenomatoso y/o tumoral procedentes del colon y/o recto de pacientes PAAX.

Para la extracción de ADN de tejido tumoral o adenomatoso se realizaron entre 5 y 20 cortes de 5-10µm de grosor, según el tamaño de la lesión, de tejido embebido en parafina. La zona adenomatosa/tumoral fue delimitada mediante una tinción con hematoxilina-

eosina por un patólogo experimentado. La zona de tejido no delimitada se eliminó mediante una cuchilla llevándose a cabo el procedimiento de extracción solamente en la zona tumoral/adenomatosa seleccionada.

Para la extracción del ADN se utilizó el kit “*Gene Read DNA FFPE Tissue*” (*Qiagen*) según el protocolo recomendado por el fabricante. Para estimar la concentración y calidad se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 2.1.1.

2.2.EXTRACCIÓN DE ARN

2.2.1. ARN de sangre periférica

La extracción de ARN a partir de sangre periférica se llevó a cabo de dos maneras distintas; bien a partir de muestras extraídas en tubos con EDTA K3, mediante el extractor automático *MagnaPure* (*Roche*) y según el protocolo recomendado; o bien a partir de muestras extraídas en tubos *PAX gene Blood RNA* (*PreAnalytiX*), que contienen un estabilizador de ARN, utilizando el Kit de extracción *PAX gene Blood RNA* (*PreAnalytiX*), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Una vez extraído el ARN, se cuantificó mediante la lectura de absorbancia a 260nm con el espectrofotómetro *NanoDrop*® 1000 (*ThermoScientific*). Su pureza se estimó hallando el cociente Abs260/Abs280, considerándose adecuados los cocientes por encima de 2,1.

2.2.2. ARN de tejido tumoral/adenomatoso

Para la extracción del ARN de células tumorales/adenomatosas se realizaron entre 5 y 20 cortes de 5-10µm de grosor, en función del tamaño de la lesión, de tejido tumoral/adenomatoso embebido en parafina. La zona adenomatosa/tumoral fue delimitada mediante una tinción con hematoxilina-eosina por un patólogo experimentado. La zona de tejido no delimitada se eliminó mediante una cuchilla llevándose a cabo el procedimiento de extracción solamente en la zona tumoral/adenomatosa seleccionada.

La extracción de ARN se realizó mediante el kit *RNeasy FFPE* (*Qiagen*) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para estimar la concentración y calidad se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 2.2.1.

2.3.SÍNTESIS DE ADNc

Para la síntesis de ADNc a partir de ARN total, ya fuera procedente de sangre o de tejido, se empleó el kit *Prime Script RT-PCR* (TaKaRa Bio, Clontech,) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y utilizando una mezcla de OligodT y Random-6-mers (oligonucleótidos randomizados) como iniciadores de la síntesis de ADNc.

3. CRIBADO GERMINAL EN GENES DE PREDISPOSICIÓN A LA PAA

3.1.SECUENCIACIÓN MASIVA

El cribado de 22 genes conocidos de predisposición a la PA y/o CCR se llevó a cabo mediante un panel personalizado de NGS (*Haloplex, Agilent Technologies*) y se secuenció en la plataforma *MiSeq* (*Illumina, Inc*).

En el diseño del panel se incluyeron todas las regiones codificantes, secuencias consenso de *splicing* y regiones 5' y 3' UTR de los genes *APC, MUTYH, POLD1, POLE, NTHL1, GREM1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH6, PMS2, BMPRIA, SMAD4, ENG, AXIN2, GALNT12, BMP4, PTEN, STK11* y *SCG5*, todos ellos asociados de una manera directa, o indirecta, a la predisposición de adenomas en el colon y/o recto. En la Tabla 3 se muestran las características generales del diseño del panel y en el Anexo 2 se detalla la cobertura horizontal (porcentaje de la región diana cubierta) estimada para cada uno de los genes incluidos.

CARACTERÍSTICAS DEL PANEL PERSONALIZADO DE NGS	
TAMAÑO MEDIO DE LOS AMPLICONES	250 pb
NÚMERO TOTAL DE AMPLICONES	4185
TAMAÑO DE LAS REGIONES DIANA	85517 kpb
TAMAÑO DE LAS REGIONES DIANA CUBIERTAS	85344 kpb
COBERTURA HORIZONTAL TOTAL	99,8%

Tabla 3. Características generales del panel personalizado de NGS.

3.1.1. Preparación de librerías y lanzamiento de la carrera de NGS

Para el enriquecimiento del panel se utilizó el sistema *Haloplex* (*Agilent Technologies*), basado en sondas de inversión, que reconocen los extremos de las secuencias diana e

incorporan cebadores universales para la posterior amplificación por PCR de las regiones capturadas.

Las librerías se prepararon en tandas de 12 muestras siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (*Haloplex Target Enrichment System, Version F1, Agilent Technologies*), resumido en las siguientes etapas (Figura 18):

1. Digestión del ADN genómico por enzimas de restricción y confirmación de esa digestión mediante microelectroforesis capilar con el equipo *2100 Bioanalyzer (Agilent)* y el kit *High Sensitivity DNA (Agilent technologies)*.
2. Hibridación del ADN digerido con sondas Haloplex.
3. Captura de los híbridos ADN-sonda. La biotinilación de las sondas permite la captura usando perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina y un soporte magnético-96 (*Invitrogen™*).
4. Amplificación por PCR de las secuencias diana capturadas.
5. Purificación de las librerías amplificadas utilizando *beads* magnéticas Agencourt AMPure XP (*Beckman Coulter™*) y el soporte magnético-96 (*Invitrogen™*).
6. Cuantificación de la librería generada en el fluorímetro Qubit 3.0 (*Invitrogen™*) y estimación de su calidad en el equipo *2100 Bioanalyzer (Agilent)*, utilizando el kit *High Sensitivity DNA (Agilent technologies)*.

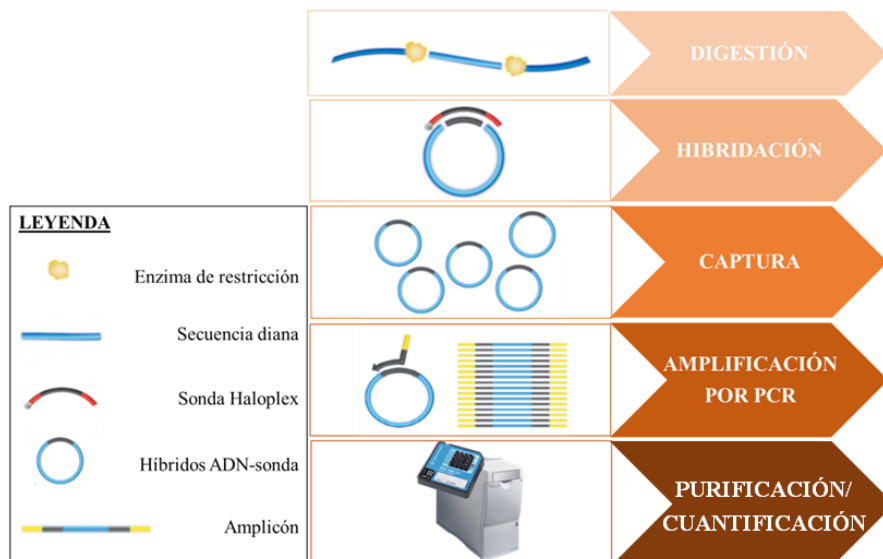


Figura 18. Esquema del sistema de enriquecimiento *Haloplex (Agilent Technologies)*. Se muestran las distintas etapas del procedimiento. Imagen adaptada del manual *HaloPlex Target Enrichment System for Illumina Sequencing (Agilent Technologies)*.

Una vez generadas todas las librerías, se hicieron pools de 47, 48 y 64 muestras para su posterior secuenciación en paralelo. Dicha secuenciación se realizó en la plataforma *MiSeq* (Illumina Inc.), la cual lleva a cabo una preamplificación clonal en puente para la generación de *clusters*, seguida de un número variable de ciclos de secuenciación en paralelo, que se basa en el uso de terminadores reversibles marcados con fluorocromos (Figura 19) (Ravi et al., 2018). Concretamente, se llevaron a cabo un total de 500 ciclos de secuenciación de extremos pareados (*paired-end*) (2x250pb), utilizando cartuchos MiSeq v2 standard (Illumina) en las dos primeras carreras de secuenciación masiva y MiSeq v3 standard (Illumina) en la tercera.

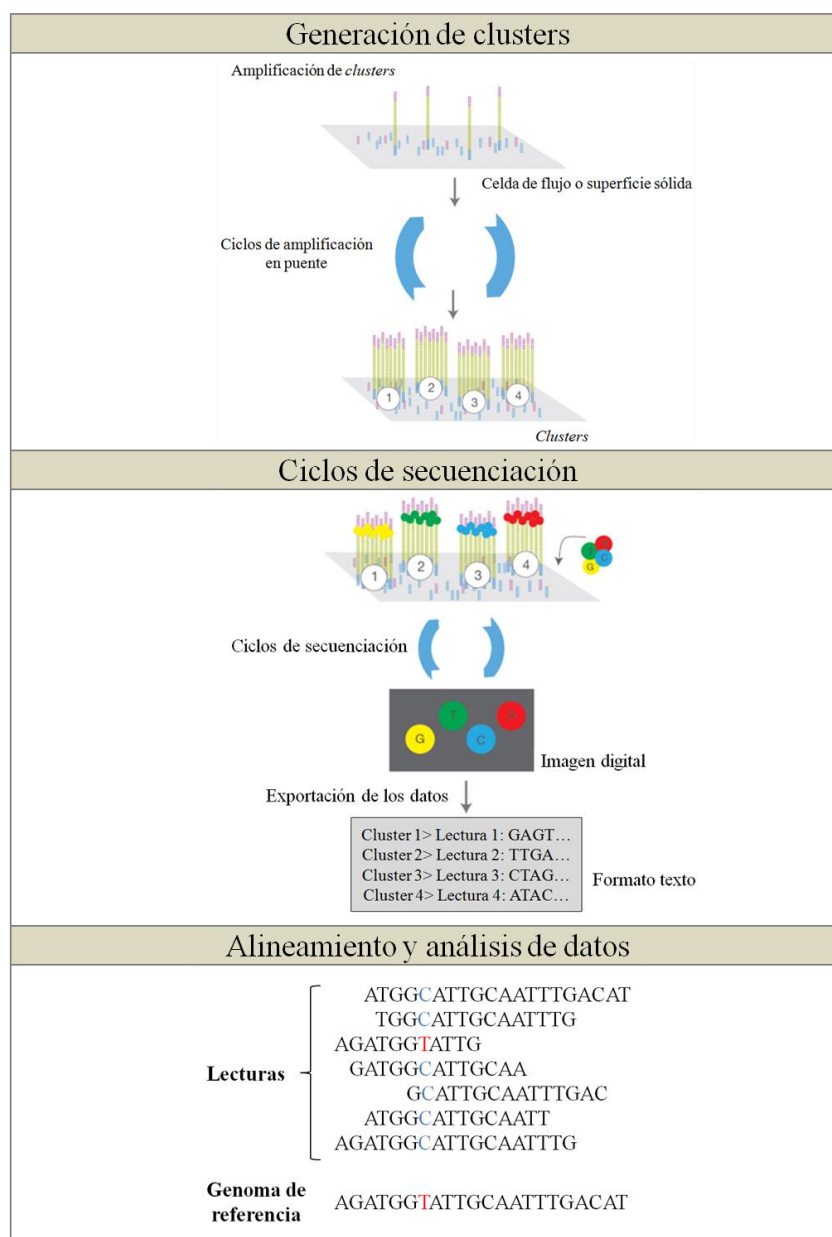


Figura 19. Química de la secuenciación NGS de Illumina. Se muestra la generación de clusters, ciclos de secuenciación, alineamiento y análisis de datos. Imagen adaptada de Illumina Inc.

3.1.2. Análisis de datos de secuenciación

El procesamiento de los datos brutos (archivos FastQ); alineamiento con el genoma de referencia GRCh37 (archivos bam) y detección de alteraciones (archivos vcf) se realizó a través del programa *SureCall* (Agilent Technologies) utilizando el *pipeline* informático recomendado por el fabricante de librerías *Haloplex* (Agilent). La visualización de secuencias se realizó con la herramienta IGV (*Integrative Genomics Viewer, Broad Institute*).

Para la anotación de variantes se utilizaron distintas bases de datos poblacionales, mutacionales, programas de predicción y otros indicados en el Anexo 3.

3.1.3. Filtrado y priorización de las variantes obtenidas

Las variantes se nombraron según las recomendaciones de la HGVS (del inglés, *The Human Genome Variation Society*).

Las variantes detectadas fueron sometidas a un primer filtrado (Figura 20), en función de:

- 1.- Localización de la variante: se seleccionaron únicamente aquellas variantes situadas en regiones codificantes y UTR 5' o a 15 nucleótidos de distancia del extremo del exón.
- 2.- Frecuencia de la variante descrita en las bases de datos públicas: ExAC (*Exome Aggregation Consortium*), *1000 genomes*, EVS (*Exome Variant Server*) y gnomAD (*Genome Aggregation Database*). Se seleccionaron aquellas variantes con una frecuencia del alelo minoritario (MAF) menor del 1%.
- 3.- Biotipos de la variante: se seleccionaron variantes de sentido erróneo (*missense*), sin sentido (*nonsense*), variantes de *splicing* (± 15 nucleótidos del exón) e inserciones y deleciones tanto si suponen un cambio en el marco de lectura (*frameshift*) como si no (*inframe*). Se descartaron las variantes sinónimas, salvo aquellas que se encontraran en zonas consenso del proceso de *splicing*.
- 4.- Patogenicidad de las variantes: se descartaron aquellas variantes clasificadas como benignas según las bases de datos de mutaciones LOVD (*Leiden Open Variant Database*), UMD (*Universal Mutation Database*) y *Clinical Variant* (NCBI).

5.- Estudios in silico: respecto a las variantes *missense* e *inframe*, se seleccionaron aquellas que mostrasen predicciones de alteración en la función proteica en al menos dos de las tres herramientas *in silico* utilizadas: PolyPhen2 (*Polymorphism Phenotyping*) (Adzhubei et al., 2010), SIFT (*Sorts Intolerant From Tolerant*) (Kumar et al., 2009) y *Mutation Taster2* (Schwarz et al., 2014) o localizadas en un dominio funcional crítico determinado por el programa SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (Szklarczyk et al., 2019).

Respecto a las variantes localizadas en zonas consenso de *Splicing* o próximas a ellas (± 15 nt), se seleccionaron solo aquellas que mostrasen una predicción de alteración en el proceso de *Splicing* mediante la herramienta HSF (*Human Splicing Finder*) (Desmet et al., 2009).

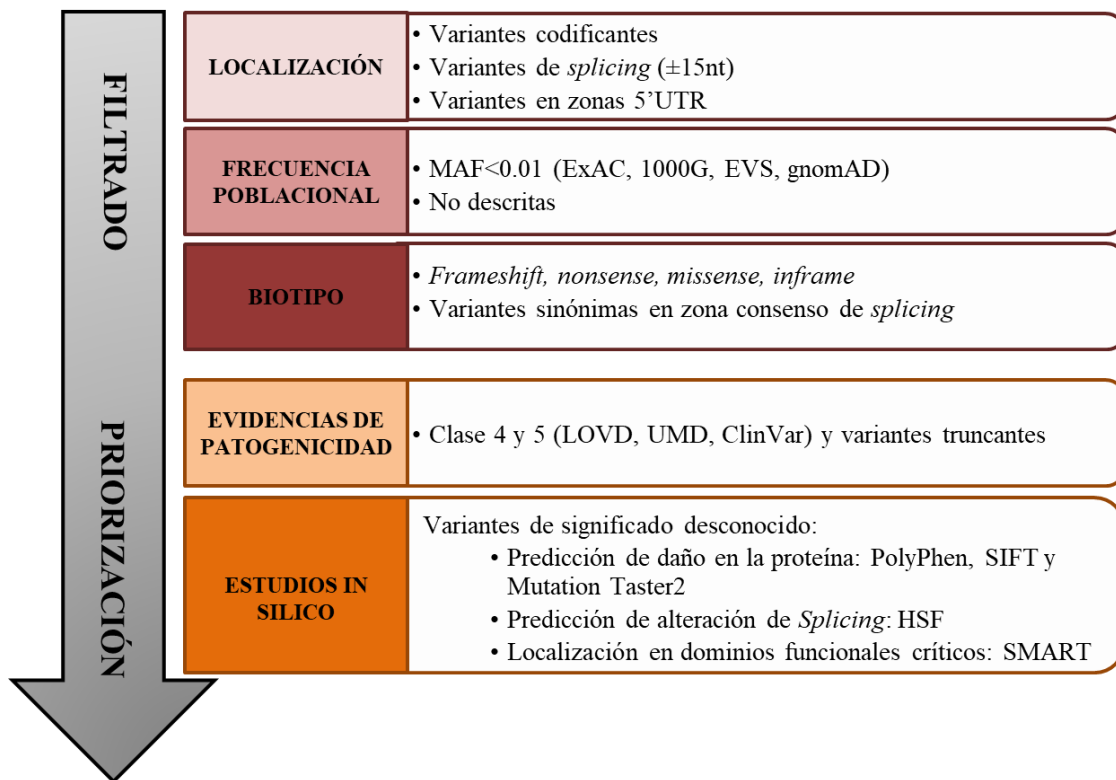


Figura 20. Esquema del proceso de filtrado y priorización de variantes. Se indican en cada paso las variantes seleccionadas.

3.2.VALIDACIÓN DE VARIANTES Y ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN FAMILIAR POR SECUENCIACIÓN DIRECTA

La validación de las variantes filtradas en probandos y genotipado de familiares se llevó a cabo por secuenciación directa del amplicón afectado. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Anexo 4) mediante las herramientas informáticas *Primer3Plus* (*Bioinformatics*) y *PrimerBlast* (*NCBI*). Las reacciones de amplificación del ADN se llevaron a cabo mediante el kit *Fast Start™ Taq DNA Polymerase* (*Sigma-Aldrich*) según las condiciones indicadas en la Tabla 4.

Reactivos	Concentración final
<i>Buffer</i> (con MgCl ₂)	1X
dNTPs (desoxirribonucleótido trifosfato)	0.2mM
Primer directo	50pM
Primer reverso	50pM
Enzima <i>Fast-Start</i>	1U
dH ₂ O	Hasta 25μL de volumen final
ADN	50ng

Tabla 4. Condiciones de las amplificaciones generales utilizadas en las distintas PCRs.

El programa general de amplificación se describe en la Figura 21. Se ajustaron las temperaturas de hibridación (desde 55 a 65°C) en función de la pareja de oligonucleótidos empleada. Las distintas temperaturas de hibridación se detallan en el Anexo 4.

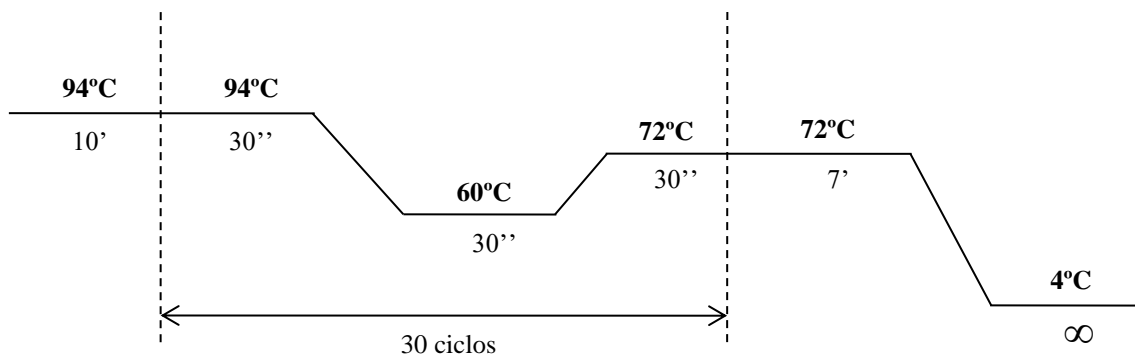


Figura 21. Programa general de amplificación empleado en la secuenciación directa de ADN.

A continuación, se realizó la reacción de secuenciación en un volumen final de 10μL: 1μL de primer (directo o reverso), 1μL de *Big Dye Terminator v1.1* (*Applied Biosystems*) y 1μL de ADN amplificado. Las condiciones del programa de reacción de secuenciación se resumen en la Figura 22.

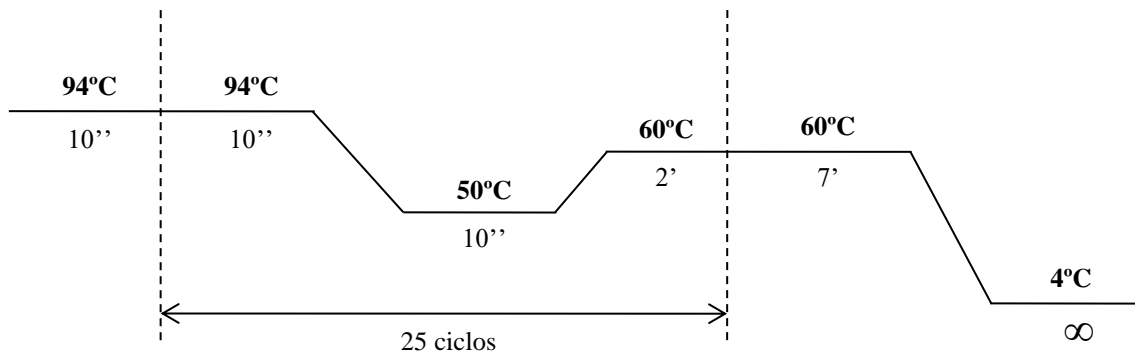


Figura 22. Programa general empleado para la reacción de secuenciación.

Seguidamente, se purificó el producto resultante con el *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* según las recomendaciones descritas por el fabricante. La electroforesis capilar se llevó a cabo en un secuenciador *ABI3130 (Applied Biosystems)* según el protocolo de secuenciación recomendado y las secuencias se visualizaron con el programa *Sequencing Analysis Software v6.0 (Applied Biosystems)*.

3.2.1. Validación de variantes en *PMS2*

La validación de variantes en el gen *PMS2* resultó más compleja debido a la presencia de una familia de pseudogenes altamente homólogos a *PMS2* (van der Klift et al., 2010). Para lograr la amplificación específica del gen, y evitar los pseudogenes descritos, se llevó a cabo una PCR de largo alcance (LR-PCR), utilizando parejas de oligonucleótidos, que hibridan con regiones específicas del gen (Vaughn et al., 2010). La amplificación se llevó a cabo con la polimerasa *LA Taq® DNA Polymerase (TaKaRa)*, siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante para tamaños de amplicón de alrededor de 10.000pb. Se llevaron a cabo tres LR-PCRs distintas en función del exón a secuenciar: LR1 (exón 1 al 5), LR2 (exón 7 al 9) o LR3 (exón 11 al 15). Las parejas de oligonucleótidos utilizadas y las temperaturas de hibridación empleadas se detallan en el Anexo 4. El producto amplificado se confirmó en un gel de agarosa al 0,8% y seguidamente se llevó a cabo una PCR anidada del exón correspondiente utilizando las condiciones de amplificaciones generales descritas en el apartado anterior (oligonucleótidos y temperaturas de hibridación indicadas en el Anexo 4).

3.2.2. Validación de variantes bialélicas en *MUTYH*

Para determinar la configuración en cis o en trans de variantes dobles en *MUTYH*, es decir; si dos variantes en *MUTYH* detectadas en el mismo paciente se sitúan en el mismo alelo, o en alelos distintos (bialélicas), se llevaron a cabo amplificaciones alelo específicas englobando los dos exones afectados. Se diseñaron oligonucleótidos directos alelo específicos para el cambio situado en el extremo 5', y un oligonucleótido reverso común más allá del cambio situado en el extremo 3', tal y como se ilustra en la Figura 23. Así se consiguió amplificar específicamente cada uno de los alelos (mutado y silvestre) y secuenciarlos por separado en cada caso. Las condiciones y programa de amplificación fueron las mismas que para el resto de las validaciones (Figuras 21, 22 y Anexo 4).

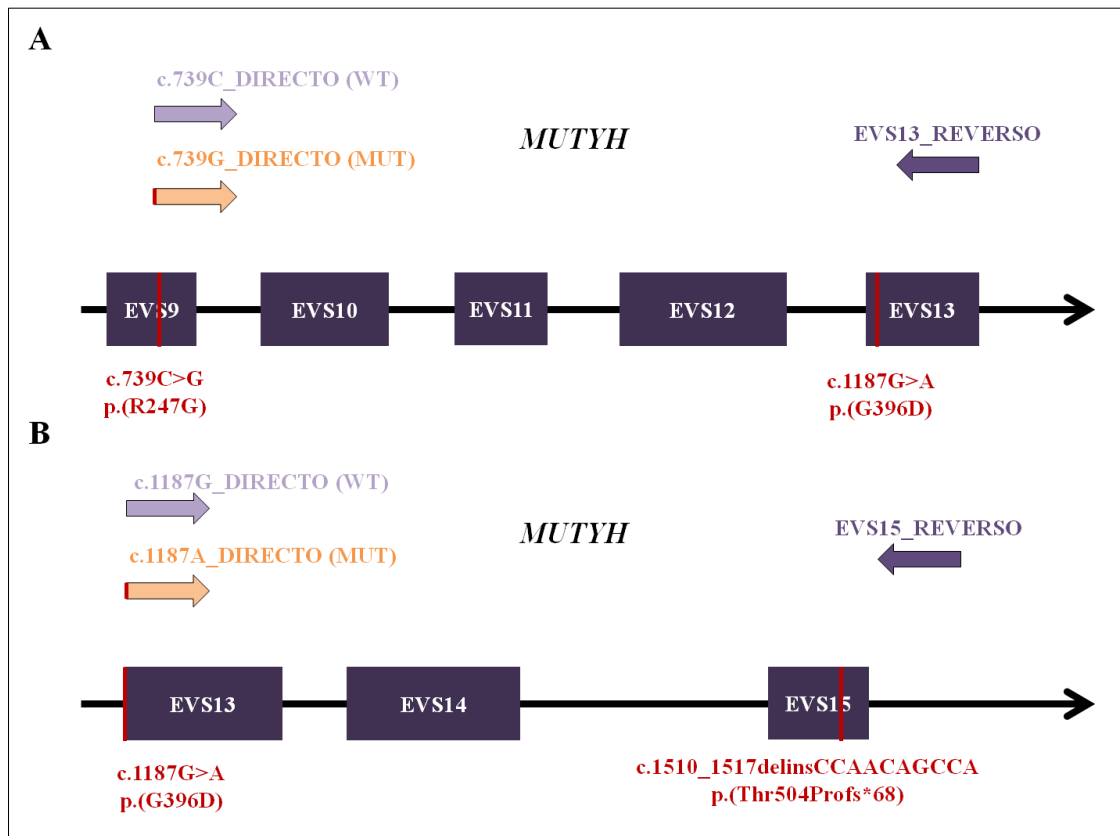


Figura 23. Esquema de las amplificaciones alelo-específicas diseñadas para estudiar si los pacientes en los que se detectaron dos variantes en *MUTYH* eran portadores bialélicos. A: Diseño para el portador de las variantes c.739C>G y c.1187G>A, situadas en los exones 9 y 13 respectivamente. B: Diseño para el portador de c.1187G>A y c.1510_1517delinsCCAACAGCCA, situadas en los exones 13 y 15 respectivamente.

3.3. HIGH RESOLUTION MELTING (HRM)

Las regiones mal cubiertas por el panel de secuenciación masiva (cobertura menor de 20) se re-analizaron mediante el método de curvas de fusión de alta resolución o HRM (del inglés, *High Resolution Melting*). Esta técnica se basa en la detección de pequeñas diferencias en la curva de fusión de *Melting*; para ello se lleva a cabo una amplificación a tiempo real con un fluoróforo que se une al ADN de doble cadena y una posterior lectura de la curva de fusión.

Se diseñaron parejas de oligonucleótidos específicos mediante las herramientas informáticas *Primer3Plus* (*Bioinformatics*) y *PrimerBlast* (*NCBI*), descritos en el Anexo 4) para la amplificación de los exones 15 de *MUTYH*, 13 de *APC* y 4 de *MSH2*. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 10µL conteniendo 100ng de ADN, *HRM Master Mix1X* (*Roche*), 5pM de cada cebador (directo y reverso) y 2,5mM de MgCl₂. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador *Light Cycler*® 96 (*Roche*) utilizando el programa estándar de HRM, recomendado por el fabricante. Las curvas de fusión se analizaron mediante el programa *Light Cycler*® 96 SW1.1 (*Roche*). Aquellas muestras que presentaron diferencias en la curva de fusión (Figura 24) se validaron mediante secuenciación directa tal y como se indica en el apartado 3.2.

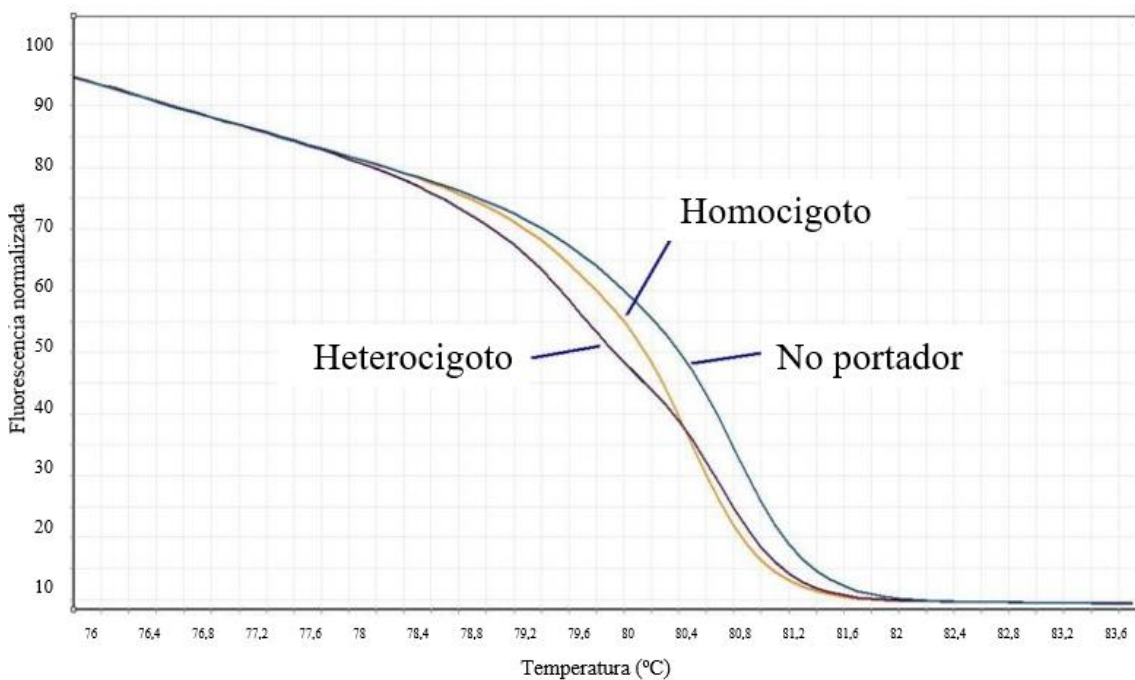


Figura 24. Diferencias en las curvas de fusión obtenidas mediante HRM. Imagen obtenida del programa *Light Cycler*® 96 SW1.1 (*Roche*).

3.4. MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

Se analizó la presencia de CNVs en los genes *APC* y *MUTYH* mediante MLPA. Esta técnica está basada en la hibridación y ligación de sondas específicas unidas a oligonucleótidos universales para su posterior amplificación por PCR (Figura 25) y visualización por electroforesis capilar.

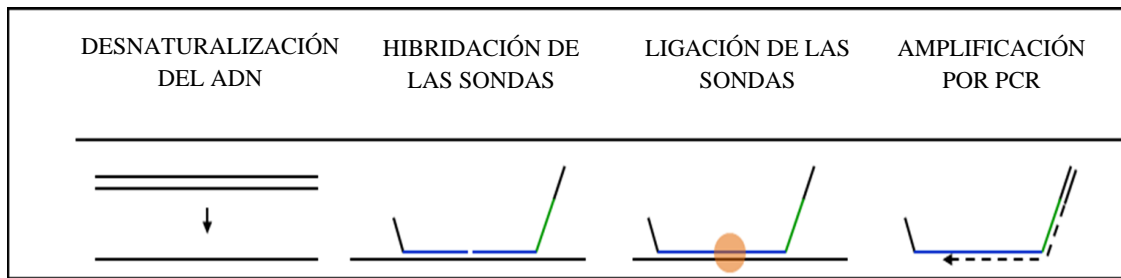


Figura 25. Fundamento de la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples. Imagen adaptada de *MLPA® General Protocol (MRC-Holland)*.

En todas las muestras se partió de 100ng de ADN y se siguió el procedimiento indicado por el fabricante, utilizándose el Kit *SALSA®MLPA® probemix P043-050R* para el gen *APC* y *SALSA®MLPA® probemix P378-050R* para *MUTYH* (*MRC-Holland*).

Para la visualización de los productos amplificados se diluyeron 2µL de la reacción de PCR-MLPA con una mezcla de 30µL de formamida y 0,2µL de marcador *GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems)*, se desnaturalizaron a 95°C durante 2 minutos y se llevó a cabo la electroforesis capilar en un analizador *ABI3130 (Applied Biosystems)*, según las recomendaciones descritas por el fabricante. El análisis de CNVs se efectuó con la ayuda del programa *Coffalyser VI.0 (MRC-Holland)*.

3.5. PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD

Para detectar posibles fenómenos de LOH, como segundo evento de inactivación somática de genes donde se han observado variantes germinales de significado desconocido, se llevó a cabo la secuenciación directa de la región donde se localiza el cambio germinal en tejido normal, adenomatoso y tumoral de aquellos pacientes portadores, y según se describe anteriormente en el apartado 3.2.

Se consideró LOH cuando la señal de intensidad de un alelo (salvaje o mutado) se reducía de modo apreciable al comparar el amplificado del ADN germinal con el del ADN tumoral o adenomatoso de la variante en estudio.

3.6. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN ALELO ESPECÍFICA A NIVEL DE ARN

Se llevaron a cabo estudios de expresión para la caracterización de las variantes *NTHL1*:c.268C>T p.(Gln90*) y *POLE*:c.141delG p.(Phe48Leufs*6) del paciente PAAX-83.

La extracción de ARN y síntesis de ADNc se llevó a cabo en distintas muestras de tejido adenomatoso/normal del paciente y controles, tal y como se indica en el apartado 2.2 y 2.3. Para evitar cualquier contaminación posible con ADN genómico durante la extracción del ARN se trataron todas las muestras con *RNase-free recombinant DNase I* (Roche). Posteriormente, se confirmó la eliminación de cualquier traza de ADN genómico mediante una amplificación diferencial del ADN genómico (ADNg) y el ADNc. En concreto, se utilizó un oligonucleótido directo complementario al exón 2 de *PALB2* y un primer reverso complementario al exón 3 de dicho gen. Tal y como se indica en la Figura 26, la amplificación del ADNg conllevaría la visualización de una banda conteniendo la secuencia completa del intrón 2 (269pb) y, por el contrario, la amplificación del ADNc conllevaría la visualización de una banda de menor tamaño que carecería del intrón 2 (152pb).

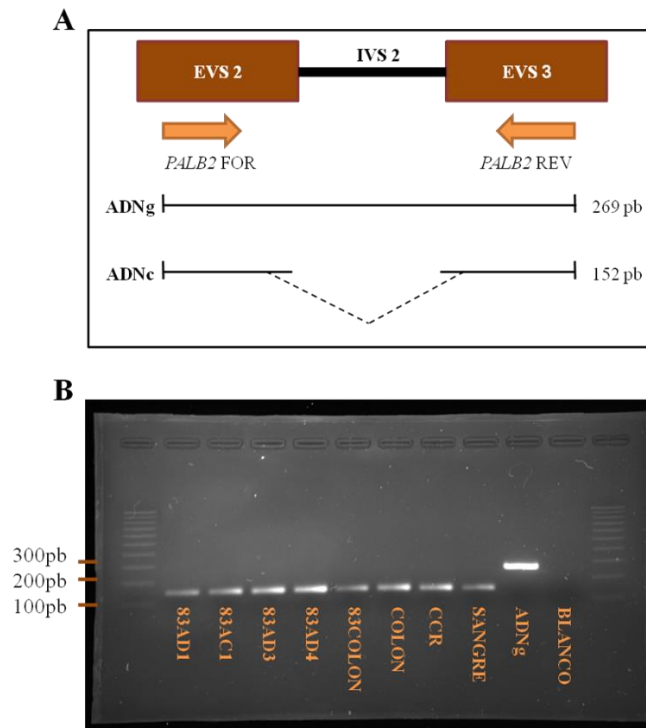


Figura 26. Amplificación empleada para confirmar la posible contaminación por ADN genómico en las muestras de ADNc. A: Esquema de la amplificación. B: Gel de agarosa al 2% que confirma la inexistencia de contaminación por ADNg en las muestras de ADNc utilizadas.

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar específicamente los alelos salvajes de las variantes de estudio (Anexo 4). Se llevó a cabo una PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el kit *KAPA SYBR® FAST Universal (Kapa Biosystems)* y el termociclador *Light Cycler®96 (Roche)*. El experimento se realizó por triplicado y como gen endógeno se utilizó *PSMB4*. Los oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación del gen endógeno se muestran en el anexo 4.

Los resultados de estos experimentos se analizaron con el software *Light Cycler® 96 SW 1.1* y se llevó a cabo un análisis comparativo mediante el software *IBM SPSS Statistics 24*.

3.7. ESTUDIO SOMÁTICO EXTERNO EN EL PACIENTE PAAX-83

En el ADN procedente de tres tejidos FFPE del paciente PAAX-83, dos de ellos adenomatosos (PAAX-83 AD1 y AD4) y uno adenocarcinomatoso (PAAX-83 AC1), se llevó a cabo el estudio de mutaciones somáticas mediante la secuenciación de sonda de inversión de molécula única (smMIP: del inglés, *single-molecule molecular inversion probe*) en busca de una posible firma mutacional que explicara el síndrome subyacente de PAA en este paciente. La química de esta tecnología permite detectar variantes con una fracción alélica muy baja y puede ayudar a distinguir desaminaciones derivadas de la inclusión del tejido en parafina, que es un artefacto bastante común en el ADN procedente de tejido FFPE.

Este experimento se llevó a cabo en el Radboud University Medical Centre de Nijmegen (Países Bajos), donde se analizaron distintos *hotspots* en un total de 57 genes asociados al desarrollo de CCR en estas tres muestras de tejido, tal y como se describe en (Eijkelenboom et al., 2016).

3.8. ESTUDIOS DE *SPLICING*

Se analizó el ARNm de las variantes priorizadas con posible alteración en el proceso de *splicing* mediante secuenciación Sanger.

En cada caso, se extrajo ARN a partir de sangre periférica y se sintetizó ADNc tal y como se indica en los apartados 2.2 y 2.3. Se diseñaron oligonucleótidos (Anexo 4) para la amplificación específica del ADNc correspondiente y posterior secuenciación Sanger en un *ABI3130* (*Applied Biosystems*) según el protocolo de secuenciación descrito en el apartado 3.2. Para cada variante de estudio se diseñaron parejas específicas de oligonucleótidos que permitiesen la detección de posibles retenciones intrónicas o pérdidas de los exones adyacentes al cambio (Figura 27).

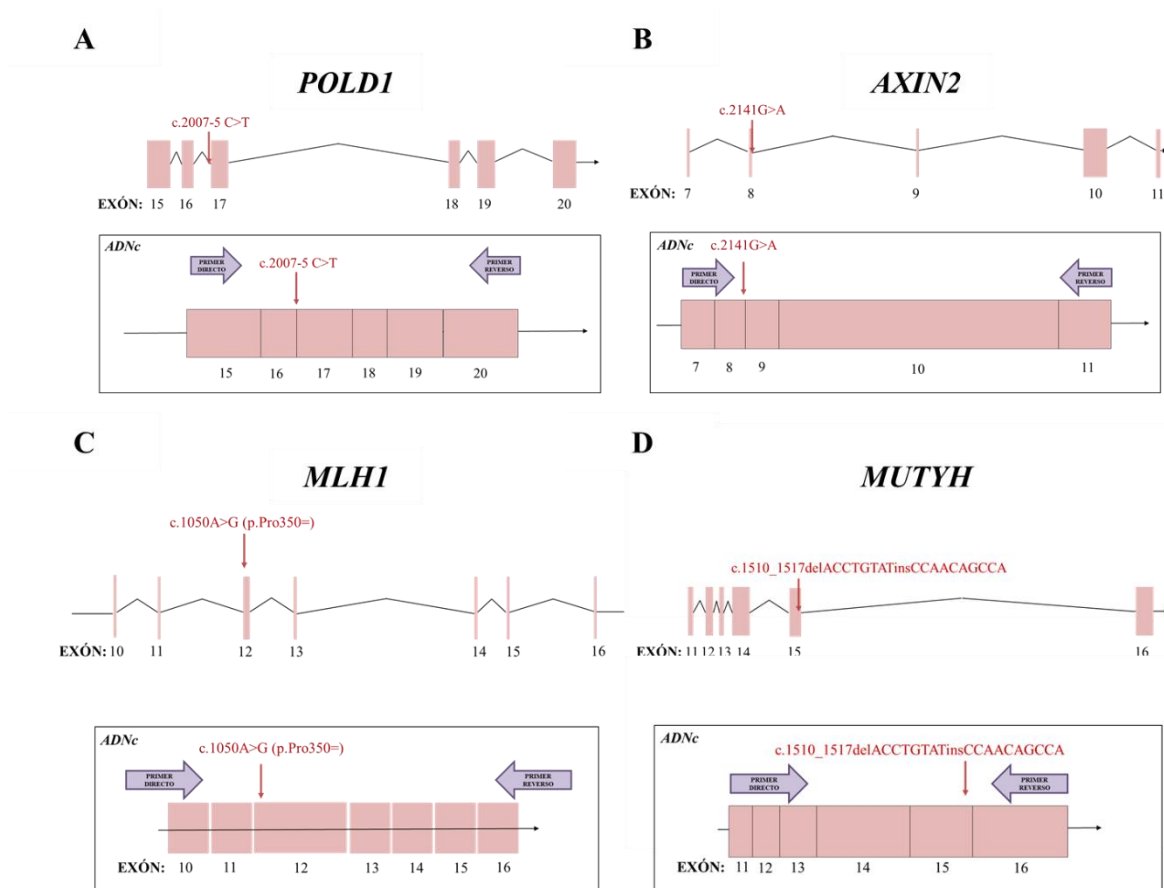


Figura 27. Esquema del amplicón diseñado para los distintos estudios de *Splicing*. A) *POLD1*:c.2007-5C>T. El oligonucleótido directo hibrida en el exón 15 y el reverso en el exón 20, obteniendo un amplicón de 697pb. B) *AXIN2*:c.2141G>A. El oligonucleótido directo hibrida en el exón 7 y el reverso en el exón 11. El tamaño del fragmento obtenido es de 571pb. C) *MUTYH*:c.1510_1517delinsCCAACAGCCA. El oligonucleótido directo hibrida en el exón 11 y el reverso en el exón 16. El tamaño del fragmento obtenido es de 694pb. D) *MLH1*:c.1050A>G p.(Pro350=). El primer directo hibrida en el exón 10 y el reverso en el exón 16. El tamaño del fragmento obtenido es de 963pb.

3.9. ESTUDIOS CASO-CONTROL

Para llevar a cabo el estudio de asociación caso-control en la variante *GALNT12:c.907G>A* (p.Asp303Asn) se empleó un ensayo TaqMan de Genotipado de SNPs (P160926-004 B12) (Applied Biosystems) dirigido específicamente al cambio.

Para ello, se amplificaron 10 ng de ADN genómico en un volumen final de 5µL, utilizando el kit *Master Mix Genotyping Fast* (Thermo Fisher) según el protocolo recomendado. La amplificación y detección de la fluorescencia se llevó a cabo mediante el equipo *Real Time ABI PRISM 7900 Sequence Detector*. El fundamento de estos ensayos se esquematiza en la Figura 28.

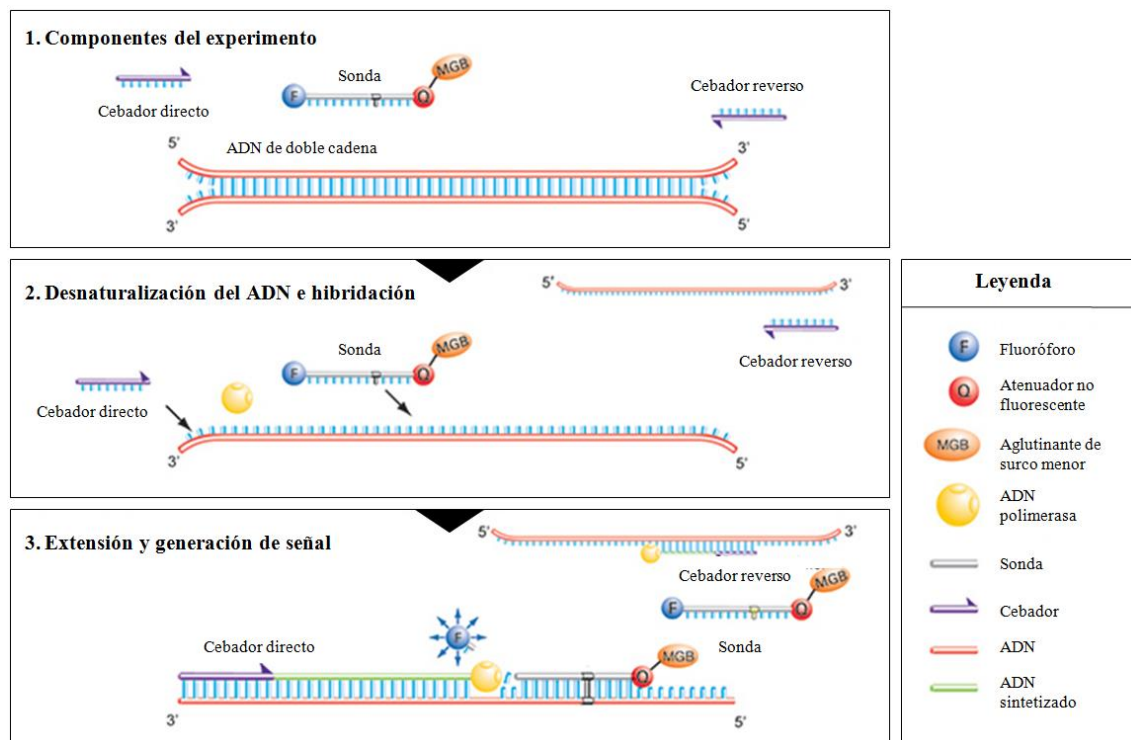


Figura 28. Fundamento de los ensayos TaqMan. Imagen adaptada de Thermo Fisher. Durante la fase de extensión de la reacción de PCR la ADN polimerasa rompe las sondas hibridadas con el ADN, separando el fluoróforo del atenuador y detectándose emisión de fluorescencia de una de las sondas o de ambas.

3.10. ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Para caracterizar la variante *GALTN12*: c.907G>A (p. Asp303Asn) se llevó a cabo un análisis para detectar la proteína muc1 total y muc1 no glicosilada, mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) en 5 muestras de tejido adenomatoso y normal embebido en parafina. Para este análisis, se utilizaron dos anticuerpos distintos frente a la proteína muc1:

- 1.- Un anticuerpo monoclonal de ratón (EMA, E29) que se une al dominio citoplasmático de muc1 y reconoce la proteína total (*DAKO, Thermo Fisher Scientific, U.S.*).
- 2.- Un anticuerpo monoclonal de ratón (VU4H5) que se une al dominio extracelular de la proteína solo si el residuo de treonina no está glicosilado (*Cell Signaling Technology, U.S.*).

El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del hospital, mediante el equipo *Dako Omnis Staining System (DAKO)* y bajo las recomendaciones descritas por el fabricante. Las muestras fueron contrastadas con hematoxilina y dos patólogos revisaron todas las muestras y clasificaron los niveles de expresión en cuatro categorías (0, +, ++, +++) en función de la intensidad del anticuerpo.

3.11. CLASIFICACIÓN DE VARIANTES

Tras los distintos estudios de caracterización, las variantes se reclasificaron siguiendo las recomendaciones del “*American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*” junto con la “*Association for Molecular Pathology (AMP)*”. Este sistema de clasificación se fundamenta en 28 criterios (descritos en el Anexo 5) clasificados según el grado de evidencia y basados principalmente en datos poblacionales, *in silico*, funcionales y de segregación (Richards et al., 2015). La combinación de estos criterios permite clasificar a las variantes en cinco categorías: clase 1 o benignas (B), clase 2 o probablemente benignas (PB), clase 3 o VSD, clase 4 o probablemente patogénicas (PP) y clase 5 o patogénicas (P) (Anexo 6).

Para los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* se utilizaron las guías piloto InSIGHT-ACMG específicas para estos genes, aprobadas recientemente por ClinGen (<https://www.clinicalgenome.org/affiliation/50099>), así como las guías específicas para el gen *PTEN* (<https://clinicalgenome.org/affiliation/50012/>).

4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ADENOMAS/CCR

4.1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA VÍA MMR

El estudio de expresión de las proteínas mlh1, msh2, msh6 y pms2 se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del HCSC, mediante técnicas inmunohistoquímicas en muestras parafinadas de tejido adenomatoso y/o tumoral de los pacientes incluidos en el estudio. Para ello, se partieron de bloques de tejido parafinado en los que se llevaron a cabo cortes de tejido de 4µm de grosor y la detección de la expresión proteica se llevó a cabo de forma automatizada en el equipo *Dako Omnis Staining System (DAKO)* según las especificaciones del fabricante.

Los anticuerpos utilizados fueron las clonas FE11 para msh2, EP49 para msh6, EP51 para pms2 y ES05 para mlh1 (*DAKO*). Un patólogo revisó todas las muestras y determinó la presencia o ausencia de expresión proteica en los núcleos celulares.

4.2. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Para determinar la inestabilidad de microsatélites en tejido adenomatoso/carcinomatoso colorrectal se analizó un panel de 5 marcadores: cinco repeticiones de mononucleótidos (NR-21, BAT25, BAT26, NR-24, MONO-27), que tienen una alta sensibilidad y especificidad en la detección de inestabilidad de microsatélites (Umar et al., 2004). Se partió de muestras de ADN de tejido, extraídas según el apartado 2.1.2, y se llevó a cabo una PCR múltiple con oligonucleótidos marcados con distintos fluoróforos, utilizando el *Kit MSI Analysis System v1.2 (Promega)*. La visualización de los fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante electroforesis capilar en el analizador *ABI3130 (Applied Biosystems)* siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante con el software *GeneMapper (Applied Biosystems)*. Los mononucleótidos analizados por este kit son marcadores cuasi-monomórficos, es decir, casi todos los individuos son homocigotos para el mismo alelo común. Los tumores que mostraron inestabilidad en al menos 2 microsatélites monomórficos se consideraron inestables MSI-H; en uno MSI-L, a excepción del microsatélite BAT26, que se consideró MSI-H según (Hoang et al., 1997);

y aquellos que no mostraron ningún microsatélite alterado se consideraron MSS. La secuencia de estos microsatélites se detalla en la Tabla 5.

MARCADOR	SECUENCIA	RANGO DE TAMAÑOS (PB)	FLUOROFORO
NR-21	(A) ₂₁	94-101	JOE
BAT-26	(A) ₂₆	103-115	FL
BAT-25	(A) ₂₅	114-124	JOE
NR-24	(A) ₂₄	130-133	TMR
MONO-27	(A) ₂₇	142-154	JOE

Tabla 5. Secuencia de nucleótidos de los 5 marcadores utilizados para determinar la inestabilidad de microsatélites. JOE = 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, FL = fluoresceína, TMR = carboxi-tetrametilrodamina.

4.3. GENOTIPADO DE V600E EN *BRAF*

Para genotipar la variante NM_004333.4 (*BRAF*): c.1799T>A p.(Val600Glu) se utilizó la sonda TaqMan® específica de la mutación (*rs113488022*) y proporcionada por ThermoFisher (*C_151552107_10 número de catálogo 4351379*). El fundamento y la metodología empleada se resumieron anteriormente en el apartado 3.8.

4.4. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *MLH1*

El estudio de la metilación en islas CpG del promotor de *MHL1* se realizó en 100ng de ADN de tejido parafinado adenomatoso/tumoral mediante una variante de la técnica MLPA convencional, conocida como MS-MLPA (del inglés, *Methylation-Sensitive Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; *MRC-Holland*®), y el kit SALSAS MS-MLPA ME011 Mismatch Repair Genes (MMR) versión B3 (*MRC-Holland*), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

La técnica se basa en llevar a cabo dos MLPAs en paralelo, en uno se digiere el ADN con la enzima de restricción HhaI y en otro no. Las islas CpG son dianas para HhaI sensibles a la metilación, de tal manera que, si estas islas están metiladas, la enzima no reconoce a su diana. La técnica sigue el mismo procedimiento que el MLPA convencional pero una vez que se produce la hibridación de las sondas con el ADN del paciente, se divide la muestra en dos y una de ellas se digiere con HhaI y luego ambas se amplifican por PCR de forma paralela y se analizan mediante electroforesis capilar (Figura 29). Por lo tanto,

la detección del producto de amplificación en la muestra digerida indicará metilación de las islas CpG contenidas en ese amplicón, y a mayor intensidad de fluorescencia de la banda, mayor grado de metilación.

Para el análisis de los resultados se utilizó el software *Coffalyser V1.0 (MRC-Holland)* según las instrucciones del fabricante. Se consideraron regiones metiladas aquellas que mostraron una ratio de metilación (cociente entre la fracción digerida y no digerida de una muestra expresado en porcentaje) mayor o igual al 15%.

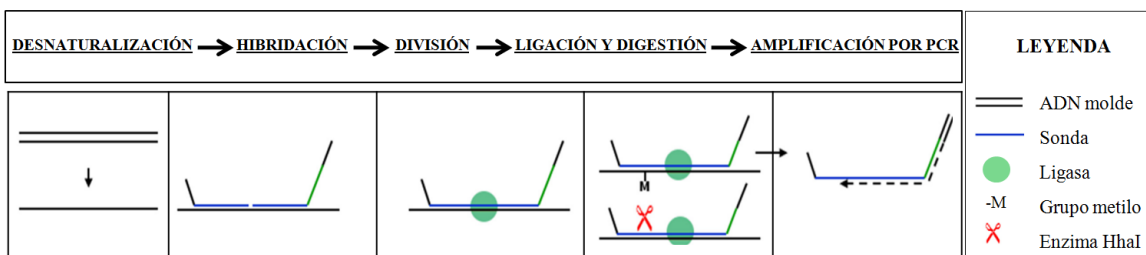


Figura 29. Esquema de la técnica MS-MLPA. Imagen adaptada de *MS-MLPA® General Protocol (MRC-Holland)*.

4.5. CRIBADO DE MUTACIONES SOMÁTICAS

Para la secuenciación del ADN de tejido adenomatoso y tumoral se utilizó el panel comercial *TruSight® Tumor 26 (Illumina)* (TST26). Dicho panel incluye 174 regiones relevantes (21 kb), localizadas en 82 exones de un total de 26 genes relacionados con tumores sólidos (*AKT1, ALK, APC, BRAF, CDH1, CTNNB1, EGFR, ERBB2, FBXW7, FGFR2, FOXL2, GNAQ, GNAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, MSH6, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, SMAD4, SRC, STK11, TP53*) (Anexo 7), todos ellos implicados en procesos de supervivencia celular (18), destino (5) y mantenimiento de la integridad del genoma (Tabla 6).

PROCESO CELULAR	VÍA DE SEÑALIZACIÓN	GEN
SUPERVIVENCIA CELULAR	PI3K	<i>AKT1</i>
		<i>PIK3CA</i>
		<i>PTEN</i>
	PI3K, RAS	<i>ALK</i>
		<i>EGFR</i>
		<i>ERBB2</i>
		<i>MET</i>
		<i>PDGFRA</i>
	PI3K, RAS, STAT	<i>FGFR2</i>
		<i>KIT</i>
	PI3K, RAS, MAPK, STAT	<i>SRC</i>
		<i>MAP2K1</i>
	RAS	<i>BRAF</i>
		<i>KRAS</i>
<i>NRAS</i>		
TGF-B	<i>SMAD4</i>	
PI3K, TGF-B, RAS	<i>GNAS</i>	
	<i>GNAQ</i>	
DESTINO CELULAR	WNT	<i>APC</i>
		<i>CDH1</i>
		<i>CTNNB1</i>
	mTOR	<i>STK11</i>
NOTCH	<i>FBXW7</i>	
MANTENIMIENTO DEL GENOMA	CONTROL DAÑO EN EL DNA (MMR)	<i>MSH6</i>
	CCLO CELULAR/APOPTOSIS; CONTROL DAÑO EN EL DNA	<i>TP53</i>
		<i>FOXL2</i>

Tabla 6. Genes, vías de señalización y procesos celulares del panel TruSight tumor 26.

El panel tiene un diseño dual, es decir, contiene 2 *pools* de oligonucleótidos que permiten secuenciar específicamente cada hebra de ADN, pudiendo identificar fenómenos de desaminación producidos durante la extracción del ADN de tejido embebido en parafina, así como otros falsos positivos (Figura 30). El enriquecimiento de las regiones diana está basado en amplificación por PCR, y brevemente se puede resumir de la siguiente manera:

1. Estimación de la calidad del ADN extraído de muestras FFPE mediante PCR cuantitativa. Para ello, se utilizó el kit *KAPA SYBR® FAST Universal (Kapa*

Biosystems) y el termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*.

2. Hibridación de los dos pools de oligonucleótidos (A y B) con el ADN, en pocillos independientes.
3. Eliminación de los oligonucleótidos no unidos al ADN utilizando una placa de filtro y posteriores lavados.
4. Extensión y ligación de los oligonucleótidos unidos al ADN correspondiente.
5. Amplificación mediante PCR con oligonucleótidos universales. En este paso se añaden las secuencias *index*s y los adaptadores comunes necesarios para la generación de *clusters* en la *flow cell*.
6. Purificación de los fragmentos amplificados, utilizando *beads* magnéticas *Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter™)* y el soporte magnético-96 (*Invitrogen™*).
7. Cuantificación por *Qubit 3.0 (Invitrogen™)* y normalización de las librerías, generando 4 pools de 22 y 23 muestras.

La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma MiSeq (*Illumina, Inc*), utilizando el cartucho MiSeq v2 y con una longitud de lectura de 2x150 pb (en un total de 300 ciclos).

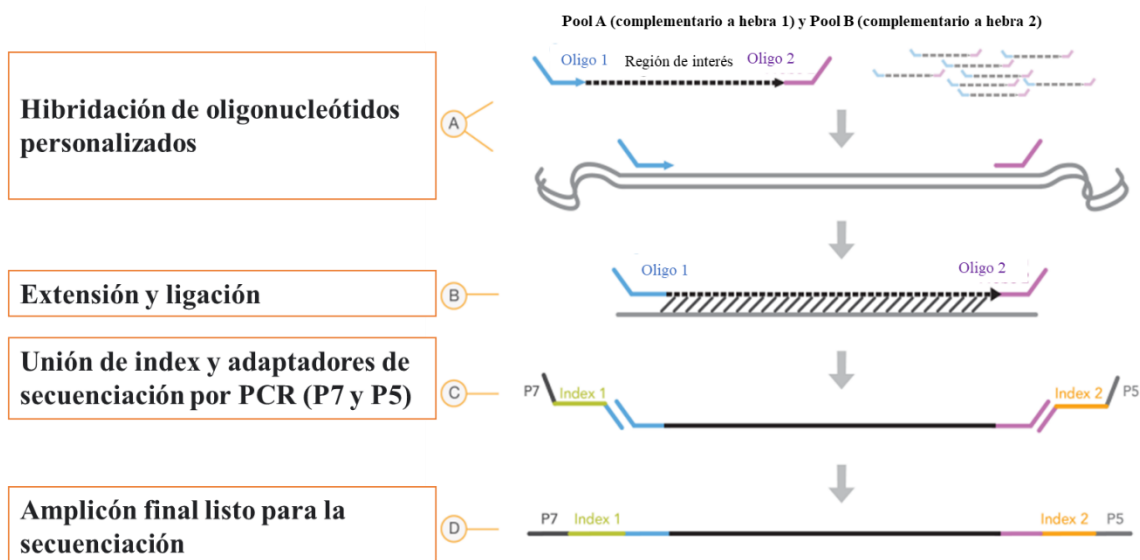


Figura 30. Esquema del proceso de elaboración de librerías de NGS en el panel TruSight Tumor 26. Para cada amplicón, se diseñan 2 pares de oligonucleótidos; un par complementario a una hebra y el otro a la hebra opuesta. Cada uno de ellos se hibrida con el ADN. Posteriormente, se lleva a cabo el proceso de extensión y ligación obteniendo los fragmentos de ADN con las regiones de interés flanqueadas por secuencias de oligonucleótidos universales (300-330pb), que son amplificados con una única pareja de oligonucleótidos. Los productos de esta amplificación se agrupan junto con los productos de otras muestras para su secuenciación masiva.

El procesamiento de los datos brutos y el alineamiento con el genoma de referencia GRCh37 (hg19) se realizó siguiendo el *pipeline* diseñado por el fabricante, integrado en la plataforma MiSeq, y la detección de alteraciones se llevó a cabo a través del programa *Variant Studio (Illumina, Inc)*. La visualización de secuencias se realizó con el programa *IGV*. Las variantes detectadas fueron sometidas a un filtrado, en función de:

1. Calidad de la secuenciación: Se eliminaron variantes que no coincidían entre *pools* y/o con un número de lecturas menor de 200.
2. Frecuencia poblacional de la variante: Se descartaron aquellas variantes que aparecieron con una frecuencia mayor del 2% en nuestra población de estudio. Se descartaron aquellas variantes con frecuencias poblacionales descritas mayores del 5% en las bases de datos públicas y variantes presentes también en el ADN germinal (esto solo pudo llevarse a cabo en regiones concretas de los genes que coincidían en ambos paneles: *APC*, *MSH6*, *PTEN*, *SMAD4* y *STK11*).

5. BÚSQUEDA DE MOSAICOS EN EL GEN *APC*

5.1. COHORTE DE ESTUDIO

Se seleccionaron pacientes procedentes de la cohorte de estudio PAAX que cumplieran los siguientes criterios:

- Ausencia de historia familiar de poliposis/CCR.
- Disponibilidad de al menos dos tejidos adenomatosos/adenocarcinomatosos.
- Panel de NGS germinal de 22 genes no informativo.

5.2. PANEL *APC*

El cribado del gen *APC* se llevó a cabo mediante un panel personalizado dual *Truseq Custom Amplicon Low Input (Illumina)* que incluía todas las regiones codificantes y las uniones exón-intrón de dicho gen. De manera similar al TST26, se trata de un protocolo multiplex basado en PCR, en el que se realizan dos librerías en paralelo con dos juegos de amplicones (CAT A y B: *Custom Amplicon Tubes A y B*) que cubren específicamente cada hebra de ADN en todas las regiones diana (Figura 30). El diseño de ambas librerías

(CAT A y B) se llevó a cabo mediante la herramienta online *Illumina Design Studio*. Cada diseño consta de 96 amplicones, con un tamaño medio de los amplicones de 175 pb, permitiendo una cobertura horizontal del 98% de las regiones diana.

Para la preparación de las librerías se siguió el protocolo dual *Tru Seq Custom Amplicon Low Input Library Prep Kit (Illumina)* recomendado por el fabricante, que es el mismo llevado a cabo en la elaboración del panel TST26 (apartado 4.5).

La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma *MiSeq System (Illumina)*, utilizando el cartucho *MiSeq v3 standard (Illumina)* y con una longitud de lectura de 2x150 pb (300 ciclos). Para el análisis del dato bruto y alineamiento con el genoma de referencia humano GRCh37 (hg19) se utilizó la aplicación *Truseq Custom Amplicon (Illumina, Inc)* y para la identificación y anotación de variantes se empleó el software *Variant Studio (Illumina, Inc)*. La visualización de secuencias se realizó con el programa IGV.

Se dieron por válidas solo aquellas variantes coincidentes en las dos librerías de una misma muestra (CAT A y B). En el caso de aquellas muestras en las que una de las dos librerías hubiese fallado, nos apoyamos en la visualización en el programa IGV.

Las variantes detectadas se sometieron a los siguientes filtrados:

- 1.- Selección de variantes detectadas en más de un adenoma de un mismo paciente.
- 2.- Selección de variantes deletéreas: regiones consenso de *splicing*, *frameshift* o *nonsense*.
- 3.- Selección de variantes con una FA mayor del 5% (el límite de detección de la técnica está en torno al 4%).
- 4.- Priorización de las variantes con una frecuencia menor del 5% en adenomas colorrectales según la base de datos de mutaciones somáticas COSMIC (del inglés, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*).

5.3.VALIDACIÓN DE MOSAICOS

Las variantes detectadas en varios adenomas se analizaron en más muestras adicionales de tejido adenomatoso, tumoral o normal de los distintos pacientes para intentar verificar su condición de mosaico. Para ello, se emplearon dos técnicas con límites de detección muy diferentes: Secuenciación Sanger (LD=15-20%) y PCRd (LD=0,01%).

La secuenciación Sanger se utilizó para validar variantes con FA mayores del 20%, ya que su sensibilidad es muy limitada. El protocolo de secuenciación Sanger se llevó a cabo tal y como se explica en el apartado 3.2.

Para variantes con FA menores, y para la validación de tejidos adicionales, se recurrió a la PCRd, cuya sensibilidad permite la detección de variantes con FA de hasta el 0,01% (Diaz & Bardelli, 2014). La técnica se basa en la partición de una muestra en muchas reacciones de PCR individuales y en paralelo utilizando para ello un chip nanofluídico. De esta manera se consigue amplificar una única molécula de ADN por pocillo, permitiendo la cuantificación absoluta, y una sensibilidad y exactitud superiores a los métodos moleculares tradicionales (Figura 31) (Diaz & Bardelli, 2014). Para el genotipado de las variantes de interés se emplearon sondas Taqman diseñadas específicamente para cada variante (*ThermoFisher Scientific*).

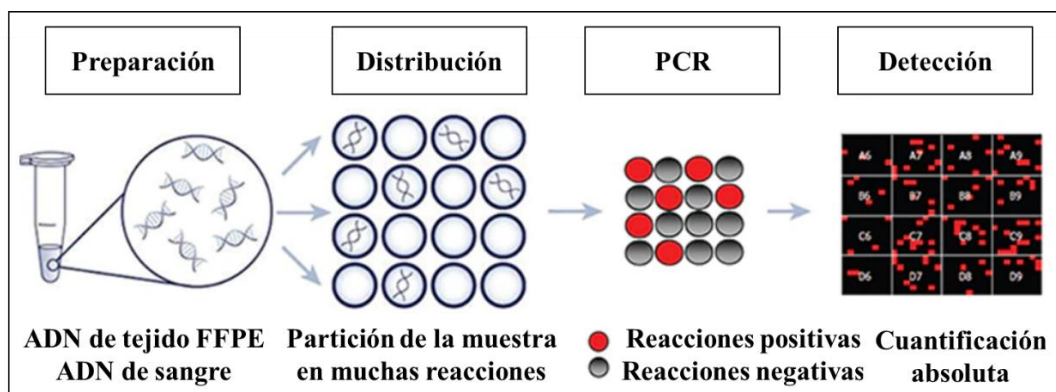


Figura 31. Fundamento de la PCR digital. Todas las muestras y cada uno de los chips nanofluídicos se analizaron por duplicado. Imagen adaptada de Thermo Fisher Scientific.

Para la validación de mosaicos, se extrajo ADN de tejidos adenomatosos parafinados localizados a lo largo del colon y recto de los distintos pacientes y se amplificaron por PCRd siguiendo las recomendaciones proporcionadas por Thermo Fisher Scientific. Los chips se cargaron mediante el equipo “QuantStudio 3D Digital PCR Chip Loader” y la PCRd se llevó a cabo en el termociclador “GeneAmp PCR System 9700” (Applied Biosystem), utilizando el programa recomendado por el fabricante, ajustando la temperatura de hibridación a 56°C.

Una vez terminada la PCR, se analizaron cada uno de los chips por duplicado en el equipo “QuantStudio 3D Digital PCR System” (Thermo Fisher Scientific) y los resultados se

visualizaron en el “QuantStudio 3D Analysis Suite Cloud Software” (Thermo Fisher Scientific) (Figura 32).

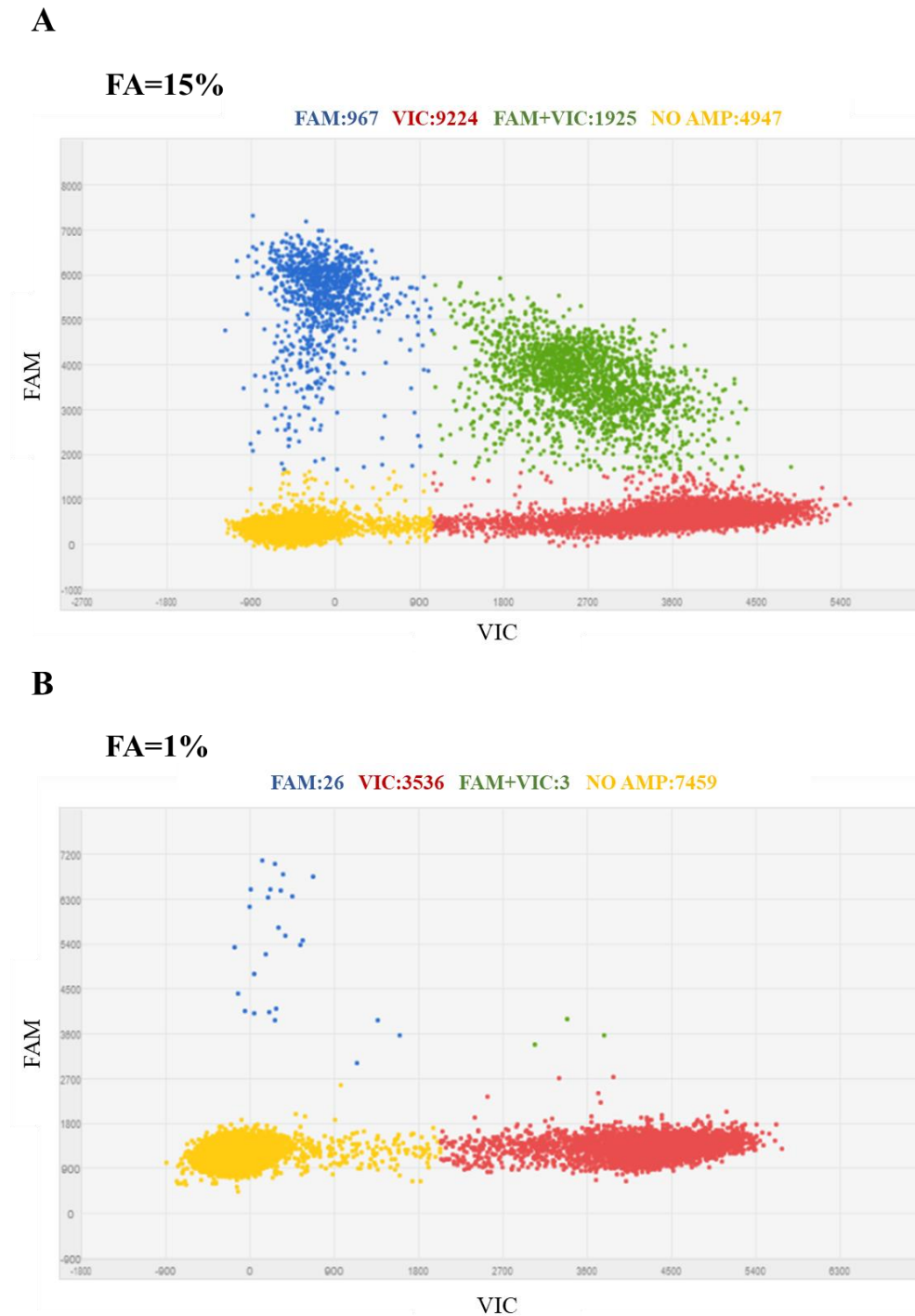


Figura 32. Ejemplos de resultados de genotipado de muestras de tejido adenomatoso obtenidos por PCRd. El alelo salvaje está marcado con el fluoróforo VIC (en rojo) y el alelo mutado con el fluoróforo FAM (en azul). A: Muestra con FA del 15%. B: Muestra con FA del 1%.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS PAA EN EL HCSC

Teniendo en cuenta los resultados asistenciales de los pacientes que acudieron a la CCG del HCSC entre los años 2011 y 2022, el cribado de las 4 variantes recurrentes en *MUTYH* y/o del gen *APC* completo se llevó a cabo en un total de 696 pacientes. De todos ellos, 479 pacientes presentaban un número de adenomas comprendido entre 10 y 100, mientras que 217 no cumplían criterios clínicos de poliposis presentando un número de adenomas menor de 10. En ningún caso se detectaron portadores monoalélicos o bialélicos en el grupo de pacientes con menos de 10 adenomas. Las características clínicas del grupo de pacientes con más de 10 adenomas se resumen en la Tabla 7.

Características clínico-patológicas	Población <i>MUTYH</i> y/o <i>APC</i>
N	479
% hombres (n)	70,8 (339)
Edad de diagnóstico de la poliposis; media (rango)	59 (29-88)
N adenomas, media (rango)	26,8 (10-100)
% detección de pólipos hiperplásicos (n)	19 (91)
% pacientes con CCR (n)	18,2 (87)
Edad de diagnóstico del CCR; media (rango)	60,8 (25-82)

Tabla 7. Características clínico-patológicas de la población con más de 10 adenomas.

Tras el cribado asistencial en este grupo de pacientes, se detectaron un total de 30 (6,3%) portadores monoalélicos y 15 (3,1%) portadores bialélicos (homocigotos o doble heterocigotos) en *MUTYH*. Teniendo en cuenta que el gen *MUTYH* muestra un patrón de herencia recesiva respecto a la PAA, solo el 3,1% de los pacientes recibió un resultado informativo, y si tenemos en cuenta los casos en los que se detectó una variante patogénica/probablemente patogénica en el gen *APC* (N=3) este porcentaje de casos explicados aumenta al 3,8%.

Si agrupamos a los pacientes en tres intervalos en función de la carga de adenomas (10-20, 21-50 y 51-100) se observa que el porcentaje de casos resueltos por variantes bialélicas en *MUTYH* o por variantes en *APC* aumenta considerablemente según aumenta la carga de adenomas, detectándose un 1,9% de pacientes con un resultado informativo en el grupo de 10-20 adenomas y un 27% en el grupo de 51-100 adenomas (Figura 33).

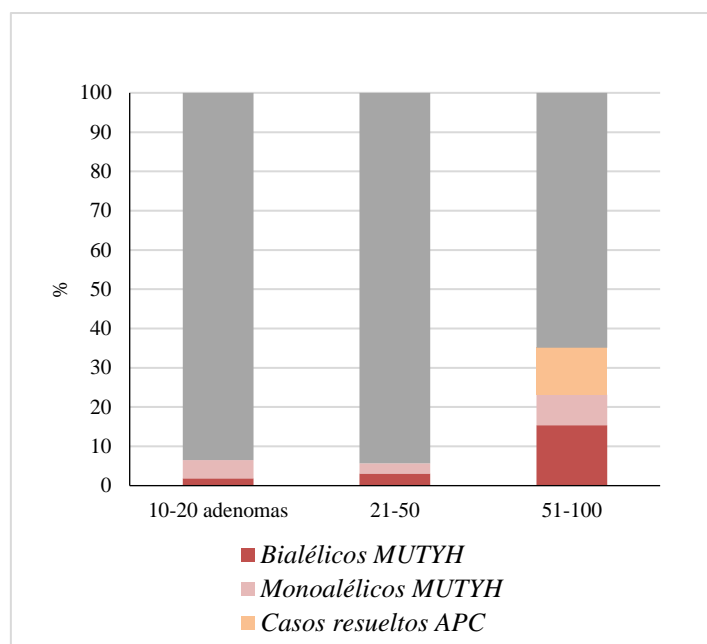


Figura 33. Resultados del cribado asistencial de las PAA agrupadas según N de adenomas. Se organizan en 3 grupos en función del número de adenomas detectados: 10-20 (N=259), 21-50 (N=195) y 51-100 (N=25).

2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE DE ESTUDIO PAAX

La descripción clínica de la cohorte de estudio PAAX se resume en la Tabla 8 y la descripción detallada de cada uno de los participantes se proporciona en el Anexo 8.

Características clínico-patológicas	Cohorte
N	159
% hombres (n)	73,6 (117)
Edad de diagnóstico; media (rango)	62,7 (33-80)
N adenomas; media (rango)	31,7 (10-100)
% Detección de pólipos hiperplásicos (n)	44 (70)
% Patrón de herencia dominante (n)	22,6 (36)
% Patrón de herencia recesivo (n)	30,2 (48)
% Casos aislados (n)	47,2 (75)
Poliposis adenomatosa atenuada propiamente dicha (n)	83,6 (133)

Tabla 8. Descripción de las características clínico-patológicas de la cohorte de estudio PAAX. PAA propiamente dicha: más de 20 adenomas acumulados o 10 adenomas sincrónicos.

3. CRIBADO GERMINAL DE GENES DE PREDISPOSICIÓN A LA PAA

3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SECUENCIACIÓN

Los resultados generales de la cobertura vertical (número de lecturas obtenidas para cada nucleótido de la región diana) obtenida tras la secuenciación del panel germinal de 22 genes en la cohorte de estudio, se esquematizan en la Figura 34, donde se indica la media de lecturas (895) y mediana (792 lecturas) del conjunto de las 159 muestras secuenciadas.

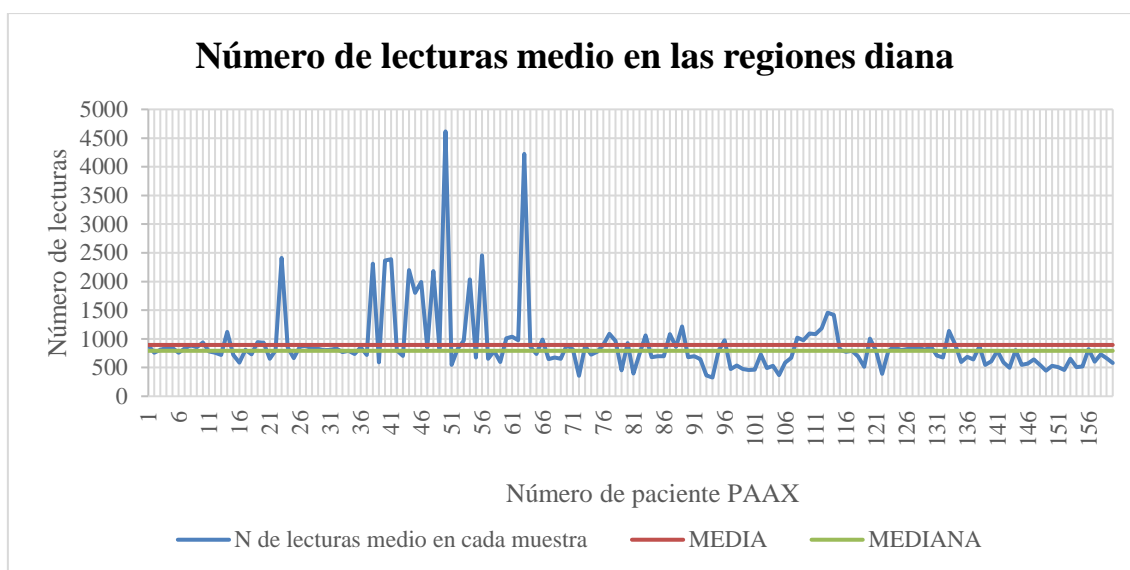


Figura 34. Representación gráfica del número de lecturas medio para cada muestra en las regiones diana analizadas. En color azul se muestra el número de lecturas medio de cada muestra, en color rojo la media de todas las muestras y en verde la mediana.

La cobertura horizontal media fue muy similar en la mayoría de las muestras, cubriéndose con un mínimo de 100 lecturas el 94,8% de todas las regiones diana en cada muestra. Solo se detectaron tres regiones diana con una cobertura insuficiente (<50 lecturas): exón 15 de *MUTYH* (NM_0012222), 13 de *APC* (NM_000038) y 4 de *MSH2* (NM_000251), por lo que se volvieron a analizar mediante la técnica HRM tal y como se indica en el apartado 3.3. de metodología.

3.2. VARIANTES DETECTADAS

El umbral para la detección de variantes germinales se fijó en una FA del 10%. Se detectaron un total de 9860 cambios, que tras aplicar la estrategia de filtrado (apartado 3.1.3) se redujo a 87 variantes, distribuidas en 18 de los 22 genes testados (Tabla 9). No

se detectaron variantes candidatas en los genes *SCG5*, *STK11*, *SMAD4* y *GREM1*. De forma global, se detectó un mayor número de variantes en los genes *APC*, *MUTYH* y *POLE*, mientras que los genes con un menor número de variantes fueron *MSH6* y *PTEN*. Estas variantes se detectaron en un total de 65 pacientes (40.9% de la cohorte de estudio).

GEN	VARIANTES TOTALES	VARIANTES ÚNICAS	PORTADORES	
			MONOALÉLICOS	BIALÉLICOS
<i>POLE</i>	14	7	13	
<i>APC</i>	12	12	12	
<i>MUTYH</i>	11	6	6	3
<i>POLD1</i>	7	5	7	
<i>MSH3</i>	6	2	6	
<i>MSH4</i>	5	5	5	
<i>NTHL1</i>	4	3	4	
<i>GALNT12</i>	4	1	4	
<i>BMP4</i>	3	3	3	
<i>MLH1</i>	3	2	3	
<i>MSH2</i>	3	3	3	
<i>BMPR1A</i>	3	2	3	
<i>PMS2</i>	3	3	3	
<i>AXIN2</i>	3	3	3	
<i>MLH3</i>	2	2	2	
<i>ENG</i>	2	2	2	
<i>PTEN</i>	1	1	1	
<i>MSH6</i>	1	1	1	
TOTAL	87	63	81	3

Tabla 9. Resultados obtenidos de la NGS después de aplicar aplicar la estrategia de filtrado. Se indica el número total de variantes obtenidas para cada gen, además del número de variantes diferentes y el número de pacientes portadores (monoalélicos o bialélicos) en cada gen.

Si organizamos las variantes según su biotipo, la mayoría fueron variantes *missense* seguidas de variantes localizadas en regiones de *splicing* (Figura 35).

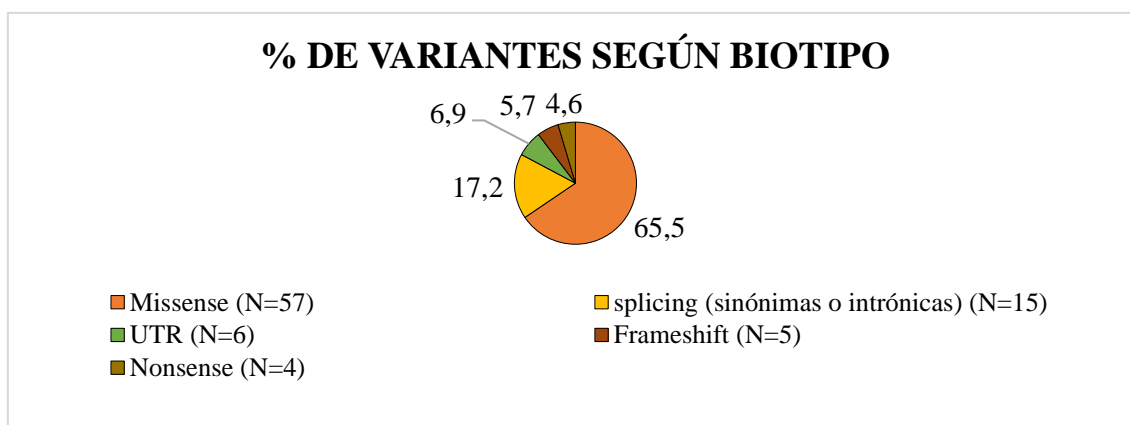


Figura 35. Porcentaje de variantes agrupadas según su biotipo.

De las 87 variantes obtenidas tras estos filtrados (Anexo 9), 78 se validaron mediante secuenciación Sanger y 9 no se lograron detectar por Sanger. 7 de las variantes no validadas se localizaron en regiones con mala calidad de secuenciación, y presentaron FA del 10.3% al 23%, la mayoría de ellas fueron detectadas solo en una de las dos direcciones de lectura (directa o reversa) y se localizaron en los extremos de las regiones amplificadas, lo que indica que se tratan de artefactos de la secuenciación. Las otras dos variantes no validadas se localizaron en el exón 12 del gen *PMS2*, y mostraron unas FA de 16,2% y 21,9%. El exón 12 de *PMS2* es una región que comparte homología con el pseudogen *PMS2CL*, por lo que se llevó a cabo una LR-PCR previa a la amplificación del exón 12 para amplificar selectivamente el gen *PMS2*, y no se detectó ninguna de las dos variantes, sugiriendo su localización en el pseudogen *PMS2CL*.

De las 78 variantes genéticas validadas se priorizaron, en base a las evidencias de patogenicidad y los predictores *in silico*, un total de 58 en 17 genes distintos.

La mayoría de las variantes priorizadas (39/58) se detectaron en los genes de predisposición primaria a la PA en un total de 35 pacientes (22% de la cohorte de estudio) pues se detectaron dos portadores bialélicos en *MUTYH* (PAAX-35 y PAAX-89) y dos dobles heterocigotos en *NTHL1* y *POLE* (PAAX-16 y PAAX-83). La clasificación de estas variantes se llevó a cabo mediante revisión en la literatura y bases de datos. Gracias a los estudios complementarios llevados a cabo en algunas variantes de significado incierto, se pudo clasificar 1 variante como probablemente patogénica (clase 4) y 1 como patogénica (clase 5). De manera opuesta, se pudieron reclasificar 2 variantes como benignas (clase 1) y 1 como probablemente benigna (clase 2). Resumiendo, 12 de las 39 variantes se clasificaron como patogénicas/probablemente patogénicas, 6 variantes como benignas/probablemente benignas y 21 se mantuvieron como variantes de significado desconocido (Tabla 10).

En los genes que predisponen de manera secundaria al desarrollo de adenomas se priorizaron 19 variantes, todas ellas en heterocigosis y en un total de 18 pacientes (11,3% de la población de estudio). Uno de los pacientes (PAAX-49) resultó ser doble portador en dos genes distintos: *BMPRIA* y *MSH6*. Tras los estudios de caracterización y la revisión de la literatura, se reclasificaron 4 variantes como benignas o probablemente benignas (Tabla 11).

GEN	ID	VARIANTE (HGVS)	rs ID	gnomAD	DOMINIO PROTEICO	CIGOSIDAD	CRITERIOS ACMG	CLASE
APC	3	c.266C>G p.(Ser89*)		Nd	NA	HETE	PVS1, PM2, PP1	5
	9	c.147_150del p.(Lys49Asnfs*20)		Nd	NA	HETE	PVS1, PM2, PP1	5
	34	c.1966C>G p.(Leu656Val)	rs577466163	0	ARM	HETE	PM2, PP3	3
	133	c.7399C>A p.(Pro2467Thr)	rs372305287	1.0e-04	APC basic	HETE	PM2, PP3	3
	136	c.8501A>C p.(His2834Pro)		Nd	EB1	HETE	PM2, PP3	3
	139	c.1240C>G p.(Arg414Cys)	rs137854567	Nd	-	HETE	PM2, PP3	3
	45	c.3199C>T p.(Gln1067*)	rs137854571	Nd	APC_u5	HETE	PVS1, PM2, PP1	5
AXIN2	55	c.2141G>A p.(Arg714Gln)	rs762872515	9e-6	-	HETE	PM2, PP3, BS3	3
	79	c.203G>A p.(Arg68Gln)	rs138056036	2.0e-04	AXIN1_TNKS	HETE	PM2, PP3	3
MUTYH	35	c.1187G>A p.(Gly396Asp)	rs36053993	4.8e-03	NUDIX 4	HETE	PM2, PM1, PS3, PS4	5
	35	c.739C>G p.(Arg247Gly)		Nd	ENDO3c	HETE	PM2, PP1, PM3, PM1	4
	37	c.1187G>A p.(Gly396Asp)	rs36053993	4.8e-03	NUDIX 4	HETE	PM2, PM1, PS3, PS4	5
	38	c.1187G>A p.(Gly396Asp)	rs36053993	4.8e-03	NUDIX 4	HETE	PM2, PM1, PS3, PS4	5
	61	c.667A>G p.(Ile223Val)	rs200872702	3.4e-04	ENDO3c	HOMO	PP3, PM2	3
	89	c.1187G>A p.(Gly396Asp)	rs36053993	4.8e-03	NUDIX 4	HETE	PM2, PM1, PS3, PS4	5
	89	c.1510_1517delinsCCAACAG CCA p.(Thr504Profs68)		Nd	NA	HETE	PVS1, PM2, PM3	5
	99	c.1187G>A p.(Gly396Asp)	rs36053993	4.8e-03	NUDIX 4	HETE	PM2, PM1, PS3, PS4	5
NTHL1	16	c.527T>C p.(Ile176Thr)	rs1805378	2.2e-03	ENDO3c	HETE	PM2, PP3	3
	75	c.856G>A p.(Gly286Ser)	rs139309757	3.2e-05	ENDO3c	HETE	PM2, PP3	3
	82	c.527T>C p.(Ile176Thr)	rs1805378	2.2e-03	ENDO3c	HETE	PM2, PP3	3
	83	c.268C>T p.(Gln90*)	rs150766139	2.0e-03	NA	HETE	PVS1, PM2, PP1	5
POLD1	116	c.2007-5C>T	rs199506387	2.5e-04	NA	HETE	PM2, BS2, BS3	1
	118	c.520C>T p.(Arg174Trp)	rs749334182	2.7e-05	POLBc-exo	HETE	PM2, PP3	3
	152	c.2052G>C p.(Gln684His)	rs144143245	6.3e-04	POLBc-pol	HETE	PM2, PP3	3
	157	c.1465G>A p.(Val489Met)	rs753244422	3.3e-05	POLBc-exo	HETE	PM2, PP3	3
	96	c.-48G>A	rs576035899	4.4e-03	NA	HETE	PM2	3
	102	c.-48G>A	rs576035899	4.4e-03	NA	HETE	PM2	3
	108	c.-48G>A	rs576035899	4.4e-03	NA	HETE	PM2	3
POLE	16	c.3857G>A p.(Arg1286His)	rs771823596	5.0e-05	low complexity	HETE	PM2, PP3	3

GEN	ID	VARIANTE (HGVS)	rs ID	gnomAD	DOMINIO PROTEICO	CIGOSIDAD	CRITERIOS ACMG	CLASE
	21	c.6716C>T p.(Ala2239Val)	rs190813054	8.0e-06	-	HETE	BS4, BP4	2
	83	c.141delG p.(Phe48Leufs*6)	rs761329565	0	NA	HETE	PVS1, PM2	4
	147	c.198G>A p.(Met66Ile)	rs764962999	0	-	HETE	PM2, PP3	3
	119	c-44C>A	rs754662026	2e-03	NA	HETE	PM2	3
	155	c-44C>A	rs754662026	2e-03	NA	HETE	PM2	3
MLH3	135	c.-153-6		Nd	-	HETE	PM2	3
GALNT12	17	c.907G>A p. (Asp303Asn)	rs145236923	1.9e-03	Glyco_transf_7C	HETE	BS2, BS4	1
	107	c.907G>A p. (Asp303Asn)	rs145236923	1.9e-03	Glyco_transf_7C	HETE	BS2, BS4	1
	146	c.907G>A p. (Asp303Asn)	rs145236923	1.9e-03	Glyco_transf_7C	HETE	BS2, BS4	1
	164	c.907G>A p. (Asp303Asn)	rs145236923	1.9e-03	Glyco_transf_7C	HETE	BS2, BS4	1

Tabla 10. Variantes priorizadas en los genes de predisposición primaria a la PAA. Se detalla la nomenclatura completa de las variantes según el HGVS, el rs (*Reference SNP*), la frecuencia en la base de datos poblacional *gnomad*, a fecha de 30 de Marzo de 2022, el dominio proteico que podría verse afectado según la herramienta *STRING database*, la cigosidad (HETE=heterocigoto), y los criterios y la clasificación de las variantes según las guías ACMG (Richards et al., 2015). ARM= repeticiones tipo armadillo, APC basic=dominio básico, EB1=dominio de unión a EB1, AXIN1_TNKS=dominio de unión a AXIN1, NUDIX 4=dominio C-terminal similar al pliegue NUDIX, ENDO3c=dominio endonucleasa, POLBc-exo=dominio exonucleasa, POLBc-pol=dominio polimerasa, low complexity=zona de baja complejidad, Glyco_transf_7C=dominio glicosil transferasa.

GEN	ID	VARIANTE DETECTADA (HGVS)	rs ID	gnomAD	DOMINIO PROTEICO	CIGOSIDAD	CRITERIOS ACMG	CLASE
BMP4	27	c.272C>G p. (Ser91Cys)	rs121912767	3.8e-04	TGFb-propeptide	HETE	PP1, PM2, PP3	3
	110	c.676C>T p. (Arg226Trp)	rs140590144	5.7e-04	TGFb-propeptide	HETE	PM2, PP3	3
	111	c.349G>T p. (Val117Leu)	rs527591537	7.8e-06	TGFb-propeptide	HETE	PM2, PP3	3
BMPRIA	49	c.1327C>T p. (Arg443Cys)	rs35619497	8.2e-04	Pkinase_tyr	HETE	PM2, PP3, PP1	3
	163	c.1327C>T p. (Arg443Cys)	rs35619497	8.2e-04	Pkinase_tyr	HETE	PM2, PP3, PP1	3
	136	c.917A>G p. (Tyr306Cys)	rs955604329	8.8e-06	Pkinase_tyr	HETE	PM2, PP3	3
ENG	29	c.1633G>A p. (Gly545Ser)	rs142896669	5.2e-04	ZP domain	HETE	PM2, PP3	3
MLH1	70	c.1050A>G p. (Pro350=)	rs137937003	5.3e-05	-	HETE	BP4, BS3, BP5, BS1, BP7	1
	140	c.1050A>G p. (Pro350=)	rs137937003	5.3e-05	-	HETE	BP4, BS3, BP5, BS1, BP7	1
MSH2	99	c.138C>G p. (His46Gln)	rs33946261	4.7e-04	MutS_I	HETE	BS3, BS1, PP3	1
	11	c.308A>G p. (Tyr103Cys)	rs63751173	Nd	MutS_I	HETE	PM2_supp, PP3_mod, BS3, BP5	2
	79	c.1790A>C p. (Asp597Ala)	rs548407418	0.000*	MUTSd	HETE	PM2, BS3	3
MSH4	104	c.764A>C p. (Glu255Ala)	rs756348001	7.8e-06	MutS_II	HETE	PM2, PP3	3
	106	c.1973C>T p. (Ser658Phe)		Nd	MutSac (MutS_V)	HETE	PM2, PP3	3
	122	c.990G>C p. (Arg330Ser)		Nd	MutSd (MutS_III)	HETE	PM2, PP3	3
	164	c.2080G>C p. (Ala694Pro)		Nd	MutSac (MutS_V)	HETE	PM2, PP3	3
MSH6	49	c.3788G>A p. (Arg1263His)	rs147852216	5.4e-05	MUTSd	HETE	PP3, BP5	3
PMS2	160	c.253C>G (Leu85Val)	rs1554304801	Nd	HATPase_c	HETE	PM2_supp, PP3_mod	3
PTEN	95	c.1003C>T p. (Arg335*)	rs121909231	Nd	PTEN_C2	HETE	PVS1, PS2, PM2	5

Tabla 11. Variantes priorizadas en los genes de predisposición secundaria a la PAA. Se detalla la nomenclatura completa de las variantes según el HGVS, el rs (*Reference SNP*), las frecuencias en la base de datos poblacional *gnomad* (a fecha de 30 de Marzo de 2022), el dominio proteico que podría verse afectado según la herramienta *STRING database* y la clasificación de la variante siguiendo los criterios de ACMG (Richards et al., 2015). Nd= no detectada. *= No detectada en población europea, pero sí en población latina con una MAF de 0.00008674. TGFb-propeptide=dominio propéptido TGFb, Pkinase_tyr=dominio tirosina quinasa, ZP domain= dominio de la zona pelúcida. Glyco_transf_7C= dominio glicosil transferasa, MUTSd= dominio de unión al ADN, MutSac= dominio ATPasa, HATPase_c= dominio ATPasa parecido al de histidina quinasa, PTEN_C2= dominio C2 en el extremo carboxilo terminal.

3.3. CASOS EXPLICADOS

3.3.1. VARIANTES EN APC

Se detectaron tres variantes truncantes en el gen *APC* en 3 pacientes con poliposis moderada y patrones de herencia recesiva.

APC: c.266C>G p.(Ser89*)

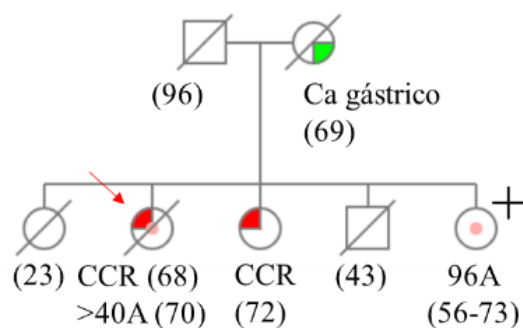
Variante detectada en el caso PAAX-3, al cual se le detectó un número de adenomas próximo a 100 a los 57 años (Figura 36). La variante se localiza en el exón 3 del gen *APC*, y es una alteración *nonsense* que genera un codón de parada prematuro, conduciendo a una pérdida de función por truncamiento prematuro de la proteína (criterio PVS1). La variante no se detecta en población general (criterio PM2-ACMG) y el estudio de segregación familiar permitió detectar un nuevo portador en un miembro afecto (hermana con PA), cumpliendo el criterio PP1 (Figura 36). La variante está clasificada en Clinvar como patogénica por dos laboratorios (VCV000230927.11). Con estos criterios la variante se clasifica como patogénica (clase 5).

APC: c.147_150del p.(Lys49Asnfs*20)

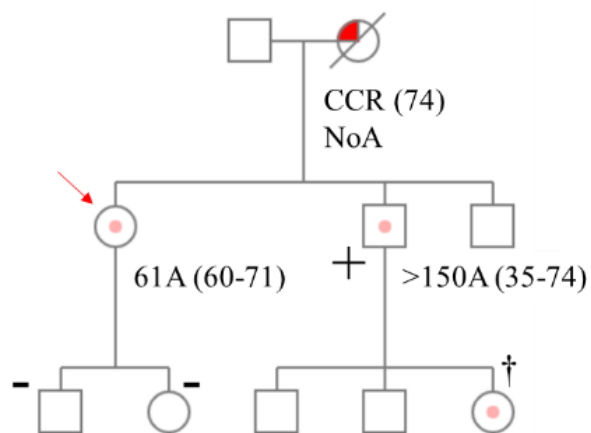
Esta variante se detectó en el paciente PAAX-9 con 61 adenomas a los 62 años (Figura 36). El cambio consiste en una deleción de 4 nucleótidos que conlleva a un cambio en la pauta de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro, que impide la síntesis de proteínas funcionales (PVS1). La variante no se detecta en población general (PM2) y el estudio de segregación permitió detectar la variante en un miembro afecto en la familia (hermano con PA), cumpliendo así el criterio PP1 (Figura 36). Está descrita en la literatura en individuos con PA (Gómez-Fernández et al., 2009; Rivera et al., 2011) (PP1) y clasificada en Clinvar como patogénica por cinco laboratorios (VCV000141368.19). En base a estas evidencias, la variante se clasifica como patogénica (clase 5).

APC: c.3199C>T p.(Gln1067*)

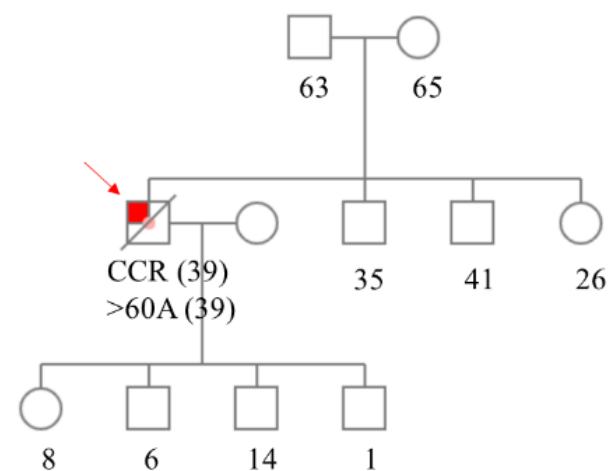
Variante detectada en el paciente PAAX-45, con más de 80 adenomas acumulados a los 39 años y CCR a una edad temprana (Figura 36). El cambio produce la aparición de un codón de parada prematuro, que resulta en la síntesis de proteínas no funcionales (PVS1). No se detecta en la población general (PM2). Ha sido reportada en varios pacientes afectados de PA (Lagarde et al., 2010) (PP1), y está descrita como patogénica en Clinvar por tres laboratorios distintos (VCV000000803.9). Con estas evidencias, la variante se clasifica como variante patogénica (clase 5).



PAX-3
APC: c.266C>G p.(Ser89*)



PAX-9
APC: c.147_150del p.(Lys49Asn*20)



PAX-45
APC: c.3199C>T p.(Gln1067*)

Figura 36. Árboles genéticos de los pacientes portadores de variantes patogénicas en el gen APC. Con una flecha roja se indica el caso índice de cada familia. A= Adenomas, + = portador, - = no portador, †Poliposis diagnosticada después de detectar la variante familiar.

3.3.2. VARIANTES EN *MUTYH*

La variante **c.1187G>A p.(Arg396Asp)**, es una variante patogénica y recurrente en población occidental (Al-Tassan et al., 2002). Está descrita en bases de datos poblacionales con una frecuencia del 0,3% en población total y se ha visto que tanto los homocigotos como los heterocigotos compuestos segregan con la enfermedad (Aretz et al., 2006) (PS4, PM1 y PP1). Existen estudios funcionales *in vitro* que demuestran una fuerte disminución de la actividad de la proteína (PS3) (Al-Tassan et al., 2002). La variante se detectó en heterocigosis en 5 pacientes (PAAX-35, 37, 38, 89 y 99) con patrones de herencia recesivos.

De los 5 pacientes portadores, 2 mostraron una segunda variante en *trans*. En concreto, la variante missense **c.739C>G p.(Arg247Gly)** en el paciente PAAX-35 y **c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p.(Thr504Profs*68)** en el paciente PAAX-89.

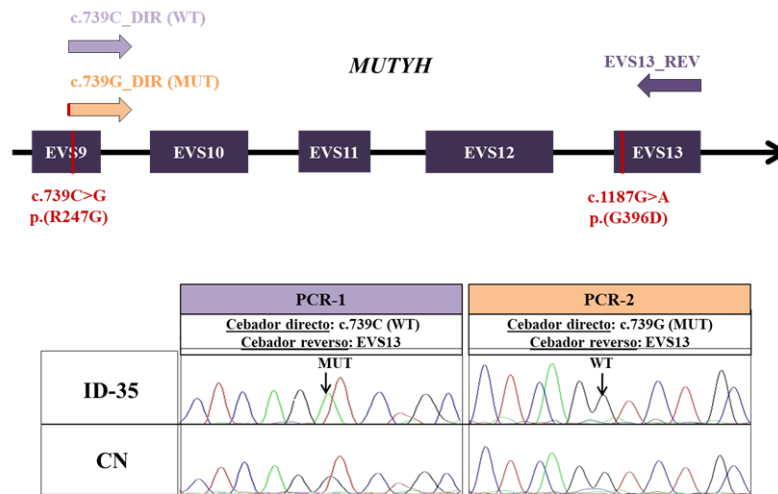
***MUTYH*: c.739C>G p.(Arg247Gly)**

Variante detectada en *trans* (PM3) (Figura 37A) con la variante patogénica recurrente **c.1187G>A; p.(Gly396Asp)** en el paciente PAAX-35, diagnosticado con más de 20 adenomas entre los 35 y los 40 años. Ambas variantes se detectaron en un hermano afecto, con más de 50 adenomas y CCR a los 43 años (PP1) (Figura 37B).

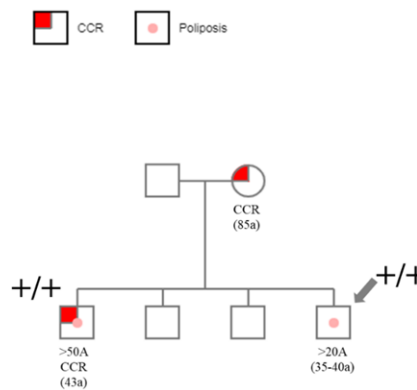
Esta variante no está descrita en la población general (PM2). Se localiza en el dominio hMSH6 (dominio de unión a MSH6), y se ha demostrado que alteraciones *missense* ubicadas en este dominio afectan a la unión de la adenina con la 8-oxoguanina y a la actividad glicosilasa (PM1) (Bai et al., 2005).

Tras secuenciar el tejido adenomatoso del probando para detectar mutaciones somáticas, se detectaron cambios G>T en *APC*, *KRAS*, *TP53* y *MAP2K1* (Figura 37C), demostrando la deficiencia en el sistema de reparación de 8-OHdG (PP4). En base a todas estas evidencias, la variante **c.739C>G; p. (Arg247Gly)** se reclasifica como probablemente patogénica (clase 4).

A. Amplificación alelo-específica



B. Árbol genético



C. Mutaciones somáticas

TEJIDO	HISTOLOGÍA	GEN	MUTACIÓN	NOMENCLATURA (HGVS)
AD1	ATDBG	APC	GG>GG/AT	c.4479_4480delGGinsAT p.(Glu1494*)
		MAP2K1	G>G/T	c.171G>T p.(Lys57Asn)
		TP53	G>G/T	c.859G>T p.(Glu287*)
AD2	ATDBG	APC	G>G/T	c.4230C>A p.(Cys1410*)
		APC	C>C/T	c.2626C>T p.(Arg876*)
		KRAS	G>G/T	c.37G>T p.(Gly13Cys)

Figura 37. Caracterización de la variante *MUTYH*:c.739C>G p.(Arg247Gly) detectada en el paciente PAAX-35. A: Amplificación alelo específica para confirmar la configuración trans de las variantes. PCR-1=amplificación específica del alelo salvaje c.739C con el oligonucleótido directo específico c.739C_DIR y el reverso EVS13_REV. La secuenciación del alelo c.739C muestra solo el alelo mutado c.1187A. PCR-2=Amplificación específica del alelo mutado c.739G con el oligonucleótido directo específico c.739G_DIR y el reverso EVS13_REV. Tras la secuenciación Sanger, se detectó el alelo salvaje c.1187G. Por lo tanto, c.739C> G y c.1187G> A se encuentran en diferentes alelos o fase (*trans*). DIR=Directo, REV=Reverso, CN=Control negativo, WT=tipo salvaje, MUT=mutado. B: Árbol genético de las dos variantes con la enfermedad. El caso índice se indica con una flecha gris. A=adenoma, a=años, +/-=doble heterocigoto. C: Mutaciones somáticas detectadas en dos adenomas (AD1 y AD2) del paciente PAAX-35. ATDBG: Adenoma tubular con displasia de bajo grado.

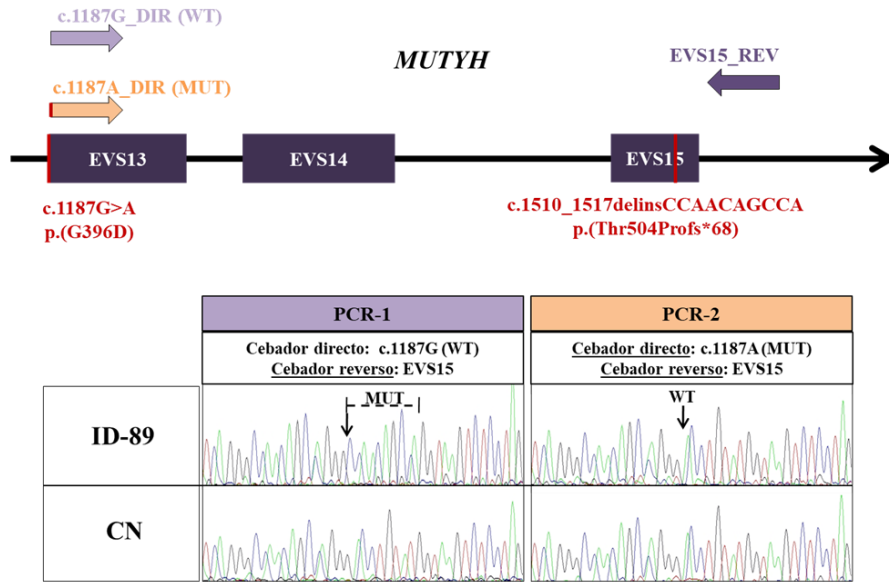
MUTYH: c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p.(Thr504Profs*68)

Variante detectada en *trans* (PM3) (Figura 38A) con la variante patogénica recurrente c.1187G>A p.(Gly396Asp), en el paciente PAAX-89, con más de 40 adenomas a los 57 años y sin antecedentes familiares de poliposis o CCR (Figura 38).

Esta variante no está descrita en la población general (PM2). La secuenciación del ADNc sintetizado a partir del ARN de sangre periférica del paciente demostró una extensión de 22 aminoácidos posteriores al codón de parada, afectando al extremo 3' de la secuencia codificante y alterando con ello la secuencia de aminoácidos de todo el dominio de unión al PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación), que es esencial para la actividad de MUTYH durante la replicación del ADN (PVS1) (van Loon & Hübscher, 2009). Además, se ha demostrado que mutaciones puntuales en el dominio de unión al PCNA disminuyen su actividad enzimática (Brinkmeyer & David, 2015).

En esta familia no fue posible llevar a cabo estudios de segregación de la variante con la enfermedad (Figura 38C), pero el análisis del ADN procedente de tejido adenomatoso mostró cambios G>T en *KRAS* (PP4) (Figura 38B). En base a todas estas evidencias, se pudo clasificar la variante como patogénica (clase 5).

A. Amplificación alelo-específica



C. Árbol genético



B. Mutaciones somáticas en KRAS

MUESTRA	AD1	AD2
HISTOLOGÍA	ATDBG	ATDBG
CAMBIO	G>G/T	G>G/T
TRIPLETE	GGT>TGT	GGT>TGT
NOMENCLATURA (HGVS)	c.34G>T p.(Gly12Cis)	c.34G>T p.(Gly12Cis)

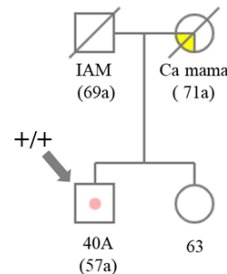


Figura 38. Caracterización de la variante *MUTYH*: c.1510_1517delinsCCAACAGCCA; p. (Thr504Profs*68) detectada en el paciente PAAX-89. A: Esquema de la amplificación alelo específica para confirmar la configuración trans de las variantes: PCR-1=Amplificación del alelo salvaje c.1187G con el oligonucleótido directo específico c.1187G_DIR y el reverso EVS15_REV que se encuentra posterior a la posición de la segunda variante c.1510_1517delinsCCAACAGCCA. Tras la secuenciación Sanger, se detectó el alelo mutado c.1510_1517delinsCCAACAGCCA. PCR-2=Amplificación del alelo mutado c.1187A con el oligonucleótido directo específico c.1187A_DIR y el reverso EVS15_REV. Tras la secuenciación Sanger, se detectó el alelo salvaje en las posiciones c.1510_1517. Por lo tanto, c.1510_1517delinsCCAACAGCCA y c.1187G> A se encuentran en diferentes alelos o fase (*trans*). DIR=Directo, REV=Reverso, CN=Control negativo, WT=tipo salvaje, MUT=mutado. B. Mutaciones somáticas en *KRAS* en dos adenomas (AD1 y AD2) del paciente. ATDBG: adenoma tubular con displasia de bajo grado. C: Árbol genético de las dos variantes con la enfermedad. El caso índice se indica con una flecha gris. IAM=Infarto agudo de miocardio, Ca mama=Cáncer de mama, A=adenoma, a=años, +/+ =doble heterocigoto.

3.3.3. VARIANTE EN *PTEN*

Se detectó la variante ***PTEN*: c.1003C>T p.(Arg335*)** en el paciente PAAX-95, diagnosticado de CCR a los 52 años, cáncer de próstata a los 67 años, PAA a los 74 años, y numerosos lipomas (Figura 39). La poliposis muestra un claro predominio adenomatoso con presencia de algún pólipo inflamatorio y ausencia de pólipos hamartomatosos (histología revisada por dos patólogos de manera independiente). La variante conlleva la aparición de un codón de parada prematuro, truncando la proteína en el dominio C2 (PVS1), el cual posiciona la parte catalítica de la proteína en la membrana. Estudios *in vitro* demuestran que esta variante reduce significativamente la expresión de la proteína, aumentando significativamente la actividad del proteasoma (He et al., 2013) (PS3). La variante no está descrita en población general (PM2), sin embargo, en clinvar existen 33 entradas de esta variante (VCV000007833.54), 29 de ellas como variante patogénica. También se han descrito en la literatura casos de novo (Tok Çelebi et al., 1999; Zhou et al., 2000) (PS2).

Con todas estas evidencias y siguiendo las recomendaciones del panel de expertos de ACMG-ClinGen publicadas en el 2018 para la clasificación de variantes en este gen (Mester et al., 2018), la variante se clasifica como patogénica (clase 5).

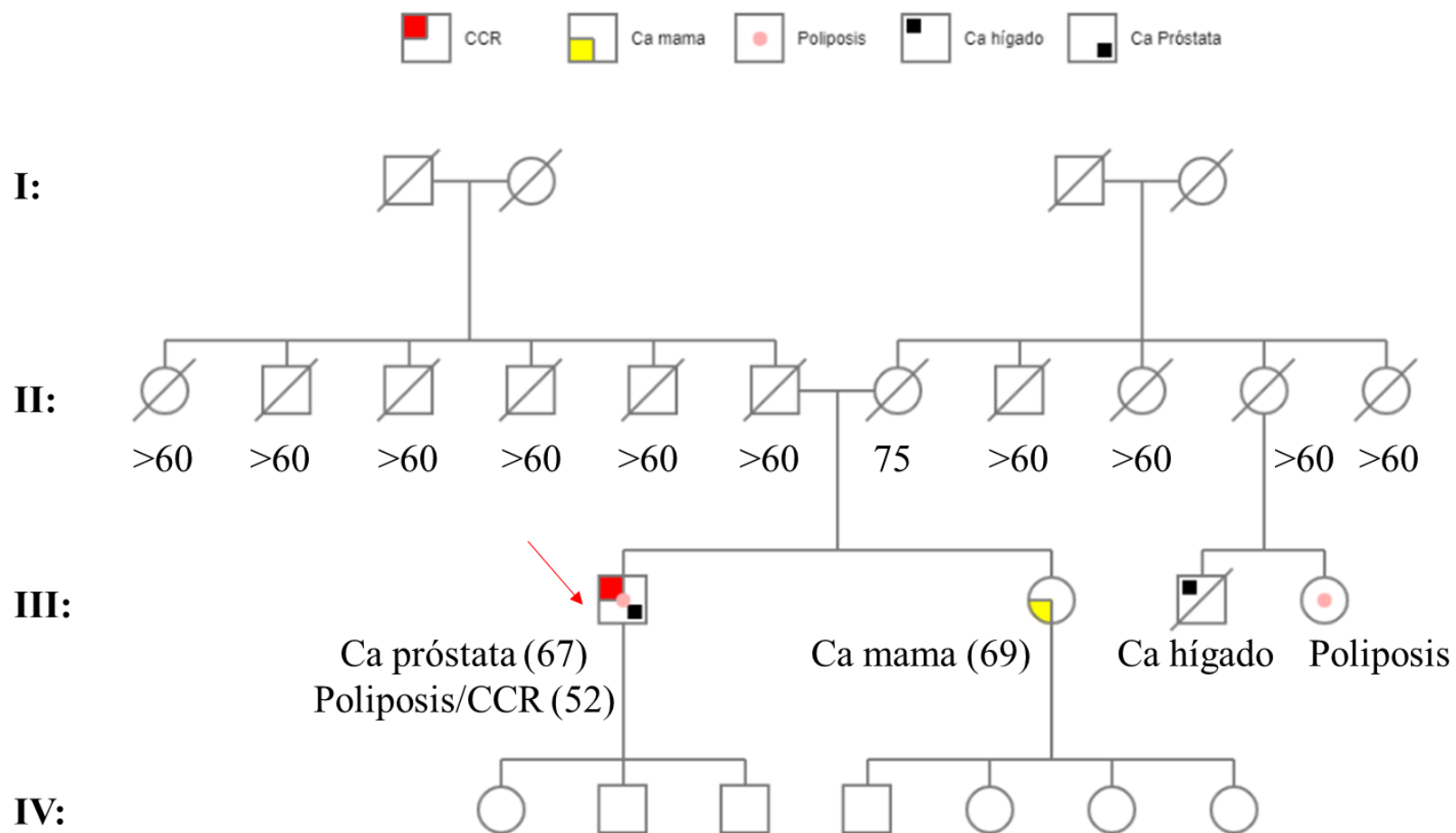


Figura 39. Árbol genético del paciente portador de la variante patogénica en el gen *PTEN*.

3.4. VARIANTES CO-OCURRENTES EN *POLE* Y *NTHLI*

Se detectaron 2 variantes truncantes en los genes *NTHLI* y *POLE*, co-ocurrentes en la paciente PAAX-83, diagnosticada de PAA a los 70 años y sin historia familiar de poliposis o CCR.

La variante ***NTHLI:c.268C>T p.(Gln90*)*** es una variante que origina un codón de parada prematuro, impidiendo la síntesis de proteínas funcionales (PVS1). Es una variante patogénica y recurrente en población holandesa. Se ha descrito por primera vez en homocigosis en al menos 7 pacientes con múltiples adenomas (con o sin CCR), procedentes de 3 familias holandesas distintas, mostrando una falta de actividad reparadora de la proteína (PS3) (Weren et al., 2015). Posteriormente se ha descrito tanto en homocigosis como en co-ocurrencia con otras variantes patogénicas en *NTHLI* en un mayor número de familias con poliposis, CCR y múltiples tumores (PP1) (Rivera et al., 2015; Belhadj et al., 2017; Chubb et al., 2016). Todas estas evidencias permiten clasificarla como variante patogénica (clase 5).

La variante ***POLE:c.141delG p.(Phe48Leufs*6)*** consiste en la deleción de un nucleótido, que genera un codón de parada prematuro (anterior tanto al dominio polimerasa como al dominio exonucleasa de la proteína) impidiendo la síntesis de proteínas funcionales (Figura 40A). No está descrita en la población general y no existen entradas en ClinVar. Esta variante no puede ser clasificada según las guías ACMG porque su mecanismo de patogenicidad no consiste en la inactivación de la proteína, sino en la inactivación selectiva del dominio exonucleasa, manteniendo intacta la actividad polimerasa. Por lo tanto, la variante *POLE: c.141delG p.(Phe48Leufs*6)* no se asocia al síndrome de PPAP.

Con el fin de investigar la implicación de estas dos variantes en el desarrollo de adenomas y CCR, se llevaron a cabo estudios complementarios. Se analizaron las variantes en sus dos hijas, detectándose únicamente la variante *POLE:c.141delG p.(Phe48Leufs*6)* en una, con un diagnóstico de adenoma tubular con displasia de bajo grado a los 46 años (Figura 40B). Por otro lado, se analizaron mutaciones somáticas en 4 tejidos adenomatosos y un adenocarcinoma nivel 0 de Haggit de la paciente, detectándose 13 mutaciones: 2 indels, 4 cambios C>A y 7 cambios C>T (Anexo 10).

Además de estos análisis, se llevaron a cabo estudios alelo específicos de expresión de ARN tanto para el alelo salvaje de *NTHL1* como de *POLE*. La cuantificación de los alelos salvaje se llevó a cabo en 3 adenomas (83AD1, 83AD3 y 83AD4), un adenocarcinoma (83AC1) y un tejido normal de colon de la paciente (83COLON). La expresión del alelo salvaje de *POLE* en el tejido colónico normal de la portadora (83COLON) no mostró cambios significativos con respecto al control de tejidos colónicos sanos (FD= $0,94 \pm 0,27$; $\rho = 0,82$) (Figura 40C), mientras que en *NTHL1* si se observaron diferencias significativas, siendo mayor la expresión de *NTHL1* en tejidos colónicos sanos no portadores (FD = $0,30 \pm 0,08$, $\rho = 0,004$) (Figura 40D).

Se observó una sobreexpresión de los alelos salvajes de *POLE* y de *NTHL1* en el grupo control de CCR con respecto a los tejidos sanos, tanto de controles como del probando (FD *POLE*= $2,06 \pm 0,08$, $\rho=0,003$; FD *NTHL1*= $1,87 \pm 0,28$, $\rho=0,018$). Todos los adenomas y el adenocarcinoma del probando mostraron una disminución en la expresión del alelo salvaje de *POLE* (FD promedio = $0,46 \pm 0,20$, $\rho < 0,001$) en comparación con el tejido sano, mientras que en el alelo salvaje de *NTHL1* se observó lo contrario, mostrando una sobreexpresión significativa en un adenoma y adenocarcinoma del probando en comparación con su tejido sano ($\rho=0,0156$ y $\rho < 0,001$, respectivamente) (Figura 40C y D).

Resumiendo, los tejidos adenomatosos y adenocarcinomatoso de la paciente portadora muestran un descenso significativo de los niveles de ARNm proveniente del alelo salvaje de *POLE*, mientras que los niveles de alelo salvaje de *NTHL1* se sobreexpresan en el tejido adenomatoso y adenocarcinomatoso.

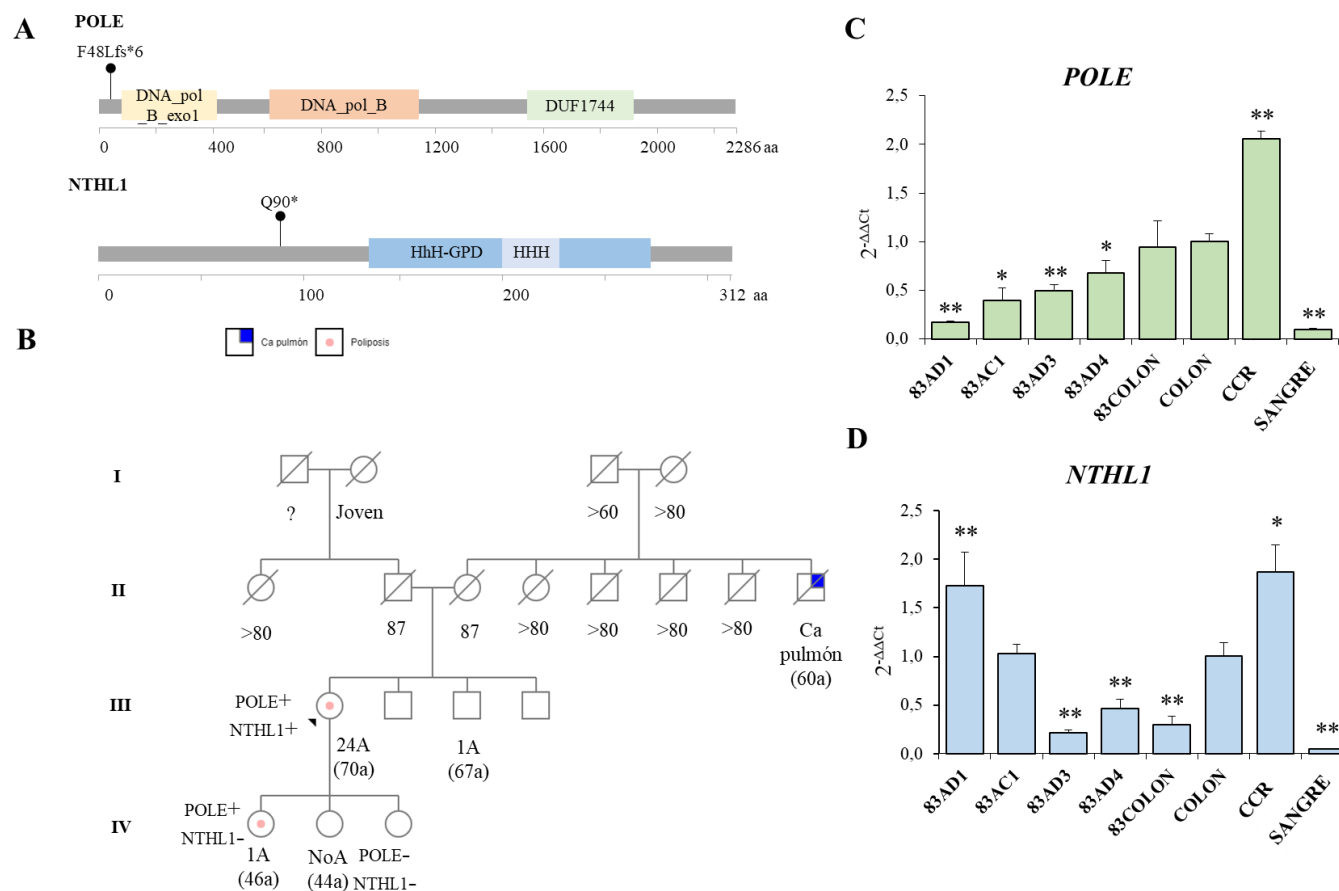


Figura 40. Caracterización del doble heterocigoto en *POLE* y *NTHL1*. A: Dominios proteicos de *POLE* y *NTHL1* y ubicación de las variantes detectadas en el paciente PAAX-83. B: Árbol genético; + = portador; - = no portador; A = adenoma. C: Expresión del alelo salvaje de *POLE* en muestras de ADNc de sangre y tejido. D: Expresión de alelo salvaje de *NTHL1*. La muestra COLON (mezcla de ADN de diferentes tejidos colónicos sanos) se ha utilizado como muestra de referencia en los ensayos *NTHL1* y *POLE*. Los valores significativos de p se indican con * ($p < 0,05$) y ** ($p < 0,01$). Cada muestra se analizó por triplicado. AC = adenocarcinoma; AD = adenoma; CCR = cáncer colorrectal.

3.5. VARIANTE EN *GALNT12*

Se detectó la variante *GALNT12:c.907G>A p.(Asp303Asn)* en los pacientes PAAX-17, PAAX-107, PAAX-146 y PAAX-164, todos ellos diagnosticados de PAA tardía, y con antecedentes familiares de adenomas y/o CCR (Tabla 12 y Figura 41).

Paciente	Criterio de inclusión	Edad de diagnóstico	Número de adenomas	Cáncer	
				Tipo	Edad
17	20MA	71	>50	No	-
107	10SA	80	12	No	-
146	20MA	50	>30	No	-
164	20MA	78	37	CCR/Renal	78/76

Tabla 12. Características clínicas de los portadores de la variante *GALNT12:c.907G>A p.(Asp303Asn)*. MA=Adenomas metacrónicos, SA=Adenomas sincrónicos.

El cambio de nucleótido implica la sustitución de un aminoácido en el dominio funcional glicosiltransferasa de la proteína (Figura 42A y B). Presenta una frecuencia menor del 0,3% en población general y ha sido descrita como posible alelo asociado a la PAA (Clarke et al., 2012), de ahí el interés para su caracterización. Se llevaron a cabo estudios de segregación familiar, análisis de LOH, de expresión proteica mediante IHQ y un estudio de casos y controles.

Los estudios de segregación se pudieron llevar a cabo en tres de las cuatro familias (Figura 41); es de destacar que solo un familiar afecto, con diagnóstico de poliposis (PAAX1_II:8) resultó ser portador de la variante. Los estudios de LOH se llevaron a cabo en 3 adenomas tubulares con displasia de bajo grado, 2 adenomas tubulares con displasia de alto grado y un CCR de los pacientes PAAX-17, PAAX-107 y PAAX-164. No se detectó LOH del alelo *c.907G>A p.(Asp303Asn)* en ninguna de las muestras. Para analizar la posible disminución en la actividad de *GALNT12*, y con ella la glicosilación aberrante de proteínas en adenomas portadores, se analizaron los patrones de glicosilación de MUC1 (principal diana de *GALNT12*) en los mismos 5 adenomas evaluados para LOH y sus tejidos normales colindantes de manera similar a (Guda et al., 2009). Cualquier alteración en la actividad de glicosilación implicaría un aumento en los niveles de MUC1 no glicosilada pero no en los niveles de MUC1 totales (Figura 42C). No se detectaron diferencias en el patrón de glicosilación de MUC1 en ninguno de los pares de tejido adenomatoso-normal (Figura 42D).

Además de estos experimentos, se realizó un estudio de casos y controles (Tabla 13), en el que no se detectaron diferencias significativas en la frecuencia del alelo alterado c.907A entre ambas cohortes (p -valor: 0,496 y OR: 1,59).

COHORTE	N	ALT	REF	MAF	p-valor	OR
CASOS (PAA + VAL)	451	4	898	0,004	0,496	1,59
CONTROLES	714	4	1424	0,003		

Tabla 13. Estudio de casos y controles para la variante *GALNT12:c.907G>A p. (D303N)*. Se indica el número de individuos incluidos en el estudio, el número de alelos alterados y normales, la MAF de cada grupo y los resultados del análisis estadístico. ALT: Número de alelos alterados, REF: Número de alelos de referencia, MAF: Frecuencia del alelo minoritario, OR: Odds ratio.

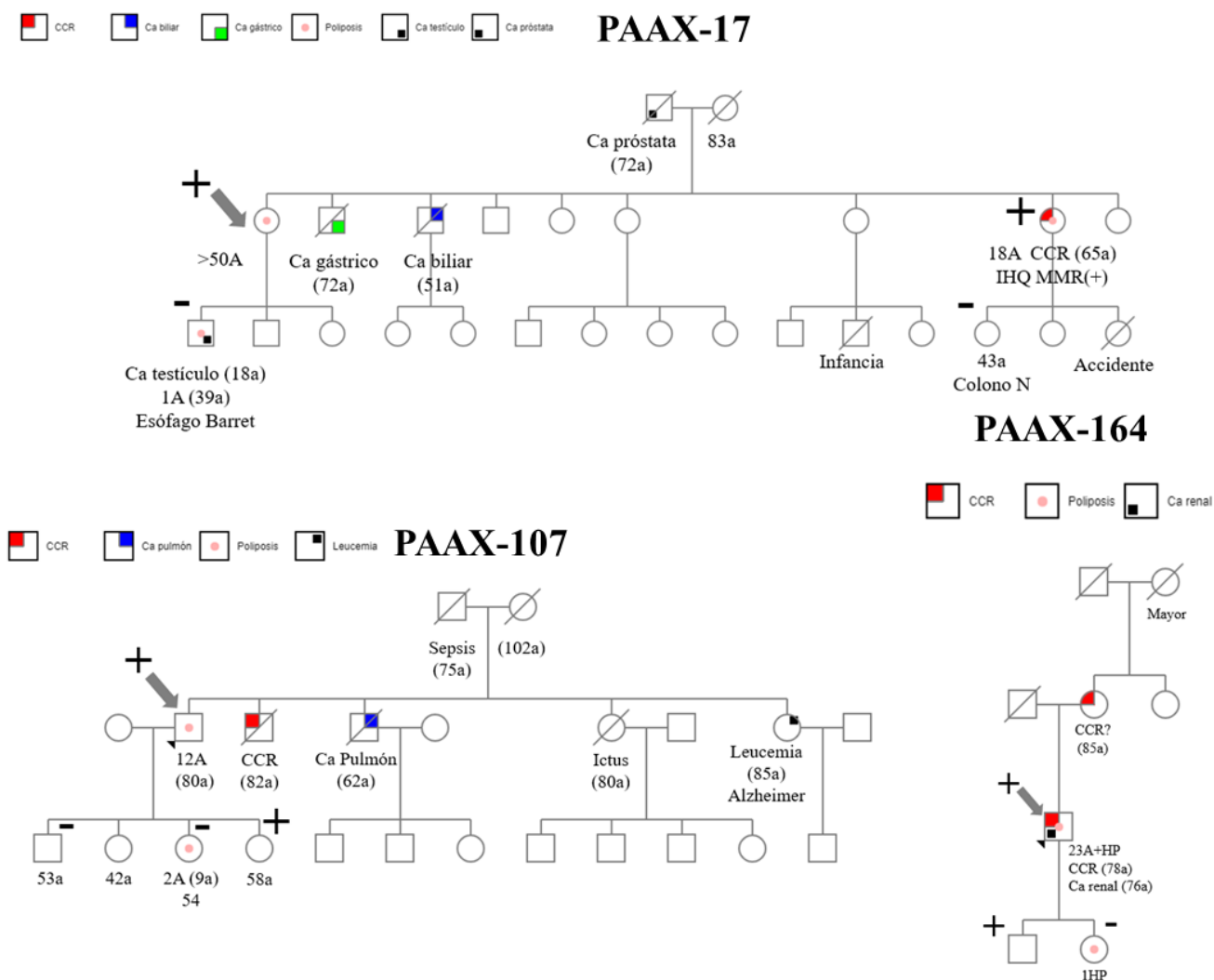


Figura 41. Árboles genéticos de la variante *GALNT2:c.907G>A p.(Asp303Asn)*. A: adenomas, a: años, Ca: cáncer, colono N: Colonoscopia normal.

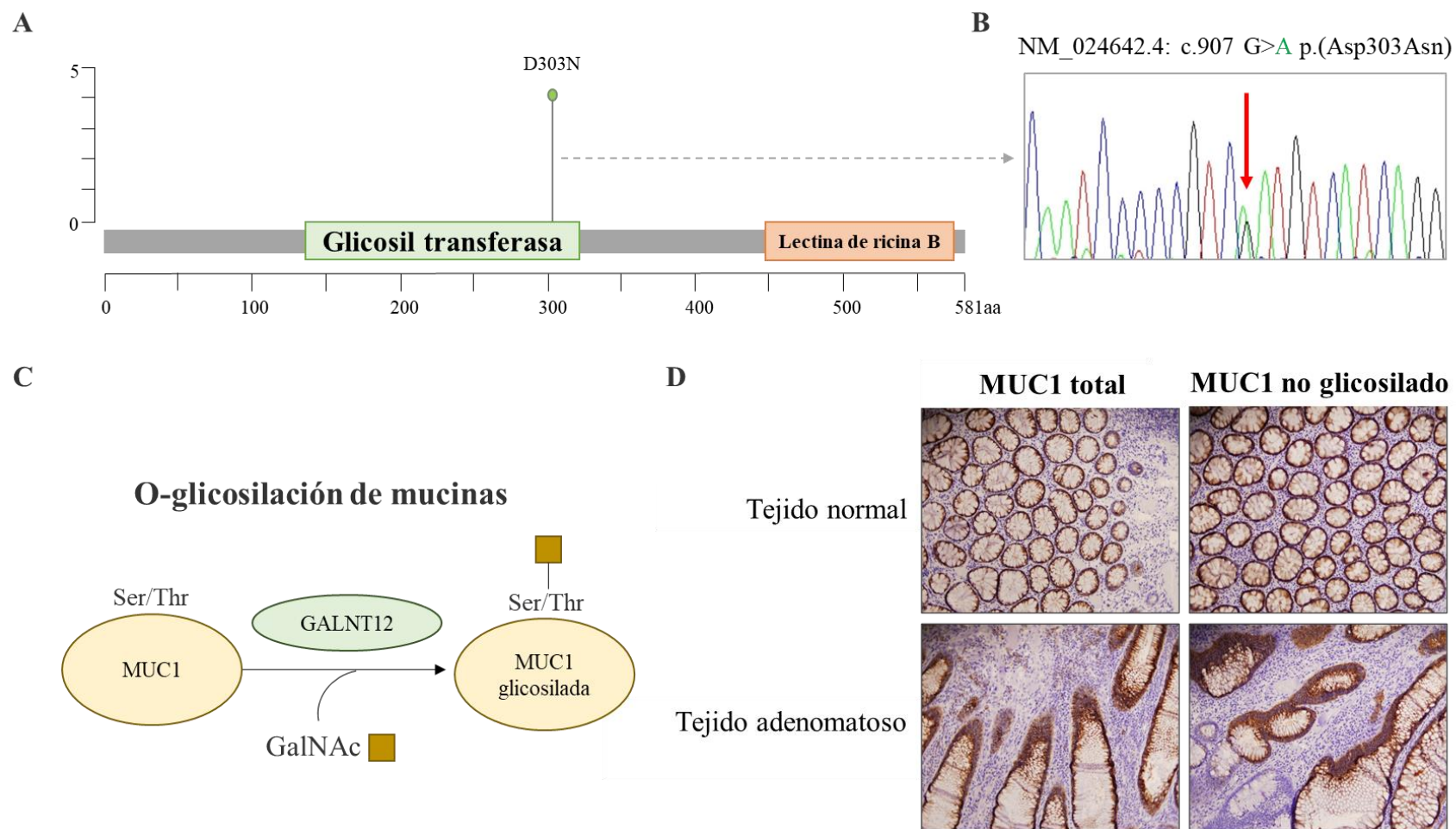


Figura 42. Caracterización de la variante *GALNT12*:c.907G>A p. (Asp303Asn). Se muestra A) el dominio afectado, B) el electroferograma de la secuencia genética de uno de los portadores, C) el esquema del proceso de O-glicosilación de mucinas y D) las imágenes de la IHQ de muc1 total y no glicosilada en el tejido adenomatoso y normal de uno de los portadores.

3.6. OTRAS VARIANTES RECLASIFICADAS COMO BENIGNAS O PROBABLEMENTE BENIGNAS

En los genes de predisposición primaria, además de la variante *GALNT12*: D303N, se logró reclasificar la variante *POLD1*:c.2007-5C>T como benigna y la variante *POLE*:c.6716C>T p.(Ala2239Val) como probablemente benigna.

La reclasificación de la variante en *POLD1*: c.2007-5C>T, detectada en el paciente PAAX-116, fue posible gracias al análisis de ADNc del paciente (Figura 27), en el que no se detectó ninguna alteración en dicho proceso (BS3).

La variante *POLE*: c.6716C>T p.(Ala2239Val) en el paciente PAAX-21 se reclasificó a clase 2 debido al resultado del estudio de segregación familiar, ya que se detectó en homocigosis tanto en un miembro afecto de PAA (Figura 43, II:3) como en uno sano (Figura 43, II:5) y estaba ausente en otro miembro afecto (Figura 43, I:1) (BS4).

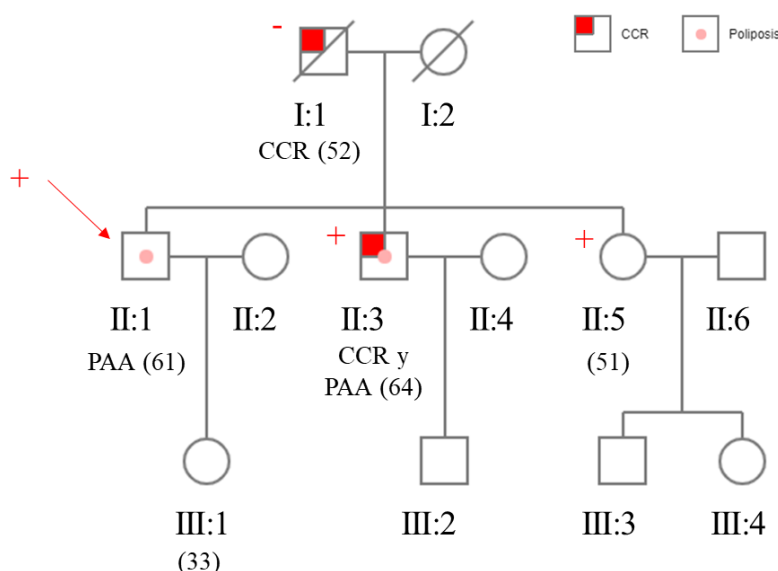


Figura 43. Árbol genético del paciente PAAX-21. +: portador, -: no portador.

En los genes de predisposición secundaria al desarrollo de adenomas, se logró reclasificar la variante *MLH1*: c.1050A>G p. (Pro350=). Esta variante sinónima, detectada en los pacientes PAAX-70 y PAAX-140, se reclasificó gracias al estudio de ADNc de uno de ellos (Figura 27), en el que no se detectó ninguna alteración en el proceso de splicing (BS3). El estudio molecular del tejido en uno de los pacientes resultó ser estable a microsatélites (BP5). Esas evidencias sumadas a la MAF de la variante en la población de gnomad (BS1), aplicando los umbrales de las guías ACMG-InSIGHT, y a la conservación del nucleótido (BP4 y BP7), permitió reclasificar la variante como benigna.

4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ADENOMAS

Para el análisis somático de la cohorte de estudio, se consiguieron reclutar 118 tejidos procedentes de 85 pacientes PAAX. Las características clínico-patológicas de esta cohorte se detallan en la Tabla 14 y los resultados detallados de todos ellos se muestran en el Anexo 10.

Características clínico-patológicas	Cohorte
N	85
% hombres (n)	68,2 (58)
Edad de diagnóstico; media (rango)	61,3 (33-80)
N adenomas; media (rango)	31,6 (10-100)
% Detección de pólipos hiperplásicos (n)	49,4 (42)

Tabla 14. Características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes en la que se llevó a cabo el estudio molecular en adenomas.

4.1. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE ADENOMAS

Los resultados de los estudios de MSI, *BRAF*:V600E y metilación del promotor de *MLH1* se esquematizan en la Figura 44.

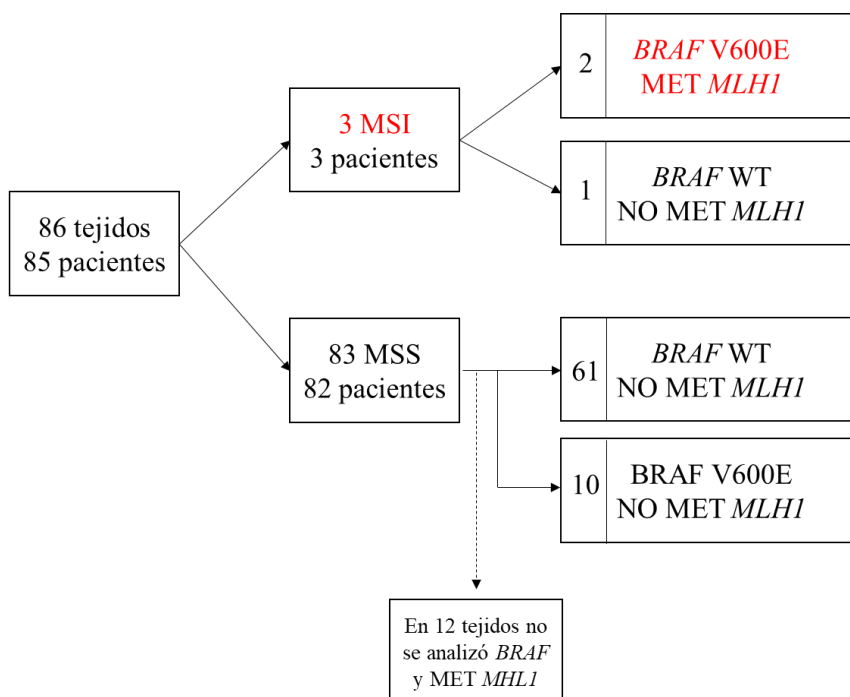


Figura 44. Esquema de los estudios moleculares en tejido adenomatoso de pacientes PAAX.

De los 118 tejidos incluidos en la cohorte inicial, se consiguieron reclutar 86 tejidos adenomatosos y/o tumorales (de 85 pacientes) para estudiar la inestabilidad de microsatélites. De todos ellos, 3 resultaron inestables (3,5%) mientras que 83 fueron estables (96,5%). De los 3 adenomas MSI-H, 2 presentaron tanto la mutación *BRAF*:V600E como metilación en el promotor de *MLH1* (2,8% de los tejidos analizados).

4.2. CRIBADO DE MUTACIONES *HOTSPOTS*

Se realizó el cribado de mutaciones *hotspots* en 89 tejidos procedentes de 58 pacientes (Tabla 15). En 30 pacientes se analizó un único tejido adenomatoso, mientras que en los 28 restantes se estudiaron al menos dos.

Características clínico-patológicas	Cohorte
N	58
% hombres (n)	70,7 (41)
Edad de diagnóstico; media (rango)	60 (33-80)
N adenomas; media (rango)	31,5 (10-100)
% Detección de pólipos hiperplásicos (n)	48,3 (28)

Tabla 15. Características clínico-patológicas de la cohorte de 58 pacientes en la que se llevó a cabo el TruSight Tumor 26.

Teniendo en cuenta la arquitectura y el grado de displasia, la mayoría eran adenomas tubulares (71,9%) y mostraban displasia de bajo grado (82%) (Figura 45A y B).

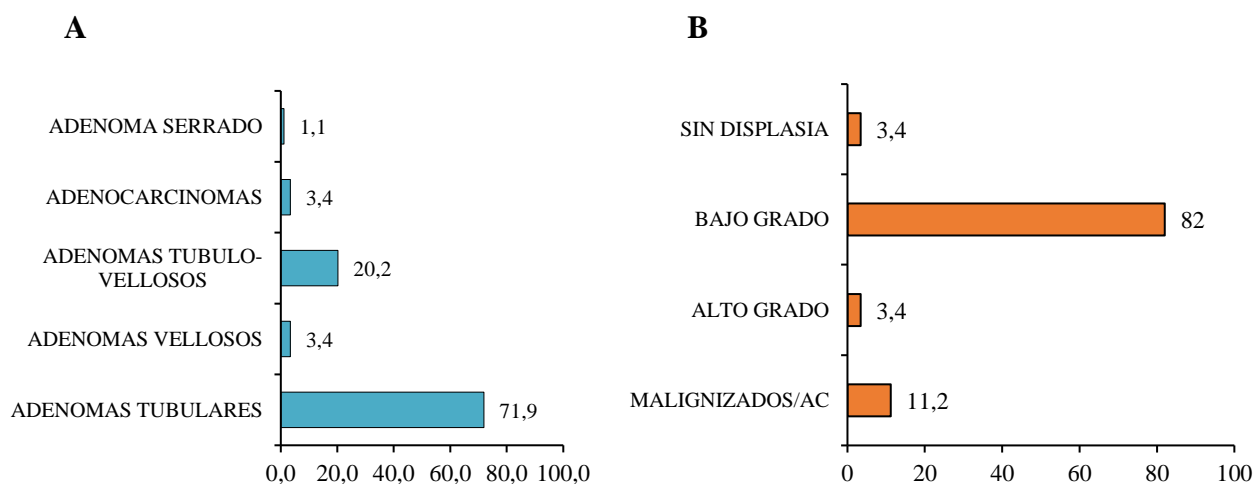


Figura 45. Muestras analizadas mediante TruSight Tumor 26. A: Porcentaje de muestras agrupadas según su arquitectura. B: Porcentaje de muestras agrupadas según su grado de displasia. AC=Adenocarcinomas.

4.2.1. VARIANTES DETECTADAS

Teniendo en cuenta el análisis conjunto de las muestras, tras llevar a cabo el primer filtrado en función de la calidad de la secuenciación se obtuvieron 966 variantes en 20 de los 26 genes testados.

Al filtrar estas variantes según la frecuencia poblacional se obtuvieron 192 variantes distribuidas en las 89 muestras estudiadas, lo que corresponde a una media de aproximadamente 2 variantes (rango de entre 1-8 variantes) por cada muestra analizada.

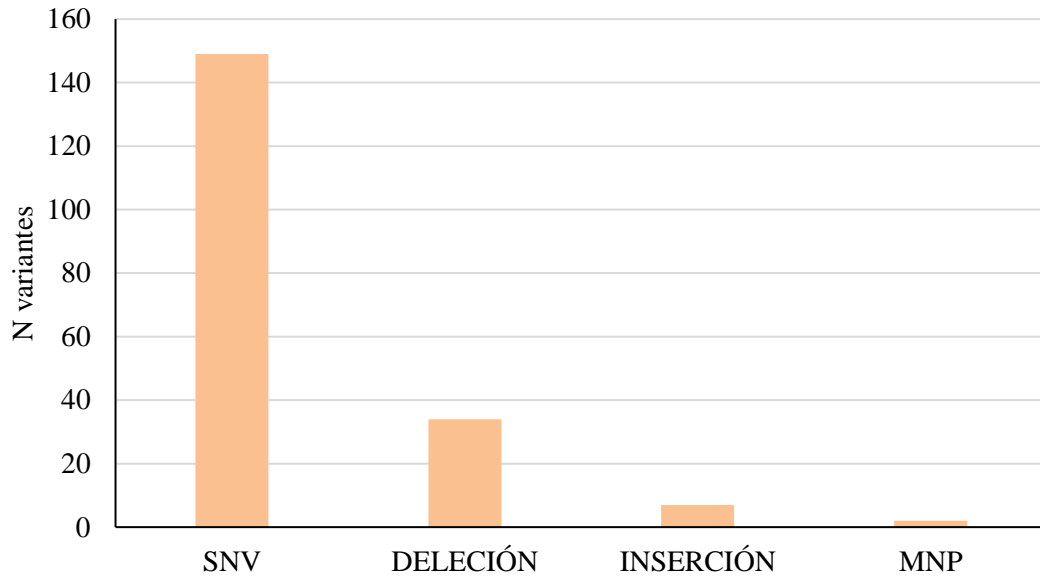
Las 192 variantes se detectaron en 16 genes, la mayoría de ellas localizadas en el gen *APC*, *KRAS*, *TP53* y *BRAF*. En los genes *AKT1*, *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR2*, *FOXL2*, *GNAQ*, *GNAS*, *MSH6*, *SRC* y *STK11* no se detectaron variantes (Tabla 16).

GEN	N ADENOMAS (%)	N PACIENTES (%)
<i>APC</i>	64 (71,9)	49 (84,5)
<i>KRAS</i>	25 (28)	18 (31)
<i>TP53</i>	15 (16,9)	15 (25,9)
<i>BRAF</i>	13 (14,6)	13 (22,4)
<i>CTNNB1</i>	10 (11,2)	9 (17,2)
<i>PIK3CA</i>	9 (10,1)	6 (10,3)
<i>FBWX7</i>	6 (6,7)	6 (10,3)
<i>SMAD4</i>	4 (4,5)	3 (5,2)
<i>CDH1</i>	4 (4,5)	4 (6,9)
<i>NRAS</i>	3 (3,4)	3 (5,2)
<i>MET</i>	2 (2,2)	2 (3,4)
<i>MAP2K1</i>	2 (2,2)	2 (3,4)
<i>PTEN</i>	2 (2,2)	2 (3,4)
<i>ALK</i>	1 (1,1)	1 (1,7)
<i>KIT</i>	1 (1,1)	1 (1,7)
<i>PDGFRA</i>	1 (1,1)	1 (1,7)

Tabla 16. Porcentaje de muestras y pacientes portadores en los distintos genes incluidos en el TST26.

Si agrupamos las variantes en función del biotipo, el 76% (149 variantes) eran SNVs (Figura 46A). De los 149 SNVs, los cambios de nucleótidos más representados fueron C>T (80), C>A (28), T>A (17) y T>C (16) (Figura 46B). En el Anexo 10 se detallan las alteraciones encontradas por tejido y paciente.

A



B

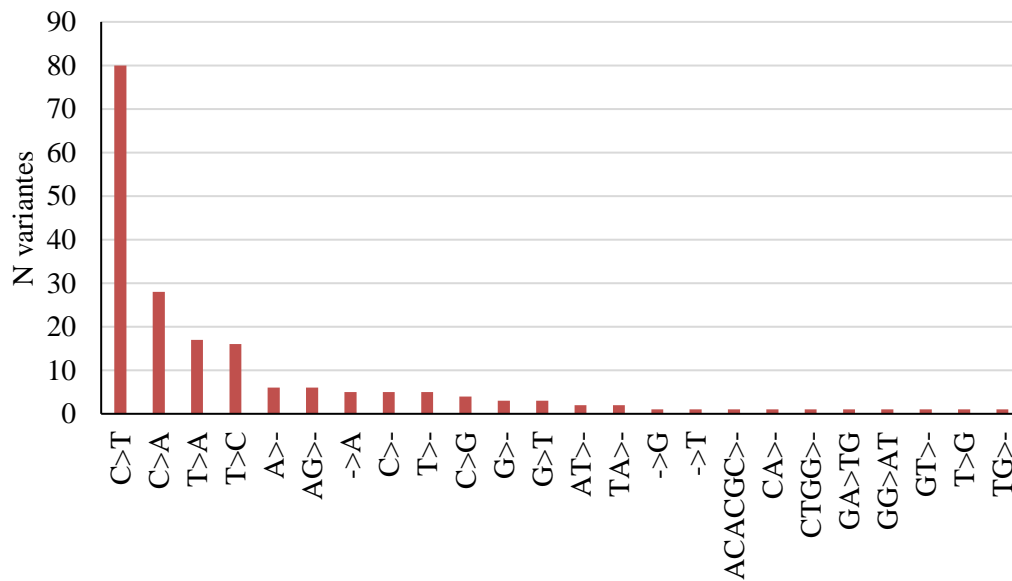


Figura 46. Variantes detectadas tras el cribado de TST26. A) Número de variantes agrupadas en función de su biotipo. B) Número de variantes agrupadas según el tipo de cambio detectado. SNV: Variante de nucleótido simple (del inglés, *single nucleotide variant*), MNP: Variante de nucleótido múltiple (del inglés, *multiple nucleotide polymorphism*).

Las principales vías de señalización alteradas en los tejidos analizados fueron la vía Wnt (83,1%) y la vía RAS (38,2%), y en menor medida, la vía TP53 (13,5%), PI3K (11,2%), y la vía de TGF- β (4,5%) (Figura 47).

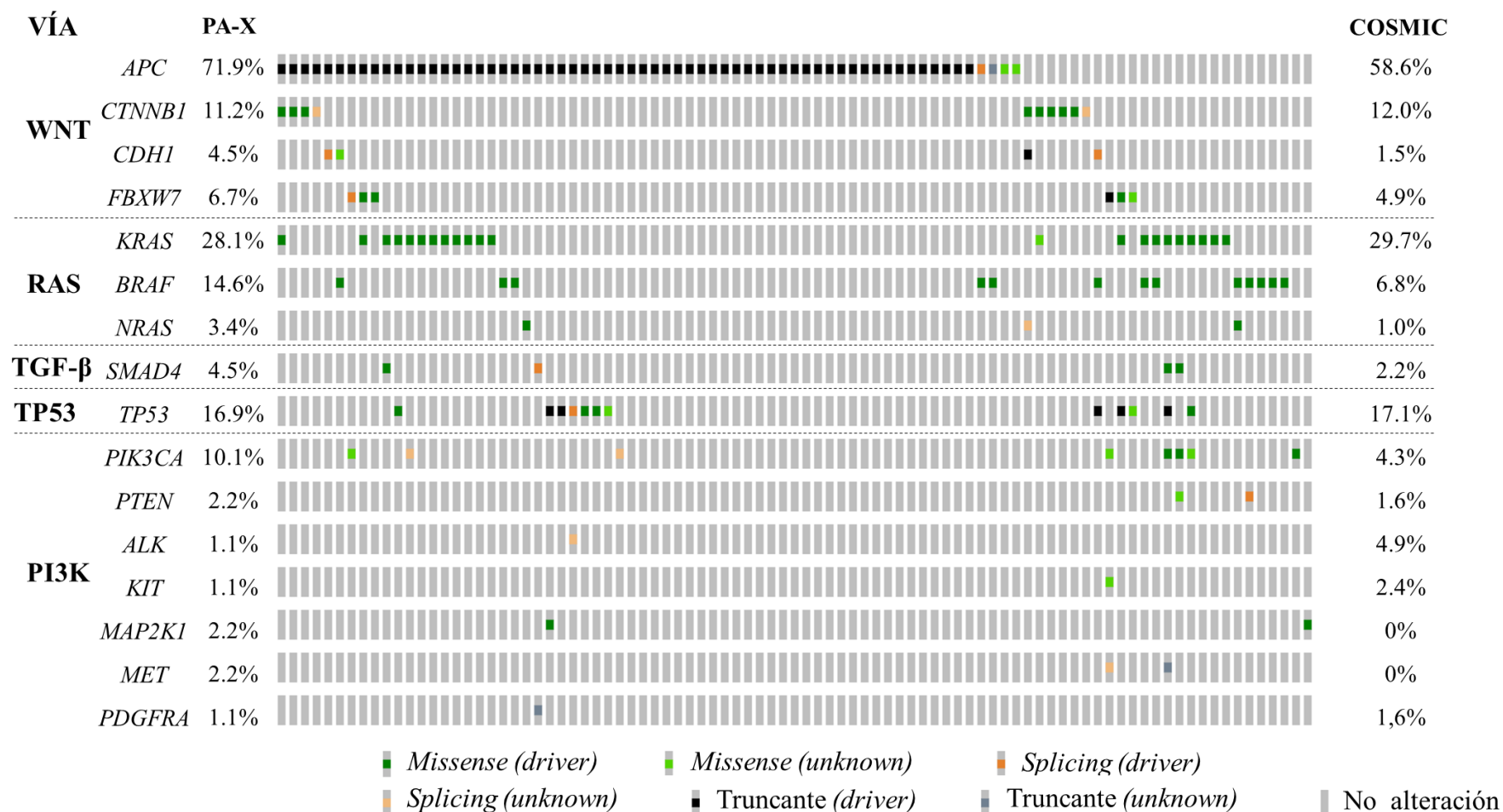


Figura 47. Porcentaje de muestras con mutación en los distintos genes agrupados en función de la vía de señalización implicada. Se indica el tipo de mutación detectada así como el porcentaje de adenomas mutados en cada uno de los genes, y agrupados en distintas vías: Wnt, RAS, PI3K y TGF-β. Imagen diseñada mediante “The cBio Cancer Genomics Portal” (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013)

4.2.2. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GERMINALES

El cribado de *hotspots* también permitió la caracterización y clasificación de variantes detectadas en línea germinal:

Variantes en el gen *MUTYH*:

El déficit de *MUTYH* conlleva un aumento en la tasa de mutaciones G>T principalmente en el gen *KRAS*, por lo que el análisis de mutaciones somáticas en estos casos puede ayudar a la interpretación de las variantes.

En los pacientes portadores de variantes de clase 4 o 5 bialélicas en *MUTYH* se observó un enriquecimiento en cambios G>T (Tabla 17), confirmando con ello la deficiencia en el sistema de reparación de 8-OHdG, mientras que en los portadores monoalélicos de la variante c.1187G>A p.(Gly396Asp) (PAAX-37, 38 y 99) y en el portador homocigoto de la variante de clase 3: c.667A>G p.(Ile223Val) (PAAX-61) no se observó este perfil, lo que en este último caso sugiere descartar su patogenicidad.

TIPO	VARIANTE GERMINAL	PACIENTE	N TEJIDOS ANALIZADOS	N (G>T)/ TOTAL
BIALÉLICO (CLASE 5/4)	c.1187G>A p. (Gly396Asp) + c.739C>G p. (Arg247Gly)	PAAX-35	2	4/6
BIALÉLICO (CLASE 5/5)	c.1187G>A; p. (Gly396Asp) + c.1510_1517delinsCCAACAGC CA p.(Thr504Profs*68)	PAAX-89	2	2/2
BIALÉLICO (CLASE 3)	c.667A>G p.(Ile223Val)	PAAX-61	1	0/3
MONOALÉLICO (CLASE 5)	c.1187G>A p. (Gly396Asp)	PAAX-37	1	0/2
		PAAX-38	2	1/2
		PAAX-99	1	0/3

Tabla 17. Cambios G>T detectados en los tejidos de pacientes portadores de variantes en *MUTYH*.

Variantes en el gen *NTHL1*:

De la misma manera que *MUTYH*, el déficit de *NTHL1* conlleva un aumento en la tasa de mutaciones C>T a nivel somático. En este caso, no se detectó ningún paciente portador de mutaciones bialélicas en *NTHL1* en línea germinal, y los pacientes monoalélicos no se observó ningún enriquecimiento en el número de cambios C>T (Tabla 18).

VARIANTE GERMINAL	PACIENTE	N TEJIDOS ANALIZADOS	N (C>T)/ TOTAL
c.527T>C p.(Ile176Thr)	PAAX-16	1	0/2
c.856G>A p.(Gly286Ser)	PAAX-75	2	0/2
c.527T>C p.(Ile176Thr)	PAAX-82	2	3/5
c.268C>T p.(Gln90*)	PAAX-83	5	5/12

Tabla 18. Cambios C>T detectados en los tejidos de portadores de variantes monoalélicas en *NTHL1*.

5. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MOSAICOS EN APC

Para el estudio de mosaicos en el gen *APC* se seleccionaron 10 pacientes. El 70% de los mismos eran hombres, con una edad media de diagnóstico de la poliposis de 54 años (rango de 33 a 72) y un número medio de adenomas de 41,5 (rango de 20 a 100).

Se secuenciaron un total de 23 muestras de tejido detalladas en la Tabla 19. Aproximadamente la mitad (56,5%) eran adenomas tubulares con displasia de bajo grado.

Paciente	Muestra Id	Histología	Tamaño (mm)	Localización
PAAX-47	47-1	AV-Haggitt 0	45	Sigma
PAAX-47	47-4	ATDBG	5	Sigma
PAAX-11	11-1	ATDBG	5	Recto
PAAX-11	11-2	AC enteroide	10	Transverso
PAAX-12	12-1	ATVDBG	9	Ciego
PAAX-12	12-5	ATDBG	10	Descendente
PAAX-22	22-1	Colon normal	4	Sigma
PAAX-22	22-4	ATDAG	4	Recto
PAAX-48	48-1	ATDBG	10	Ascendente
PAAX-48	48-3	ATDBG	7	Recto
PAAX-67	67-1	ATDBG	4	Ángulo hepático
PAAX-67	67-5	ATDBG	3	Ángulo hepático
PAAX-39	39-1	ATDBG	4	Transverso
PAAX-39	39-3	ATDBG	15	Ascendente/Ciego
PAAX-50	50-1	ATVDBG	13	Transverso
PAAX-50	50-2	HP	6	Sigma
PAAX-50	50-3	ATDBG	4	Descendente
PAAX-50	50-4	ATVDBG	14	Ángulo hepático
PAAX-66	66-1	AC-Haggitt 0	30	Sigma
PAAX-66	66-5	ATDAG	16	Descendente
PAAX-66	66-6	ATDBG	7	Sigma/Descendente
PAAX-71	71-1	ATDBG	8	Sigma
PAAX-71	71-2	ATDBG	10	Recto

Tabla 19. Características de las muestras de tejido analizadas para el estudio de mosaicos en APC. ATDBG=Adenoma tubular con displasia de bajo grado, AV-Haggitt 0= adenoma veloso malignizado nivel 0 de Haggitt, AC enteroide= Adenocarcinoma enteroide, ATVDBG=Adenoma túbulo-veloso con displasia de bajo grado, HP= Pólipo hiperplásico, ATDAG= Adenoma tubular con displasia de alto grado.

Se llevó a cabo la secuenciación de *APC* mediante NGS y tras el análisis de variantes se detectaron cuatro pacientes que presentaron la misma variante en al menos dos muestras de adenomas independientes (Tabla 20). Tres de ellas se localizan en la región MCR a excepción de la variante de *splicing* NM_000038.5:c.646-2A>T. Después del análisis de las variantes candidatas en muestras adicionales, se confirmaron 2 mosaicos, descartando el resto, lo que sugiere una tasa de mosaicismo del 20%. Los resultados del genotipado de tejidos adicionales por PCRd se resumen en el Anexo 11.

PACIENTE	VARIANTE (HGVS)	BIOTIPO	MUESTRA	FA (%)	FRECUENCIA (COSMIC)
PAAX-47	c.4127_4128delAT p.(Tyr1376Cysfs*9)	<i>Frameshift</i>	47-1	38,3	11/2733 (0,4%)
			47-4	8,0	
PAAX-67	c.646-2A>T	<i>Splicing</i>	67-5	28,3	0/2733 (0%)
			67-1	26,4	
PAAX-50	c.4156A>T p. (Arg1386*)	<i>Nonsense</i>	50-4	22,8	0/2733 (0%)
			50-2	52	
PAAX-66	c.4348C>T; p.(Arg1450*)	<i>Nonsense</i>	66-5	28,7	85/2733 (3,1%)
			66-6	27,9	

Tabla 20. Variantes comunes identificadas en al menos dos tejidos adenomatosos de un mismo paciente. Se indica la nomenclatura de la variante según HGVS, su biotipo, la FA media detectada en ambos pools de oligonucleótidos y la frecuencia de cada variante descrita en la base de datos COSMIC (población de adenomas colorrectales).

5.1. Variante c.4127_4128delAT

Detectada en el paciente PAAX-47, diagnosticado de poliposis a los 35 años, llevándose a cabo una resección segmentaria del colon izquierdo (un tercio del colon transversal, colon descendente y un tercio de sigma). Durante 30 años no se realizó colonoscopias por decisión propia, hasta los 67 años, cuando se le detecta un adenoma vellosos malignizado a 22cm del ano requiriendo una sigmoidectomía segmentaria. Desde entonces se han detectado algunos adenomas al final del colon transversal-comienzo de colon ascendente.

No presenta historia familiar de poliposis o cáncer, sus hijas no presentan pólipos ni cáncer en la actualidad (con edades comprendidas entre 46 y 50 años) (Figura 48).

Tras el análisis por NGS de dos adenomas situados a más de 10 cm el uno del otro (Figura 49C), se detectó la variante patogénica NM_00038: c.4127_4128delAT, p.(Tyr1376Cysfs*9) en ambos tejidos (Figura 49B). Dicha variante se localiza en la región MCR y produce un truncamiento de la proteína, y con ello una pérdida de función. La FA obtenida por la NGS fue del 38,3% en un adenoma (910 lecturas totales) y del 8% (310 lecturas totales) en el otro, mientras que las FA obtenidas mediante PCRd de estos tejidos fueron $41,51 \pm 0,02\%$ y $24,23 \pm 0,69\%$ respectivamente (Figura 49D).

Tras analizar otros 7 adenomas, un pólipo hiperplásico, una muestra de mucosa colónica normal y el ADN procedente de leucocitos mediante PCRd, se detectaron 4 nuevos adenomas portadores de la variante con unas FA del $1,34 \pm 0,02\%$, $17,64 \pm 0,04\%$, $20,63 \pm 0,07\%$ y el $40,94 \pm 0,14\%$. Sin embargo, no se detectó en dos adenomas, en un pólipo hiperplásico, en la mucosa colónica normal ni en el ADN procedente de sangre periférica (Figura 49C y D).

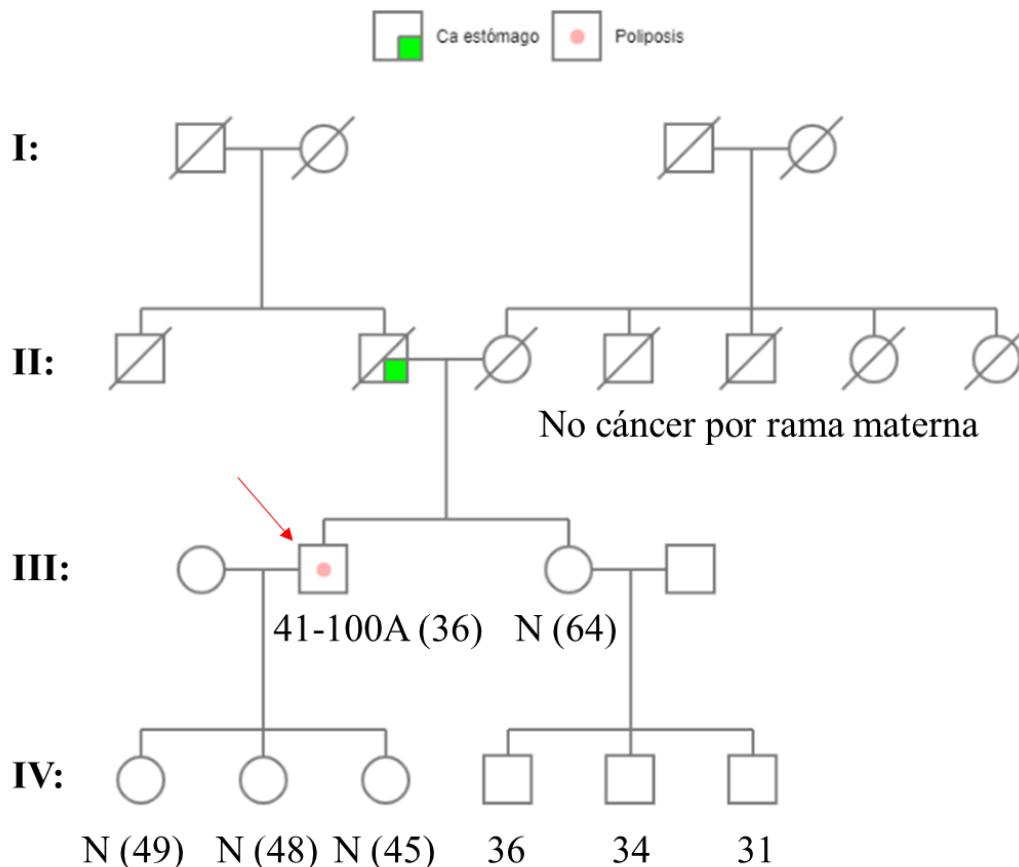


Figura 48. Árbol genético de la familia del paciente PAAX-47. A=Adenoma, N= Colonoscopia normal.

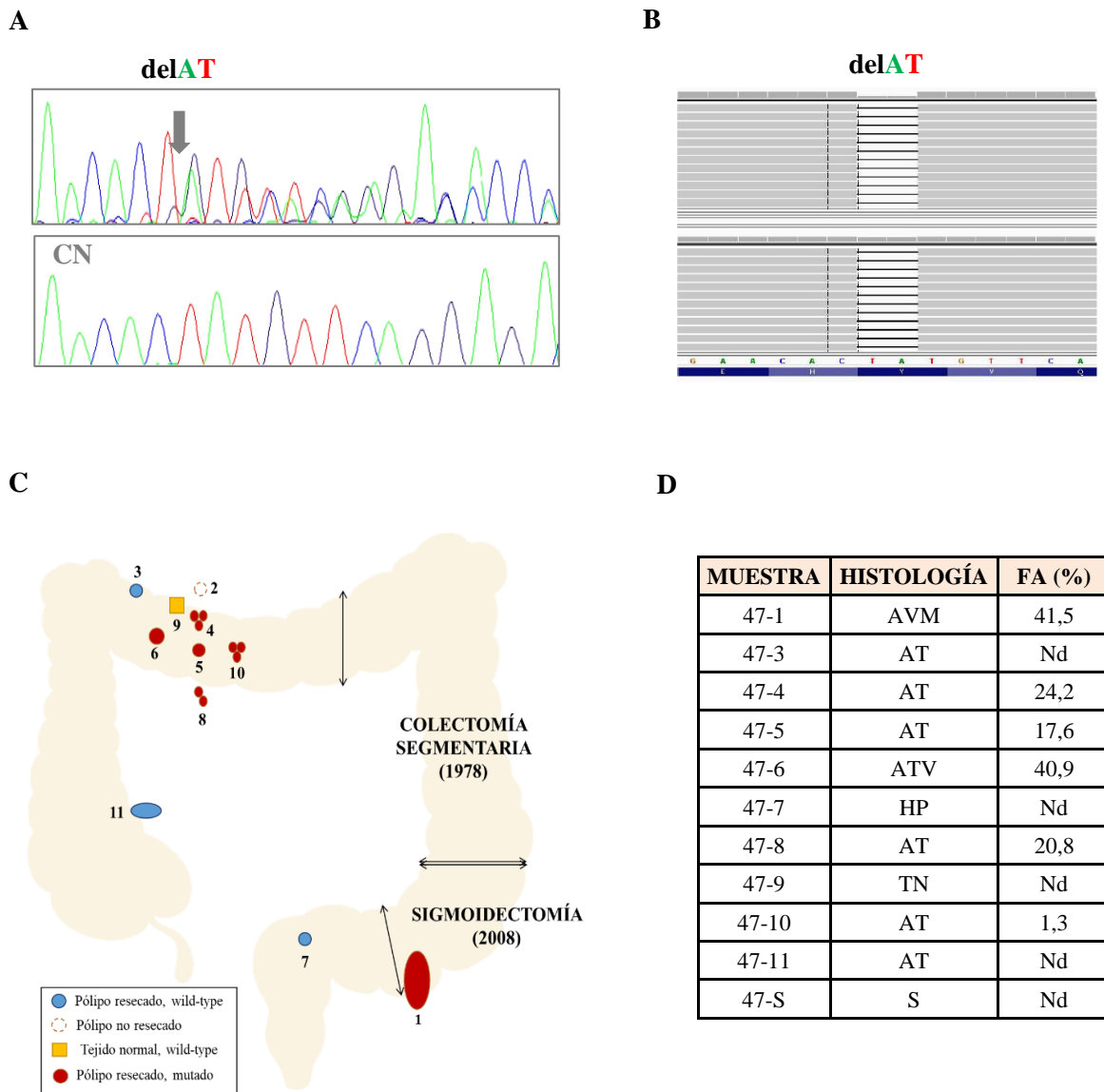


Figura 49. Detección de la variante c.4127_4128delAT p.(Tyr1376Cysfs*9) en APC. A: Electroferograma de la variante en una muestra de adenoma. B: Visualización en IGV de la variante en una muestra de adenoma (PAAX47-1). C: Esquema de los distintos tejidos analizados mostrando su distribución anatómica y el resultado de dicho genotipado. D: Cuantificación de la FA de los distintos tejidos analizados mediante PCRd. AVM=Adenoma vellosos malignizados, AT= Adenoma tubular, ATV= Adenoma túbulo-vellosos, HP= Pólipo hiperplásico, TN= Tejido normal, S= ADNg de sangre periférica, CN= Control negativo.

5.2. Variante c.646-2A>T

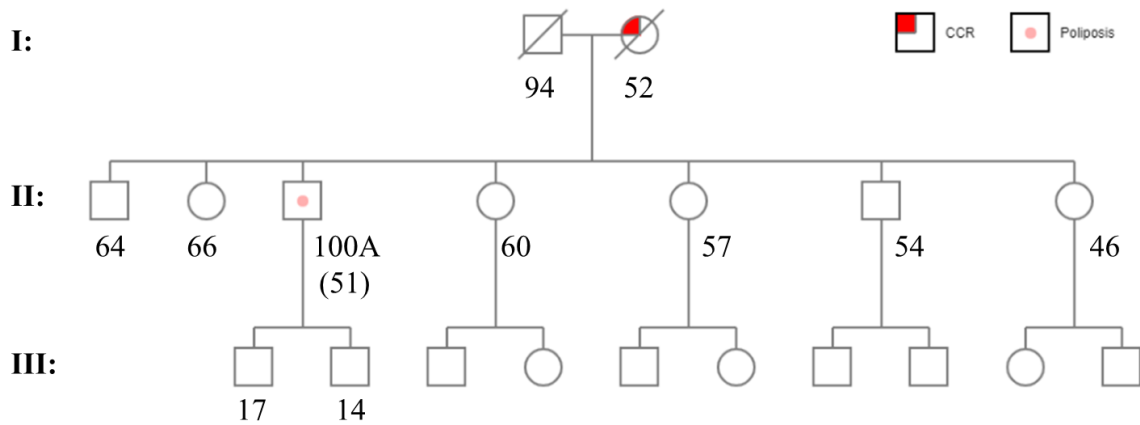
Detectada en el paciente PAAX-67, diagnosticado de unos 100 adenomas a los 54 años. Sin historia familiar de cáncer ni de poliposis: Ningún hermano/a presenta poliposis, ni sus hijos, aunque su madre murió a los 52 años debido probablemente al desarrollo de un tumor de origen desconocido (Figura 50A).

Tras hacer el estudio de mosaicos en el gen *APC* y analizar dos adenomas situados a más de 10 cm el uno del otro (PAAX67-3 y PAAX-67-5), se detectó la variante NM_00038: c.646-2A>T en ambos (Figura 50B).

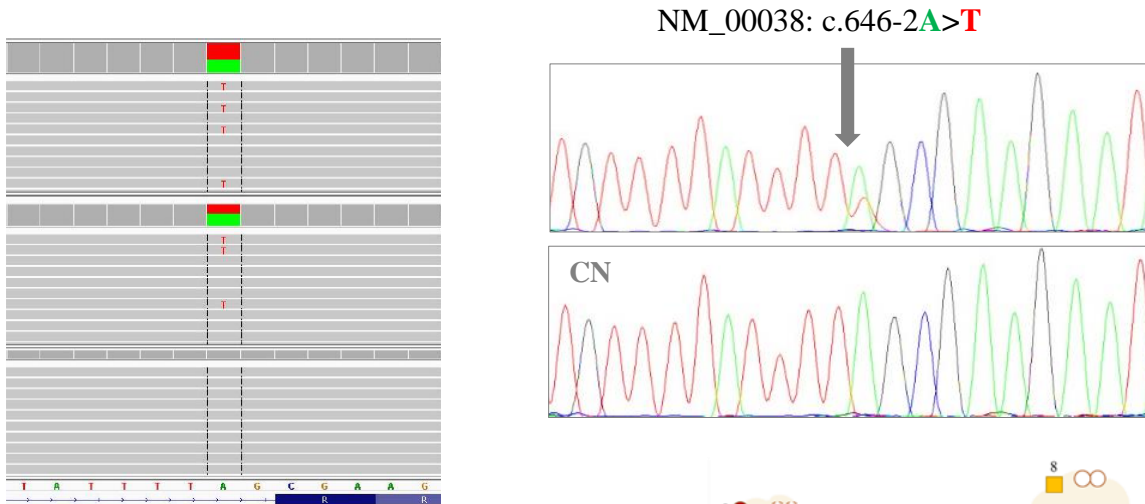
Dicha variante se localiza fuera de la región MCR. Es una variante de *splicing* que se localiza en el dinucleótido consenso del aceptor de *splicing* del exón 7. Las herramientas *in silico* HSF/MaxEntScan predicen una pérdida de dicho aceptor y la generación de uno nuevo a 12 pb de la variante en dirección 3'. Esto supondría la pérdida de los 10 primeros nucleótidos del exón 7, que desplazaría el marco de lectura e introduciría un codón de parada prematuro, impidiendo la síntesis de proteínas funcionales.

La FA obtenida tras la NGS fue del 26,4% en un adenoma (en 320 lecturas) y del 28,3% (en 400 lecturas) en el otro. Ambos tejidos adenomatosos portadores se reanalizaron mediante PCRd y se obtuvieron unas FA de $20,6\pm 3\%$ y $38,8\pm 0,3\%$, respectivamente. Tras analizar 4 adenomas más y 2 tejidos colónicos normales mediante PCRd se detectó únicamente un adenoma portador de la variante con una FA del $0,93\pm 0,01\%$ mientras que el resto de los tejidos resultaron negativos (Figura 50C y D).

A



B



C

MUESTRA	HISTOLOGÍA	FA (%)
67-1	AT	0,9
67-2	AT	nd
67-3	AT	38,8
67-4	AT	nd
67-5	AT	20,6
67-6	AT	nd
67-7	TN	nd
67-8	TN	nd
67-S	S	nd

D

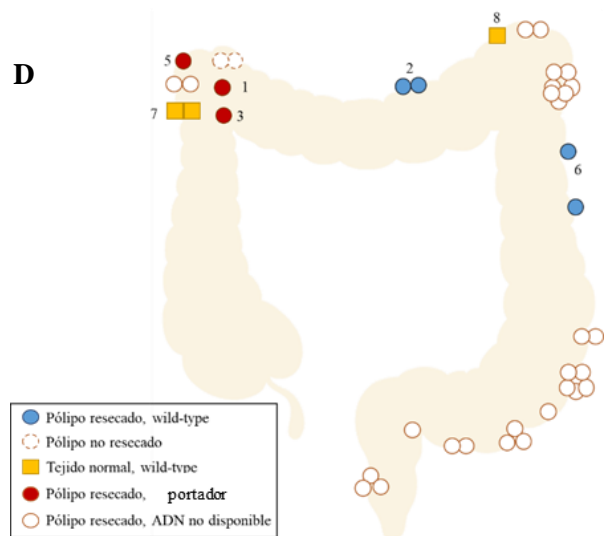


Figura 50. Detección de la variante c.646-2A>T en APC. A: Árbol genético de la familia. B: Visualización de la variante en IGV y electroferograma de una muestra de tejido adenomatoso (PAAX67-3). C: Cuantificación de la FA de los distintos tejidos analizados mediante PCRd. AT= Adenoma tubular, TN= Tejido normal, S= ADNg de sangre periférica, CN= Control negativo. D: Esquema de los distintos tejidos analizados mostrando su distribución anatómica y el resultado de dicho genotipado.

5.3. Variante c.4156A>T

Detectada en el paciente PAAX-50 con más de 30 adenomas y una edad de diagnóstico de la poliposis de 63 años. Además de pólipos adenomatosos presenta pólipos hiperplásicos y un patrón de herencia recesivo. El árbol genético de este paciente se muestra en la Figura 51A.

Tras la secuenciación masiva del gen *APC* en 3 adenomas (PAAX50-1, PAAX50-3 y PAAX50-4) y un pólipo hiperplásico (PAAX50-2) se detectó una variante *nonsense* c.4156A>T p.(Arg1386*) común en el pólipo hiperplásico y en un adenoma túbulo-velloso con unas FA del 41,5% (487 lecturas totales) y 30,13% (395 lecturas totales) respectivamente. La visualización de los resultados de la NGS mediante el programa IGV se muestra en la Figura 51B para uno de los dos tejidos positivos. La variante se validó mediante Secuenciación Sanger en ambos tejidos (PAAX50-2 y PAAX50-4). El electroferograma del tejido PAAX50-4 se muestra en la Figura 51C.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos tras la NGS y la localización de los tejidos analizados (Figura 51D), se priorizó esta variante para el estudio de mosaicos mediante PCRd.

Se reanalizaron por PCRd los tejidos secuenciados por NGS y se estudiaron 3 muestras de tejido adicionales y la muestra de ADNg procedente de sangre periférica del paciente. No se detectó en ningún tejido nuevo, ni en los analizados previamente, incluida la muestra de sangre periférica (Figura 51D).

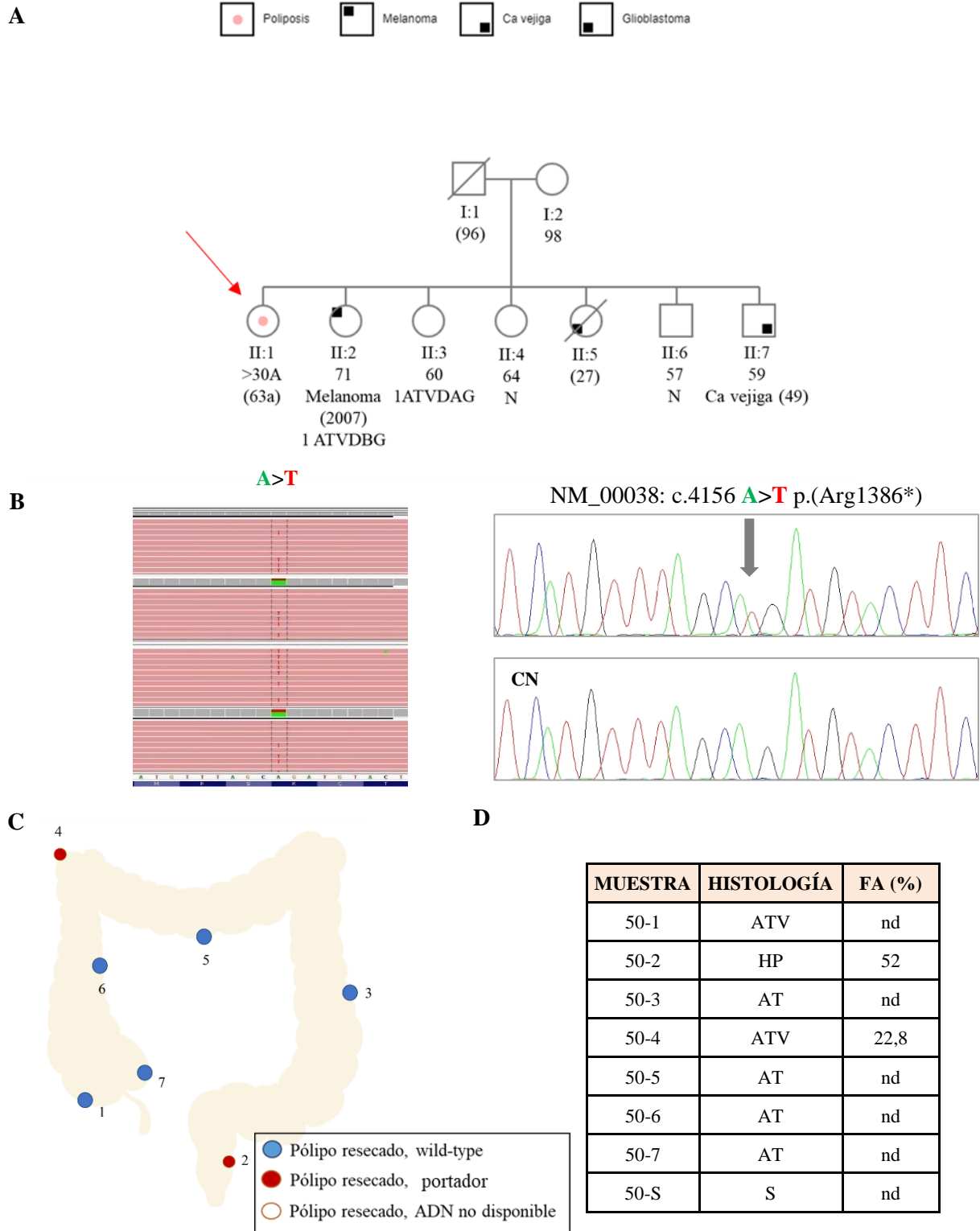


Figura 51. Detección de la variante c.4156A>T p.(Arg1386*) en APC. A: Árbol genético de la familia. B: Visualización mediante el programa IGV de las secuencias obtenidas por NGS y electroferograma de una muestra de tejido portadora de la variante (PAAX50-4). C: Tejidos analizados mostrando su distribución anatómica, histología y el resultado de dicho genotipado. D: Cuantificación de la FA e histología de los distintos tejidos analizados mediante PCRd. ATV= Adenoma túbulo-veloso, ATVDBG= Adenoma túbulo-veloso con displasia de bajo grado, ATVDAG= Adenoma túbulo-veloso con displasia de alto grado, AT= Adenoma tubular, HP= Pólipo hiperplásico, S= ADN de sangre periférica.

5.4. Variante c.4348C>T

Detectada en el paciente PAAX-66, con más de 40 adenomas detectados a los 54 años, sin historia familiar de cáncer y poliposis (Figura 52A), sometido a colectomía por CCR a los 55 años.

Tras la secuenciación masiva del gen *APC* en un adenocarcinoma (PAAX66-1) y dos adenomas (PAAX66-5 y PAAX66-6) se detectó una variante *nonsense* c.4348C>T p.(Arg1450*) en las dos muestras de adenoma, con unas FA del 28,1% (707 lecturas totales) y 35,9% (920 lecturas totales) respectivamente. El resultado de la NGS en uno de los tejidos portadores se visualiza mediante el software IGV en la Figura 52B. Ambos tejidos adenomatosos portadores se analizaron mediante PCRd y se obtuvieron unas FA del 27,9% y 28,7%, respectivamente.

Tras analizar 3 adenomas adicionales distribuidos a lo largo del colon (Figura 52C) mediante PCRd, todos resultaron positivos con FA comprendidas entre el 14,8% y 31,7% (Figura 52D). Sin embargo, no se detectó la variante en el ADN procedente de sangre periférica.

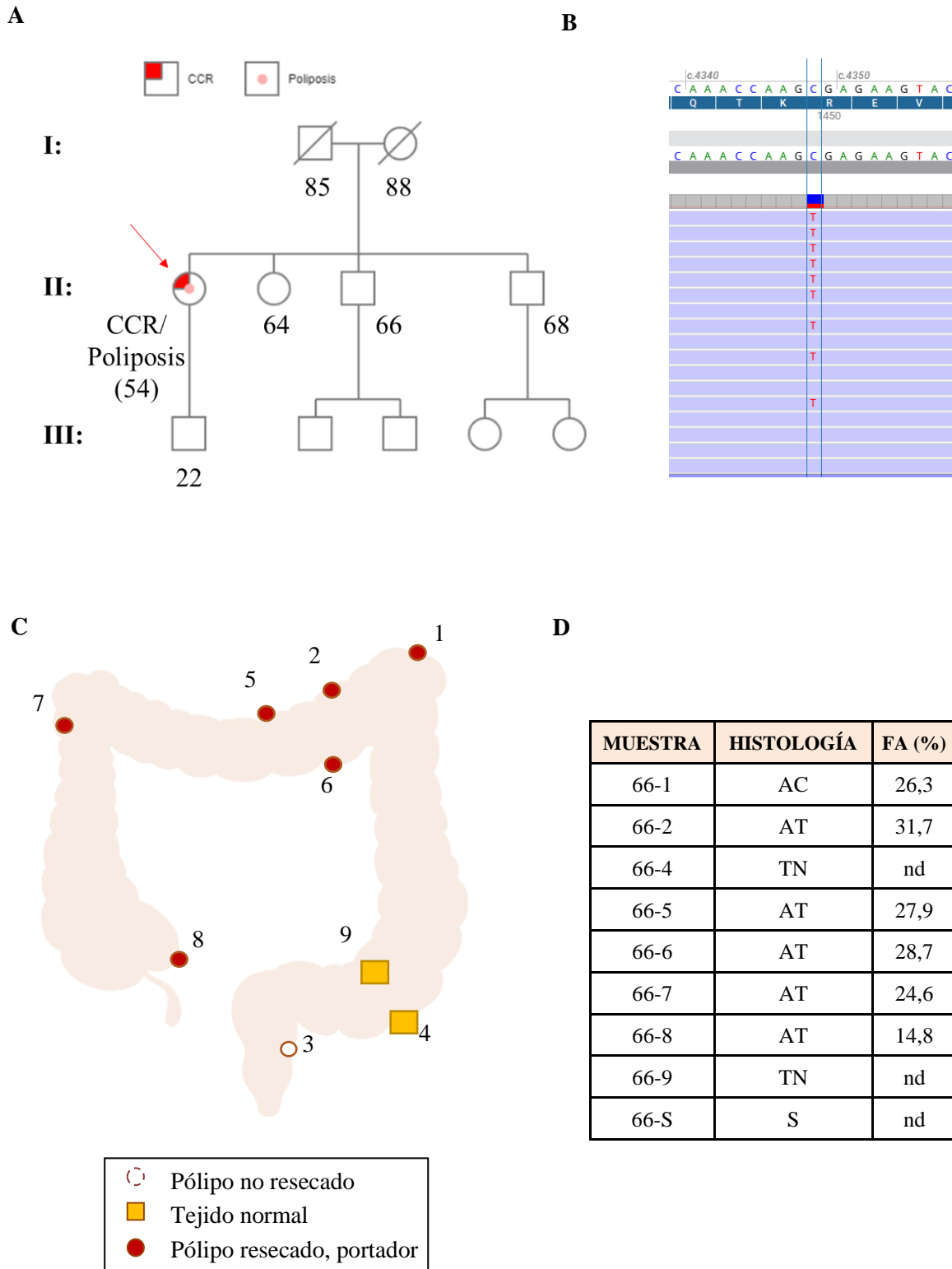


Figura 52. Detección de la variante c.4348C>T p.(Arg1450*) en APC. A: Árbol genético de la familia. B: Visualización del resultado de NGS de una muestra portadora en IGV. C: Esquema de los distintos tejidos analizados mostrando su distribución anatómica y el resultado de dicho genotipado. D: Cuantificación de la FA e histología de los distintos tejidos analizados mediante PCRd. AT= Adenoma tubular, AC= Adenocarcinoma, HP= Pólipo hiperplásico, TN= Tejido normal, S= ADNg de sangre periférica

DISCUSIÓN

1. JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DEL ESTUDIO DE FAMILIAS PAAX

La PAA se está convirtiendo en uno de los grupos más numerosos en las CCG, y menos resueltos. Por este hecho, es muy importante la búsqueda de causas de susceptibilidad genética, que permitan un asesoramiento y seguimiento adecuado tanto para pacientes como para familiares.

La PAA es una enfermedad muy heterogénea en cuanto a sus manifestaciones clínicas: que abarcan tanto formas moderadas (50-100 adenomas) como leves (10-50 adenomas), y formas familiares o esporádicas, o la presencia o ausencia de manifestaciones extracolónicas (de Leon et al., 2017; Knudsen et al., 2003; Mongin et al., 2012). Además, durante los últimos años se ha puesto de manifiesto una alta heterogeneidad genética tras el descubrimiento de distintos genes implicados en su desarrollo (Valle et al., 2019).

Actualmente, las sociedades ACMG, ACG y CUGC (apartado 4.2 de Introducción, Página 72) (Aretz et al., 2015; Hegde et al., 2014; Syngal et al., 2015) así como la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) y la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) (Balmaña et al., 2013; Stoffel et al., 2015), han publicado guías propias que indican el estudio genético de *APC* y *MUTYH* en individuos con 10 o más adenomas acumulados. En el año 2019 se publicó un estudio en el que analizaban *APC* y *MUTYH* en 2353 pacientes con más de 10 adenomas, y solo el 2,3% de los casos se justificaba por alteraciones patogénicas en *APC* y *MUTYH* (Stanich et al., 2019), mostrando así el bajo poder predictivo de estas recomendaciones, que desde el 2015 no han sufrido ninguna modificación.

El abordaje diagnóstico seguido en nuestro hospital durante el desarrollo de esta tesis (Figura 17, Página 75) permite explicar alrededor del 3,8% de los casos con más de 10 adenomas por alteraciones en el gen *MUTYH* y *APC*. Este porcentaje aumenta considerablemente con la carga de adenomas, y cuando se seleccionan únicamente los casos de poliposis moderada (51 y 100 adenomas), se llega a explicar el 27% de los casos (Figura 33, Página 114).

Con el fin de mejorar la sensibilidad diagnóstica e investigar la contribución de los nuevos genes descritos en la PAA, así como otros genes asociados al desarrollo de otras poliposis o CCR, hemos realizado un cribado genético en una cohorte de PAA no explicada (sin

resultado genético informativo en *MUTYH* y *APC*) utilizando un panel de NGS personalizado que incluye las regiones codificantes y las regiones intrónicas colindantes de 22 genes implicados en la predisposición al CCR/poliposis (Anexo 2).

En un grupo reducido de esta cohorte se ha hecho un estudio piloto para estimar la contribución de fenómenos de mosaicismo en el gen *APC* en la PAA.

Nuestra cohorte de estudio comprende 159 sujetos de PAA no explicadas (Tabla 8, Página 114) y se trata de la cohorte de PAA más grande en la que se ha realizado hasta ahora un cribado genético conjunto para todos los genes asociados a la predisposición a la PA y descritos hasta la fecha de este estudio.

2. CRIBADO GERMINAL DE GENES DE PREDISPOSICIÓN A PAA/CCR

2.1. Variantes en genes de predisposición primaria a la PAA

Como es de esperar, la mayoría de las variantes accionables (patogénicas/probablemente patogénicas) o de significado desconocido (33/48), se localizaron en 7 genes de predisposición primaria a la PAA (*APC*, *MUTYH*, *POLE*, *POLD1*, *NTHL1*, *AXIN2*, *MLH3*), distribuyéndose en un total de 31 pacientes (18,9%) (Tabla 10, Página 118 y 119). La mayoría de estas variantes (21) resultaron ser variantes de significado clínico desconocido identificadas en un total de 20 pacientes (12,5%). Teniendo en cuenta otros estudios previos en múltiples cohortes de poliposis (Bellido et al., 2016; Esteban-Jurado et al., 2017; Spier et al., 2015), la frecuencia de variantes accionables en los nuevos genes de predisposición a la PAA es muy baja en las poblaciones analizadas, pero no insignificante (alrededor del 1 al 2%). En nuestra población no hemos detectado variantes accionables en estos genes, pero sí un elevado número de VSD, al igual que en otros trabajos publicados (Bellido et al., 2016; Esteban-Jurado et al., 2017; Spier et al., 2015), y cuya probable patogenicidad podría comprobarse en los próximos años. Por esta misma razón, es importante la integración de estos genes en el cribado genético de las PAA, permitiendo así la identificación de estas variantes. Con los años se irán sumando evidencias de los distintos laboratorios de Diagnóstico Molecular, que permitirán clasificar un mayor número de VSDs y explicar con ello casos adicionales de síndromes de PA hereditarias.

La mayoría de las variantes con accionabilidad clínica se localizaron en los genes *APC* (3 casos, 1,9% de la cohorte) y *MUTYH* (2 casos, 1,3% de la cohorte), que, hasta el momento, son los que más contribuyen a la patología de estudio, y de los que más información se disponen.

Sin embargo, llama la atención que casi todos los casos explicados tras el estudio sean debidos a alteraciones en estos dos genes, ya que uno de los criterios fundamentales de inclusión era tener un resultado no informativo en el estudio asistencial de PAA, basado en el cribado de *MUTYH* y/o *APC*. La razón fundamental por la que estas alteraciones no se detectaron durante el cribado asistencial, es el distinto abordaje de estudio que conlleva el análisis genético dirigido y el análisis con paneles multigénicos de NGS. El abordaje

en el estudio dirigido implica restringir mucho los criterios de estudio ya que supone un tiempo, trabajo técnico y coste, elevados. Por lo tanto, si nos fijamos en el algoritmo diagnóstico seguido en el HCSC en el momento de inicio de esta tesis doctoral (Figura 17, Página 75), la severidad de la poliposis y el tipo de herencia van a conducir al paciente hacia el estudio del gen *APC* o *MUTYH*, mientras que el diagnóstico a través de paneles multigénicos, permite analizar ambos genes, e incluso más, en un solo estudio, evitando tener que seleccionar los casos.

En el gen *APC* se detectaron tres variantes truncantes en tres sujetos: PAAX-3, PAAX-9 y PAAX-45. Las variantes c.266C>G p.(Ser89*) y c.147_150del p.(Lys49Asnfs*20) se detectaron en dos sujetos diagnosticados con PAA a una edad tardía (96 adenomas acumulados a los 57 años y 61 adenomas a los 62) y con historia familiar compatible con una herencia recesiva (Figura 36, Página 122). Ambas variantes detectadas se localizan en el extremo 5' del gen, concretamente en los codones 89 y 49, lo que explica su fenotipo atenuado ya que se sitúan antes del ATG iniciador alternativo en el codón 157 (Nieuwenhuis & Vasen, 2007). También, se detectó la variante truncante c.3199C>T p.(Gln1067*) en un paciente con PAA (más de 80 adenomas acumulados a los 39 años) y CCR a una edad muy temprana (Figura 36, Página 122), y sin historia familiar, lo que indica una posible alteración de *novo*. La variante se localiza en una zona del gen asociada a un fenotipo clásico de la enfermedad (posterior al codón 157 y anterior al 1250) (Nieuwenhuis & Vasen, 2007). El número de adenomas detectados en el paciente es menor de 100, pero a una edad muy temprana (37 años), lo que sugiere que el paciente alcance un fenotipo de poliposis clásica en los próximos años.

Dos pacientes de la cohorte resultaron ser portadores bialélicos de alteraciones en el gen *MUTYH*. Se detectaron dos variantes no recurrentes en el gen *MUTYH*: c.739C>G p.(Arg247Gly) y c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p.(Thr504Profs*68) en dos pacientes con PAA a los 37 y 56 años (PAAX-35 y PAAX-89), y ambas en TRANS con la variante patogénica recurrente c.1187G>A p.(Gly396Asp). El estudio molecular de los adenomas de ambos portadores mostró un predominio de cambios G>T que confirma la deficiencia en el sistema de reparación de la 8-OHdG (Lipton et al., 2003). Este dato, sumado a los estudios de segregación, permitió la clasificación de estas variantes como probablemente patogénica y patogénica, respectivamente, justificando la PA en los pacientes portadores (Figuras 37 y 38, Páginas 124 y 126).

2.2. Variantes en genes de predisposición secundaria a la PAA

En los genes de predisposición a la PAA de manera secundaria, se detectó una variante patogénica en el gen *PTEN*: c.1003C>T p.(Arg335*) en el paciente PAAX-95 (Figura 39, Página 128). Alteraciones patogénicas en el gen *PTEN* dan lugar al conocido síndrome de Cowden, caracterizado por una tendencia a desarrollar pólipos hamartomatosos, así como lesiones cutáneas, lesiones estructurales de tiroides y malformaciones craneales, y un riesgo incrementado de distintos tumores (Heald et al., 2010). El paciente fue diagnosticado de PAA a los 74 años, de los cuales la mayoría eran adenomatosos, a excepción de varios pseudopólipos inflamatorios y un adenoma serrado sésil, pero ninguno de ellos hamartomatoso (histología revisada por dos patólogos). Además de la poliposis, el paciente tenía antecedentes de CCR a los 57 años, cáncer de próstata a los 69 años, un nódulo en tiroides y varios lipomas, síntomas compatibles con el síndrome de Cowden.

Peter P Stanich y col. publicaron una revisión de la literatura de portadores de variantes patogénicas en *PTEN*. Los tipos de pólipos más frecuentes en una cohorte de 88 pacientes fueron los pólipos hiperplásicos (43,6%), seguidos de adenomas (40,4%), hamartomas (38,3%) y pólipos inflamatorios (24,5%) sugiriendo con ello que el síndrome de Cowden debería considerarse como un síndrome de poliposis mixta en lugar de un síndrome hamartomatoso (Stanich et al., 2014). Otro estudio publicado por Kevin Sweet y col. analizaron el gen *PTEN* en pacientes con poliposis mixtas (con adenomas y pólipos hiperplásicos sin hamartomas) y detectaron variantes patogénicas en el 9% de una cohorte de 23 pacientes (Sweet et al., 2005).

Lo más llamativo del caso es la ausencia de pólipos hamartomatosos, y el predominio de adenomas en el colon, lo que conlleva la sospecha de la PAA antes que el síndrome de Cowden, conduciendo el estudio genético dirigido hacia el diagnóstico de síndromes de PAA, y no de *PTEN*. Estos resultados, sumado a lo descrito en la literatura, muestran el elevado grado de solapamiento fenotípico entre síndromes polipósicos, problemática que también se soluciona con la integración de los paneles multigénicos en el diagnóstico asistencial de los síndromes hereditarios de PAA.

2.3. Otros mecanismos de susceptibilidad propuestos

Un hallazgo de esta tesis es la detección de un doble heterocigoto para dos variantes truncantes, localizadas en el exón 2 de *NTHL1* c.268C>T p.(Gln90*) y el exón 2 de *POLE*: c.141delG p.(Phe48Leufs*6). La portadora es una mujer a la que se detectaron 24 adenomas a los 70 años, además de hiperplasia endometrial e hipotiroidismo a los 57 y 58 años, respectivamente (Figura 40A y 40B, Página 131).

POLE, junto con *POLD1*, son las únicas polimerasas nucleares con una actividad correctora intrínseca (actividad exonucleasa 3'-5'), capaz de corregir errores cometidos durante la síntesis de ADN (Henninger & Pursell, 2014). Según el síndrome descrito de PPAP, solo variantes que inactiven el dominio exonucleasa, pero no polimerasa, en los genes *POLE* y *POLD1* serían responsables del síndrome (Palles et al., 2013), mientras que variantes truncantes en estos genes no conferirían esta inestabilidad genética porque conducirían a una inactivación completa de la enzima sin ningún desequilibrio polimerasa-exonucleasa. Sin embargo, no está claro hasta qué punto la falta de un alelo *POLE* puede conducir a la predisposición al cáncer mediante otro mecanismo distinto.

Por otro lado, y de forma similar a la poliposis asociada a *MUTYH*, variantes bialélicas en línea germinal en el gen *NTHL1* se han asociado recientemente con la predisposición a PAA (Weren et al., 2015), debida a una inestabilidad genética por falta de reparación de la 5-hidroxicitosina y el consiguiente aumento en la tasa de mutaciones somáticas C>T (Figura 15, Página 65). En principio, un solo alelo de *NTHL1* es suficiente para ejercer su función correctamente, y no justificaría esta inestabilidad.

En tejidos con una alta tasa de división, como es el caso del epitelio colónico, *NTHL1* se acopla a la síntesis de ADN y sigue la ruta BER larga, dependiente de PCNA y donde *POLE* y *POLD1* son las polimerasas responsables de rellenar el vacío después de la acción de *NTHL1* (Akbari et al., 2009). En este caso, se podría pensar que las variantes truncantes co-ocurrentes en *POLE* y *NTHL1* podrían tener un efecto sinérgico que condujese a una predisposición a la PAA.

Para comprobar esta hipótesis, se realizaron análisis de mutaciones somáticas y análisis de expresión de ARN en distintos adenomas y CCR del portador.

El análisis de mutaciones somáticas mostró una tendencia a cambios C>T (5/12), (Tabla 18, Página 143) aunque estos resultados no fueron muy concluyentes ya que no se

consiguió establecer una firma mutacional debido al bajo número de mutaciones detectadas (Alexandrov et al., 2013; Grolleman, Díaz-Gay, et al., 2019).

El análisis cuantitativo del alelo salvaje *POLE* mostró una disminución significativa de la expresión de *POLE* en todos los adenomas y adenocarcinomas de portadores analizados en comparación con adenocarcinomas de individuos no portadores (Figura 40C, Página 131), lo que es consistente con un estrés replicativo debido a una haploinsuficiencia de *POLE*.

A diferencia de *POLE*, la expresión del alelo salvaje de *NTHL1* se vio significativamente incrementada en dos de los tejidos adenomatosos y adenocarcinomas del portador con respecto a los no portadores (Figura 40D, Página 131). Esta sobreexpresión probablemente sea desencadenada por un mayor daño oxidativo del ADN en tejidos con una alta tasa de división, lo cual regula positivamente la expresión de glucosilasas de la vía BER (Fleming et al., 2017). Los niveles de ARNm del alelo salvaje de *NTHL1* en los tejidos afectados del portador llegan a mostrar una expresión similar a los niveles de ARNm en el grupo de tejidos de no portadores, lo que no es consistente con una haploinsuficiencia de *NTHL1*.

Por lo tanto, se descarta la implicación de la variante monoalélica en *NTHL1*: c.268C>T, p.(Gln90*) en la predisposición a la poliposis de esta paciente y consideramos la posibilidad de que *POLE*: c.141delG p.(Phe48Leufs*6) pueda causar la predisposición a la PAA en este caso por sí misma.

Sólo el 0,005% de las variantes codificantes en *POLE* que se han descrito en gnomAD son truncantes (frameshift o nonsense); no se han descrito homocigotos y todas las variantes truncantes muestran frecuencias alélicas inferiores a 1/10000. Por otro lado, hay dos estudios en la literatura que describen variantes frameshift germinales en *POLE*; la variante c.5621_5622delGT se detectó en un paciente con CCR esporádico a una edad de diagnóstico de 26 años (Smith et al., 2013), y c.1370_1371delAT p.(Tyr457fs*9) se detectó posteriormente en un paciente con PAA (Spier et al., 2015). En cuanto a alteraciones somáticas, recientemente se han descrito mutaciones conductoras somáticas en los dominios polimerasa de *POLE* y *POLD1* (Campbell et al., 2017).

Se comprobó la presencia de ambas variantes en dos de las hijas del probando; siendo una de ellas portadora de la variante en *POLE*, pero no la de *NTHL1*, y la otra no portadora

de ninguna de las variantes (Figura 40B, Página 131). La hija portadora de la variante en *POLE* tiene un diagnóstico de adenoma tubular displásico a los 46 años, pero ningún otro familiar presenta diagnóstico de cáncer o poliposis. Todos estos datos son compatibles con una mutación de novo en *POLE* con un efecto dominante que aún no es posible observar debido a la edad de la hija portadora de la variante.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que propone la asociación de una variante germinal truncante en *POLE* con la predisposición a la PAA mediante un mecanismo de haploinsuficiencia en tejidos tumorales adenomatosos y colorrectales del portador. Este resultado destaca no solo la heterogeneidad genética y la complejidad del síndrome, sino también el potencial de los paneles de genes NGS para la detección y el diagnóstico de nuevas formas hereditarias de enfermedades complejas. Sin embargo, son necesarios más estudios de variantes truncantes germinales en *POLE* en otras poblaciones de PAA, para confirmar su asociación, así como su co-ocurrencia con variantes en otros genes asociados.

Otra aportación destacable del cribado germinal multigénico fue la identificación de 4 pacientes dobles heterocigotos, portadores de dos VSD en distintos genes, algunos de ellos implicados en la misma vía (como ya se ha comentado en el caso de *POLE* y *NTHL1*) lo que nos podría llevar a plantear la posibilidad de herencias digénicas como nuevas formas de susceptibilidad a la PAA. Este hecho ya ha sido sugerido por otros grupos, como el de Mónica Morak y col. donde detectaron un paciente con una variante en *MUTYH*: c.667A>G p.(Ile223Val) en co-ocurrencia con una variante en *OGG1*: c.137G>A p.(Arg46Gln), ambos genes implicados en la vía BER, en un paciente con CCR sincrónico avanzado a los 36 años y múltiples adenomas (Morak et al., 2011). Recientemente se han descrito 3 pacientes de una misma familia con CCR antes de los 60 años y portadores de las variantes *MSH6* (NM_000179.2): c.3299C>T p.(Thr1100Met) y *MUTYH* (NM_001128425.1): c.536A>G p.(Tyr179Cys) sugiriendo que la herencia digénica de las variantes monoalélicas de *MSH6* y *MUTYH* predispone al CCR en esta familia (Schubert et al., 2020).

En nuestra cohorte se detectaron 4 pacientes portadores de 2 VSD. Concretamente, el paciente PAAX-16, portador de una variante en *NTHL1* y otra en *POLE*, ambos implicados en la vía BER; y los pacientes PAAX-49, PAAX-79 y PAAX-136, portadores de dos variantes en genes implicados en las vías BMP, MMR y WNT (Tablas 10 y 11,

Páginas 118-120). Con la integración de los paneles multigénicos en el diagnóstico de las PAA (o de otros síndromes hereditarios al cáncer), aumentarán los casos portadores de más de una variante potencial en estos genes y se aportarán nuevas evidencias acerca de posibles herencias digénicas implicadas en distintos síndromes de PAA hereditarias.

2.4. Papel de *GALNT12* en la predisposición a la PAA

En el estudio germinal de nuestra cohorte, detectamos 4 portadores de la variante NM_024642.4(*GALNT12*): c.907G>A, p.(Asp303Asn) (D303N) en heterocigosis. Todos los probandos de nuestra cohorte que albergaban la variante D303N presentaban PAA de inicio tardío, y todos tenían antecedentes familiares de adenoma y CCR (Tabla 12, Página 132).

La alteración en la actividad de la proteína *GALNT12*, expresada en gran medida en el tracto digestivo e implicada en los pasos iniciales del proceso de O-glicosilación de mucinas, conduce a una glicosilación aberrante que se ha asociado con la carcinogénesis colorrectal (J.-M. Guo et al., 2002). La variante D303N es un alelo raro, presente en menos del 0,3% en las bases de datos de poblaciones consultadas (1000G, EVS, ExAC, gnomAD) (Anexo 9). Se ha publicado un estudio funcional que muestra una actividad parcial del 37% de la variante D303N en comparación con la proteína de tipo salvaje, mientras que en variantes completamente inactivantes la actividad de la proteína se reduce a un 7% o menos (Guda et al., 2009). Posteriormente, Clarke E y col. describieron la co-segregación de la variante D303N con CCR y poliposis en 2 familias que cumplían criterios clínicos de Bethesda (Clarke et al., 2012) Por ello, nos planteamos caracterizar la variante detectada y así poder validar los resultados publicados.

En primer lugar, se amplió el cribado de *GALNT12* en una nueva cohorte de validación de 24 pacientes con las mismas características clínicas, pero no se detectó la variante de estudio ni ninguna otra candidata en el gen *GALNT12*.

Posteriormente, se hizo un análisis de co-segregación en los familiares de los individuos portadores. Ninguna de las tres familias estudiadas mostró un patrón claro de segregación. Solo un familiar con diagnóstico de poliposis (pedigrí PAAX17_II: 8) resultó ser portador de la variante. En los pedigrí PAAX17 y PAAX107, dos familiares con diagnóstico de adenomas no mostraron la variante (Figura 41, Página 134).

Dado que todos los probandos mostraron PAA de inicio tardío y la mayoría de los familiares sanos evaluados tenían alrededor de cuarenta años, los portadores que no habían desarrollado poliposis aún podían desarrollarla en edades posteriores. Sin embargo, es de destacar que 2 familiares ya habían desarrollado algunos adenomas a edades más tempranas (PAAX17_III: 1 y PAAX107_III: 3) y ninguno de ellos era portador de la variante D303N. La frecuencia descrita de adenomas en poblaciones que oscilan entre 40 y 50 años es de alrededor del 4% (Imperiale et al., 2002; Pendergrass et al., 2008), por lo que estos casos podrían explicarse como fenómenos de fenocopia, pero en un contexto de sospecha de predisposición genética a la poliposis no esperaríamos tener muchos casos de adenomas a edades tempranas que no se explican por la supuesta causa de susceptibilidad a la poliposis. Clarke y col. también observaron resultados similares en dos familias Bethesda portadoras de la variante (Clarke et al., 2012). En dicho trabajo, observaron dos casos de poliposis y un CCR en los que no se detectó la variante. Considerando ambos estudios, podemos decir que los resultados de la co-segregación no son concluyentes.

Además, se analizaron 5 adenomas y 1 CCR, y no se detectó LOH del alelo c.907G en ninguna de las muestras. Sin embargo, no fue posible realizar un análisis de metilación y análisis de mutaciones somáticas en *GALNT12*, por lo que no podemos descartar otros segundos eventos somáticos en *GALNT12*.

En esos mismos tejidos se analizaron los patrones de glicosilación de MUC1, principal diana de glicosilación de *GALNT12*. Si hubiera una reducción de la actividad de *GALNT12*, se esperaría un aumento de la proteína MUC1 no glicosilada o patrones de glicosilación anormales en los adenomas portadores. Para ello, se analizó el patrón de glicosilación en 5 adenomas y sus tejidos normales correspondientes, utilizando dos anticuerpos que reconocían la forma total y no glicosilada de la proteína MUC1. Cualquier alteración en la actividad de glicosilación implicaría un aumento en los niveles de MUC1 no glicosilada pero no en los niveles totales. Sin embargo, no se detectaron diferencias en ninguno de los pares adenoma-tejido normal, descartando la causalidad de este alelo en el desarrollo del adenoma (Figura 42, Página 135).

En conjunto, todos los resultados obtenidos sugieren que la variante D303N no es un alelo de alta predisposición para la PAA. No obstante, con el fin de validar los resultados anteriores y comprobar la asociación de la variante con la PAA, se realizó un estudio de

casos y controles en una cohorte de validación más amplia con los mismos criterios de inclusión (N=268) y una cohorte control libre de cáncer (N=714). En este caso, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas en la frecuencia del alelo c.907A entre ambas cohortes (Tabla 13, Página 133). Tras estos resultados, se investigó más a fondo la información clínica sobre los 4 controles portadores: Dos de ellos fallecieron en la vejez sin antecedentes personales o familiares de adenomas, otro tenía dos familiares de segundo grado con CCR de inicio tardío (> 70 años), pero se sometieron a varias colonoscopias sin que se detectaran adenomas, y el último tuvo un diagnóstico de melanoma a los 42 años. Hay que tener en cuenta que el tamaño muestral utilizado en este análisis nos permite detectar diferencias significativas con una potencia estadística mínima del 80% cuando la OR es mayor que 4. Por lo tanto, el resultado del análisis de casos y controles descarta la variante c.907G> A, p.(Asp303Asn) como un alelo de alta penetrancia para la PAA, pero no como un alelo de baja penetrancia.

El cribado de genes candidatos mediante NGS es una herramienta atractiva a nivel de investigación, pero hay que tener mucha cautela en su traslación a la clínica, especialmente con aquellos genes que aún no han mostrado una asociación definitiva o cuyas estimaciones de riesgo no están definidas. En este apartado se muestra cómo una variante inicialmente candidata como variante de alto riesgo a la PA, finalmente se descarta tras estudios complementarios.

.

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ADENOMAS

Para la caracterización molecular de las poliposis de estudio, se llevaron a cabo una serie de análisis genéticos en el ADN de 118 tejidos adenomatosos y/o tumorales de un total de 85 pacientes (53,4% de la cohorte de estudio). Se hicieron estudios de MSI, *BRAF*, metilación del promotor de *MLH1* (Figura 44, Página 137), y cribado genético de *hotspots* en tumores sólidos (TST26) en los tejidos disponibles en cada caso (Figura 45 y 46, Páginas 138 y 140).

De los 85 pacientes incluidos en los estudios moleculares, 3 presentaron MSI y el resto no mostró inestabilidad en ninguno de los microsatélites testados. Dos de los tejidos MSI, un adenoma malignizado y un adenocarcinoma enteroide en los pacientes PAAX11 y PAAX75 respectivamente, mostraron metilación en el promotor de *MLH1* y la mutación en *BRAF*:V600E. Ambos pacientes presentaban poliposis mixtas con más de 20 adenomas y un número muy alto de pólipos hiperplásicos y algunos serrados, y sin mostrar historia familiar de poliposis/CCR. El tercer caso MSI se trata de un adenocarcinoma con falta de expresión en *MLH1* y *PMS2*, que no presenta metilación en *MLH1* ni mutación en *BRAF*. Se trata de un paciente (PAAX15) que presenta más de 20 adenomas con más 20 pólipos hiperplásicos o serrados), diagnóstico de CCR a los 64 años y sin historia familiar de poliposis/CCR. Según la histología y localización de los pólipos, los 3 casos cumplen con los criterios clínicos definidos para el diagnóstico de poliposis serrada (Carballal et al., 2012), y, por lo tanto, seguirían la vía serrada de carcinogénesis. Hay que tener en cuenta, que tanto la metilación del promotor de *MLH1*, como su consecuente inestabilidad a microsatélites, son eventos tardíos en la carcinogénesis colorrectal (Dabir et al., 2020) y nuestra cohorte está enriquecida en tejidos adenomatosos tempranos (displasias de bajo grado en lugar de adenomas avanzados o adenocarcinomas), por lo tanto, no se puede descartar que pueda haber más casos entre la población de estudio que sigan esta vía.

El cribado genético de *hotspots*, se llevó a cabo en 89 adenomas de 58 pacientes. La mayoría de las alteraciones detectadas fueron cambios de un solo nucleótido, con un predominio importante del cambio C>T. Este tipo de cambios suelen ser los más frecuentes en tumores esporádicos o de FAP, los cuales siguen la vía clásica de carcinogénesis colorrectal con alteración inicial en *APC*, ausencia de inestabilidad a microsatélites e inestabilidad cromosómica. La mayoría de las alteraciones detectadas se

localizaron en los genes *APC* (71,9%) y *KRAS* (25%) (Tabla 16, Página 139), genes frecuentemente mutados en las etapas iniciales de la vía clásica de carcinogénesis colorrectal. Estas frecuencias son muy parecidas a las detectadas en otros estudios que analizan cohortes de tumores de pacientes con FAP (N=42) y detectan una frecuencia de mutación en *APC* del 66,6%, o en tumores de cohortes con MAP donde detectan una frecuencia de mutaciones en *APC* del 77,8% (N=27) y del 33,3% en *KRAS* (Thomas et al., 2017). La transición de adenoma a carcinoma invasivo en esta vía de carcinogénesis suele estar asociada con la mutación y/o pérdida del gen supresor de tumores *TP53*, detectada en el 16,9% de nuestra cohorte de tejidos (en el 25,9% de los pacientes), muy similar a la detectada en tumores FAP (16%) en una cohorte de 112 tejidos (Takane et al., 2016).

En definitiva, los datos moleculares obtenidos en estos estudios sugieren que nuestra población de estudio no difiere de las poblaciones de CCR esporádico y poliposis adenomatosas descritas en la bibliografía (Takane et al., 2016; Thomas et al., 2017).

4. CRIBADO DE MOSAICOS EN EL GEN *APC* DE PACIENTES PAA X

El mosaicismo somático en el gen *APC* ya ha sido descrito en casos de PAA sin antecedentes familiares (Aretz et al., 2007; Iwaizumi et al., 2015; Yamaguchi et al., 2015). Sin embargo, la tasa de mosaicismo, hasta ahora, ha estado subestimada debido a la sensibilidad limitada de las técnicas convencionales y la disponibilidad de muestras somáticas para su correcto diagnóstico genético. La NGS ofrece una sensibilidad mayor que las técnicas convencionales, como Sanger y HRM (Rohlin et al., 2009), pudiendo detectar FA del 5%, representando la opción más adecuada para detectar casos de mosaicismo somático.

Estudios recientes basados en NGS reflejan una mayor incidencia de mosaicos en el gen *APC* de la que inicialmente se pensaba, situándola en torno al 25-50% de los casos de PAA no explicadas (Ciavarella et al., 2018; A. M. L. Jansen et al., 2017; Rofes et al., 2021; Spier et al., 2016). El número de muestras incluidas y los criterios utilizados para la definición de mosaicos difieren mucho entre estudios (Tabla 21), lo que podría explicar la gran variación en las tasas de detección:

ESTUDIO	TIPO DE PACIENTES	DEFINICIÓN DE MOSAICO	MOSAICOS/ TOTAL	TÉCNICA
Spier et al., 2016	PAA/PAC	≥2 adenomas portadores de la misma variante alejados más de 10cm	5/20	NGS en adenomas
A. M. L. Jansen et al., 2017	PAA	≥2 adenomas portadores de la misma variante alejados entre sí	9/18	NGS en adenomas
Ciavarella et al., 2018	PAA/PAC	≥3 adenomas portadores portadores de la misma variante (independientemente de la localización)	4/8	PCRd en adenomas, WES en sangre periférica
Rofes et al., 2021	PAC	≥2 adenomas portadores de la misma variante (independiente de localización) o 1 muestra de tejido colónico y/o sangre periférica	7/11	NGS en adenomas, colon normal y/o sangre periférica

Tabla 21. Características y resultados de los estudios descritos en la literatura sobre mosaicos en *APC* basados en NGS y/o PCRd.

En esta tesis se ha llevado a cabo un estudio preliminar de mosaicos en *APC* mediante NGS en una cohorte española de 10 pacientes con PAA no explicada (todos ellos con más de 20 adenomas acumulados) y sin historia familiar de poliposis/CCR. La secuenciación del gen *APC* en al menos dos adenomas de 10 pacientes PAAX ha mostrado 4 casos con sospecha de mosaicismo, y los estudios posteriores de validación han confirmado el mosaicismo en dos de ellos y descartado los otros dos.

Hay que resaltar que en ninguno de los 4 casos se detectó la variante en el ADN germinal. Estos resultados están de acuerdo con otras investigaciones que han evidenciado que los análisis de ADN germinal de sangre periférica no parecen ser el enfoque más adecuado para la detección del mosaicismo (Elsayed et al., 2022; Takao et al., 2021).

Para confirmar la veracidad de los mosaicos detectados, se analizaron más muestras adenomatosas colorrectales en los 4 casos sospechosos, y se consideraron verdaderos mosaicos aquellos pacientes con al menos 3 adenomas metacrónicos y en distintas localizaciones, portadores de la misma variante. Con esta definición, se descartaron las variantes NM_00038: c.646-2A>T en el paciente PAAX-67 y NM_00038: c.4156A>T p.(Arg1386*) en PAAX-50, al no detectarse la variante en la mayoría de los tejidos testados (Figura 50 y 51, Página 149 y 151). Por otro lado, se confirmó el mosaicismo en el paciente PAAX-47, que mostró la variante NM_00038: c.4127_4128delAT p.(Tyr1376Cysfs*9) en 6 de 8 adenomas, y en el paciente PAAX-66 identificándose la variante NM_00038: c.4348C>T p.(Arg1450*) en 6 de 6 adenomas testados (Figura 48, 49 y 52, Páginas 146, 147 y 153).

En el caso del paciente PAAX-47, la ausencia de la variante en dos pólipos (uno de ellos adenomatoso y el otro hiperplásico) es un patrón poco inusual, que puede ser explicado por su localización alejada del resto (Figura 49, Página 147), ilustrando la posible ocurrencia simultánea de pólipos esporádicos (que podrían estar asociados a la edad avanzada del paciente) dentro de un entorno de mosaico. Este ejemplo destaca la importancia del análisis de múltiples adenomas para confirmar el diagnóstico de mosaicismo en estos pacientes.

Se revisó la secuencia del gen *APC*, en cada uno de los adenomas analizados por NGS, en busca de un segundo *hit* somático y se detectó al menos una variante patogénica adicional tanto en los adenomas avanzados como en los adenocarcinomas de ambos pacientes, lo que apoya la causalidad de la variante en mosaico en estos dos pacientes.

En ambos casos, las variantes en mosaico se detectaron solo en tejido colónico y no en sangre periférica, lo que sugiere que se trata de eventos postcigóticos tardíos que afectan al endodermo, pero no al mesodermo (T. M. Tuohy & Burt, 2008).

Con todo ello, en este apartado podemos concluir que los paneles de NGS aportan una mayor sensibilidad que el estudio genético convencional, y que el tejido adenomatoso, y no la sangre periférica, sería la muestra indicada para la identificación de fenómenos de mosaicismo en casos de PAA no explicada y sin antecedentes familiares. Los datos de esta tesis indican, además, que tanto el número de muestras analizadas como su localización, son fundamentales para la correcta interpretación de estos fenómenos genéticos.

Por otro lado, es importante destacar que la PCRd es una técnica con un límite de detección extremadamente bajo (0,1%) (Diaz & Bardelli, 2014), lo que la convierte en una de las mejores opciones para la validación de mosaicos en muestras adicionales.

Estos datos preliminares están de acuerdo con los estudios anteriores en cuanto al incremento en la tasa de detección de mosaicismo, pero sin embargo ponen de manifiesto la necesidad de llevar a cabo el cribado de mosaicos en tres o más muestras de adenomas/CCR, y tener en cuenta su localización, para asegurar la veracidad del mosaico.

5. CRITERIOS CLÍNICOS PROPUESTOS Y ALGORITMO DIAGNÓSTICO

La PAA es un síndrome muy problemático en las CCG: es una enfermedad muy heterogénea, no solo respecto a la clínica sino también a su etiología. Los casos descritos de PAA hereditarios, se deben tanto a síndromes genéticos con patrones de herencia dominante como recesiva, los cuales no se ven acompañados de historia familiar. A la hora de recomendar el estudio genético, no se puede seleccionar en base a la historia familiar, y esto aumenta el número de pacientes en las CCG.

Los criterios de recomendación para el estudio genético desarrollados por las distintas sociedades médicas (ACMG, ACG y CUGC) (apartado 5.2 de la Introducción) son muy poco estrictos, lo que no solo hace que aumenten las solicitudes de pruebas genéticas en los laboratorios de diagnóstico, sino que también disminuya la tasa de detección de variantes patogénicas o probablemente patogénicas (valor predictivo), lo que conlleva una disminución de la rentabilidad y eficiencia del estudio, así como un aumento de la ansiedad al transmitir resultados no informativos.

Los resultados de esta tesis (Tabla 22, Página 174) en concordancia con otros estudios recientes (Herzig et al., 2017), cuestionan el enfoque actualmente recomendado para las pruebas genéticas centradas en los genes de PA en pacientes con un número de adenomas comprendido entre 10 y 19 pólipos acumulados a edades avanzadas. Cuanto más estrictos sean los criterios de recomendación del estudio genético, mayor será el valor predictivo y menores los resultados ambiguos. Por lo tanto, se puede proponer una redefinición más estricta de los criterios clínicos, especialmente en aquellos individuos cuya única sospecha sea la PAA, con independencia de si presentan o no historia familiar, recomendando el estudio genético a los pacientes que presenten más de 40 adenomas a una edad de diagnóstico inferior a 60 años ó más de 20 adenomas antes de los 40 (Figura 53, Página 175).

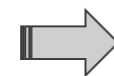
El algoritmo diagnóstico se basaría en un primer cribado germinal mediante un panel NGS multigénico. En aquellos pacientes sin historia familiar con un resultado germinal no informativo, se continuaría con un panel de NGS en adenomas en busca de una variante en mosaico y, si fuera posible, se estudiaría su extensión mediante el análisis de tejidos pertenecientes a las distintas capas embrionarias, para conocer si están afectadas

las células germinales y con ello ser capaces de estimar la probabilidad de transmitir la alteración a su descendencia (Figura 53, Página 175).

PACIENTE	GEN	VARIANTE	N ADENOMAS	EDAD DE DIAGNÓSTICO
3	<i>APC</i>	c.266C>G p.(Ser89*)	96	57
9	<i>APC</i>	c.147_150del p.(Lys49Asnfs*20)	61	62
45	<i>APC</i>	c.3199C>T p.(Gln1067*)	>80	39
35	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A p.(Gly396Asp) c.739C>G p.(Arg247Gly)	21	37
89	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A p.(Gly396Asp) c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p.(Thr504Profs68)	40	56
83	<i>POLE</i>	c.141delG p.(Phe48Leufs*6)	24	74
95	<i>PTEN</i>	c.1003C>T p.(Arg335*)	20	74
47	<i>APC</i> (MOSAICO)	c.4127_4128delAT p.(Tyr1376Cysfs*9)	41-100	36
66	<i>APC</i> (MOSAICO)	c.4348C>T p.(Arg1450*)	41	55

Tabla 22. Características clínicas generales de los pacientes resueltos en este trabajo. A= adenomas.
SA=adenomas sincrónicos.

Derivación de un paciente sospechoso de un síndrome de PAA hereditaria



> 40 adenomas, < 60 años
> 20 adenomas, < 40 años

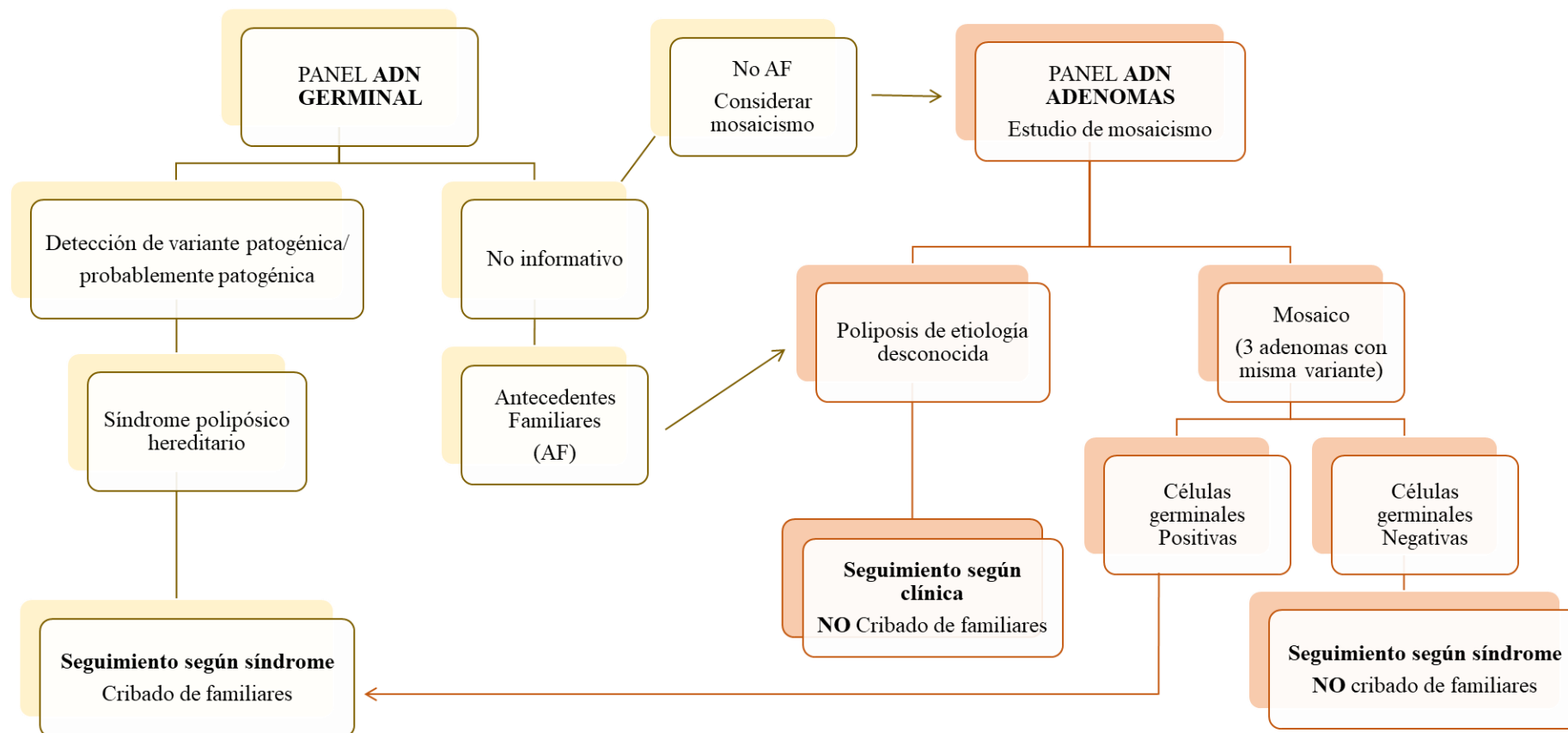


Figura 53. Algoritmo propuesto para el diagnóstico molecular en pacientes con sospecha de un síndrome de PAA hereditaria.

CONCLUSIONES

1. Se han logrado explicar el 5,7% de los casos incluidos, los cuales ya se están beneficiando de un asesoramiento genético familiar adecuado e individualizado.
2. Los casos explicados en los genes de predisposición primaria a la PA presentan todos una PA moderada con detección de, al menos, 40 adenomas antes de los 60 años o más de 20 antes de los 40 años. Confirmando que el grado de severidad de la poliposis se correlaciona con la probabilidad de detectar una alteración en un gen de alta predisposición, que confiera un carácter hereditario a la enfermedad y justifique el seguimiento y profilaxis de familiares portadores.
3. La mayoría de las variantes patogénicas y de significado desconocido detectadas se localizan en los genes de predisposición primaria a la PA; *APC*, *MUTYH*, *POLE*, *POLD1*, *NTHL1*, *AXIN2*. El resto de genes no han mostrado una contribución significativa a la etiología de la enfermedad.
4. Se proponen las variantes truncantes en *POLE* como posibles mecanismos de susceptibilidad a la PAA.
5. La variante *GALNT12*: c.907G>A, p.(Asp303Asn), propuesta previamente como alelo de riesgo a la PAA/CCR, no se asocia a la poliposis y al riesgo al CCR en nuestra población de estudio.
6. La NGS ofrece un claro beneficio en el diagnóstico de patologías que muestran alta heterogeneidad genética, como las PAA, ya que consigue aumentar el valor predictivo sin exigir una complejidad técnica mayor y permite la posibilidad de detectar otras formas hereditarias que no serían identificadas mediante otros enfoques individuales, dirigidos a genes específicos. Combinada con el cribado genético somático de los tejidos afectados, permiten una mejor caracterización de las variantes detectadas aumentando la resolución del estudio.
7. El análisis de mosaicismo en *APC* mediante NGS en tejidos adenomatosos permite explicar un porcentaje importante de PAA (2 de 10 casos). Los datos obtenidos indican que el número de muestras somáticas analizadas como su localización son fundamentales para la correcta interpretación de los mosaicos, y avalan la conveniencia del estudio molecular en tres o más muestras somáticas en pacientes con PAA, sin antecedentes familiares de poliposis/CCR y con estudio germinal previo no informativo.

BIBLIOGRAFÍA

URLs

<https://www.ensembl.org/index.html>

<http://www.HGVS.org/varnomen>

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<https://www.insight-group.org/>

<http://www.lovd.nl/3.0/home>

<http://exac.broadinstitute.org/>

<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

<http://www.internationalgenome.org/>

<http://gnomad.broadinstitute.org>

<http://provean.jcvi.org/index.php>

<http://www.mutationtaster.org/>

<https://string-db.org/>

<http://www.umd.be/HSF/>

<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

https://www.cbioportal.org/mutation_mapper

<https://www.cbioportal.org/oncoprinter>

REFERENCIAS

- Abedalthagafi, M. (2018). Constitutional mismatch repair-deficiency: Current problems and emerging therapeutic strategies. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 83, pp. 35458–35469). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26249>
- Adam, R., Spier, I., Zhao, B., Kloth, M., Marquez, J., Hinrichsen, I., Kirfel, J., Tafazzoli, A., Horpaopan, S., Uhlhaas, S., Stienen, D., Friedrichs, N., Altmüller, J., Laner, A., Holzapfel, S., Peters, S., Kayser, K., Thiele, H., Holinski-Feder, E., ... Aretz, S. (2016a). Exome Sequencing Identifies Biallelic MSH3 Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *American Journal of Human Genetics*, 99(2), 337–351. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2016.06.015>
- Adán Merino, L., Aldeguer Martínez, M., Álvarez Rodríguez, F., Barceló López, M., Plaza Santos, R., & Valentín Gómez, F. (2018). Unusual presenting manifestation of a rare polyposis, Cowden syndrome. *Gastroenterología y Hepatología*, 41(5), 315–317. <https://doi.org/10.1016/J.GASTROHEP.2017.06.005>
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. In *Nature Methods* (Vol. 7, Issue 4, pp. 248–249). Nat Methods. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Aelvoet, A. S., Hoekman, D. R., Redeker, B. J. W., Weegenaar, J., Dekker, E., van Noesel, C. J. M., & Duijkers, F. A. M. (2022). A large family with MSH3-related polyposis. *Familial Cancer*. <https://doi.org/10.1007/S10689-022-00297-X>
- Akbari, M., Peña-Díaz, J., Andersen, S., Liabakk, N. B., Otterlei, M., & Krokan, H. E. (2009). Extracts of proliferating and non-proliferating human cells display different base excision pathways and repair fidelity. *DNA Repair*, 8(7), 834–843. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2009.04.002>
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A. J. R., Behjati, S., Biankin, A. v., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A. L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjörd, J. E., Foekens, J. A., ... Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), 415–421. <https://doi.org/10.1038/NATURE12477>
- Al-Tassan, N., Chmiel, N. H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A. L., Williams, G. T., Hodges, A. K., Davies, D. R., David, S. S., Sampson, J. R., & Cheadle, J. P. (2002). Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nature Genetics*, 30(2), 227–232. <https://doi.org/10.1038/NG828>
- Anderson, J. C. (2014). Pathogenesis and management of serrated polyps: Current status and future directions. *Gut and Liver*, 8(6), 582–589. <https://doi.org/10.5009/gnl14248>
- Archanioti, P., Bornand, A., Sempoux, C., Unger, S., Schoepfer, A., Robert, M., & David, G. (2019). [Abecedary of colonic polyps]. *Revue Medicale Suisse*, 15(660), 1483–1487. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31496171/>

- Arem, H., Moore, S. C., Park, Y., Ballard-Barbash, R., Hollenbeck, A., Leitzmann, M., & Matthews, C. E. (2014). Physical activity and cancer-specific mortality in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort. *International Journal of Cancer*, *135*(2), 423–431. <https://doi.org/10.1002/IJC.28659>
- Aretz, S., Stienen, D., Friedrichs, N., Stemmler, S., Uhlhaas, S., Rahner, N., Propping, P., & Friedl, W. T. (2007). Somatic APC mosaicism: A frequent cause of Familial Adenomatous Polyposis (FAP). *Human Mutation*, *28*(10), 985–992. <https://doi.org/10.1002/humu.20549>
- Aretz, S., Uhlhaas, S., Caspari, R., Mangold, E., Pagenstecher, C., Propping, P., & Friedl, W. (2004). Frequency and parental origin of de novo APC mutations in familial adenomatous polyposis. *European Journal of Human Genetics*, *12*(1), 52–58. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201088>
- Aretz, S., Uhlhaas, S., Goergens, H., Siberg, K., Vogel, M., Pagenstecher, C., Mangold, E., Caspari, R., Propping, P., & Friedl, W. (2006). MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *International Journal of Cancer*, *119*(4), 807–814. <https://doi.org/10.1002/IJC.21905>
- Aretz, S., Vasen, H. F. A., & Olschwang, S. (2015). Clinical Utility Gene Card for: Familial adenomatous polyposis (FAP) and attenuated FAP (AFAP)--update 2014. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *23*(6), e1–e4. <https://doi.org/10.1038/EJHG.2014.193>
- Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2015). Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*, *9*. <https://doi.org/10.3332/ECANCER.2015.520>
- Bai, H., Jones, S., Guan, X., Wilson, T. M., Sampson, J. R., Cheadle, J. P., & Lu, A. L. (2005). Functional characterization of two human MutY homolog (hMYH) missense mutations (R227W and V232F) that lie within the putative hMSH6 binding domain and are associated with hMYH polyposis. *Nucleic Acids Research*, *33*(2), 597–604. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI209>
- Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Vantuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R., & Vogelstein, B. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, *244*(4901), 217–221. <https://doi.org/10.1126/science.2649981>
- Ballester, L. Y., Luthra, R., Kanagal-Shamanna, R., & Singh, R. R. (2016). Advances in clinical next-generation sequencing: target enrichment and sequencing technologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *16*(3), 357–372. <https://doi.org/10.1586/14737159.2016.1133298>
- Balmaña, J., Balaguer, F., Cervantes, A., & Arnold, D. (2013). Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *24* Suppl 6(SUPPL.6). <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDT209>
- Belhadj, S., Mur, P., Navarro, M., González, S., Moreno, V., Capellá, G., & Valle, L. (2017). Delineating the Phenotypic Spectrum of the NTHL1-Associated Polyposis. In *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 461–462). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.09.153>

- Bellido, F., Pineda, M., Aiza, G., Valdés-Mas, R., Navarro, M., Puente, D. A., Pons, T., González, S., Iglesias, S., Darder, E., Piñol, V., Soto, J. L., Valencia, A., Blanco, I., Urioste, M., Brunet, J., Lázaro, C., Capellá, G., Puente, X. S., & Valle, L. (2016). POLE and POLD1 mutations in 529 kindred with familial colorectal cancer and/or polyposis: review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 18(4), 325–332. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.75>
- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(6). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>
- Boparai, K. S., Dekker, E., van Eeden, S., Polak, M. M., Bartelsman, J. F. W. M., Mathus-Vliegen, E. M. H., Keller, J. J., & van Noesel, C. J. M. (2008). Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis. *Gastroenterology*, 135(6), 2014–2018. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.020>
- Boparai, K. S., Mathus-Vliegen, E. M. H., Koornstra, J. J., Nagengast, F. M., van Leerdam, M., van Noesel, C. J. M., Houben, M., Cats, A., van Hest, L. P., Fockens, P., & Dekker, E. (2010). Increased colorectal cancer risk during follow-up in patients with hyperplastic polyposis syndrome: A multicentre cohort study. *Gut*, 59(8), 1094–1100. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.185884>
- Briggs, S., & Tomlinson, I. (2013). Germline and somatic polymerase ϵ and δ mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. *Journal of Pathology*, 230(2), 148–153. <https://doi.org/10.1002/path.4185>
- Brinkmeyer, M. K., & David, S. S. (2015). Distinct functional consequences of MUTYH variants associated with colorectal cancer: Damaged DNA affinity, glycosylase activity and interaction with PCNA and Hus1. *DNA Repair*, 34, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.08.001>
- Brockhausen, I. (2006). The role of galactosyltransferases in cell surface functions and in the immune system. *Drug News and Perspectives*, 19(7), 401–409. <https://doi.org/10.1358/dnp.2006.19.7.1021491>
- Brüel, A., Christensen, E.I., Trantum-Jensen, J., Qvortrup, K., and Geneser, F. (2015). Geneser Histología (Editorial Médica Panamericana).
- Burdova, K., Mihaljevic, B., Sturzenegger, A., Chappidi, N., & Janscak, P. (2015). The Mismatch-Binding Factor MutS β Can Mediate ATR Activation in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Molecular Cell*, 59(4), 603–614. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.026>
- Campbell, B. B., Light, N., Fabrizio, D., Zatzman, M., Fuligni, F., de Borja, R., Davidson, S., Edwards, M., Elvin, J. A., Hodel, K. P., Zahurancik, W. J., Suo, Z., Lipman, T., Wimmer, K., Kratz, C. P., Bowers, D. C., Laetsch, T. W., Dunn, G. P., Johanns, T. M., ... Shlien, A. (2017). Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell*, 171(5), 1042–1056.e10. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.09.048>
- Carballal, S., Moreira, L., Balaguer, F. (2012). Serrated polyps and serrated polyposis syndrome. *Cirugía Española*, 91(3), 141–148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ciresp.2012.12.001>

- Carethers, J. M. (2014). Differentiating lynch-like from lynch syndrome. In *Gastroenterology* (Vol. 146, Issue 3, pp. 602–604). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.041>
- Carethers, J. M., & Stoffel, E. M. (2015). Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(31), 9253–9261. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i31.9253>
- Carvajal-Carmona, L. G., Zauber, A. G., Jones, A. M., Howarth, K., Wang, J., Cheng, T., Riddell, R., Lanas, A., Morton, D., Bertagnolli, M. M., & Tomlinson, I. (2013). Much of the genetic risk of colorectal cancer is likely to be mediated through susceptibility to adenomas. *Gastroenterology*, *144*(1), 53–55. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.016>
- Caspari, R., Olschwang, S., Friedl, W., Mandl, M., Boisson, C., Böker, T., Augustin, A., Kadmon, M., Möslein, G., Thomas, G., & Propping, P. (1995). Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Human Molecular Genetics*, *4*(3), 337–340. <https://doi.org/10.1093/HMG/4.3.337>
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, *2*(5), 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- Chan, J. M., Clendenning, M., Joseland, S., Georgeson, P., Mahmood, K., Walker, R., Como, J., Joo, J. E., Preston, S., Hutchinson, R. A., Pope, B. J., Metz, A., Beard, C., Purvis, R., Arnold, J., Vijay, V., Konycheva, G., Atkinson, N., Parry, S., ... Buchanan, D. D. (2022). Rare germline variants in the AXIN2 gene in families with colonic polyposis and colorectal cancer. *Familial Cancer*, *21*(4), 399–413. <https://doi.org/10.1007/S10689-021-00283-9>
- Chan, M. K., Ocampo-Hafalla, M. T., Vartanian, V., Jaruga, P., Kirkali, G., Koenig, K. L., Brown, S., Lloyd, R. S., Dizdaroglu, M., & Teebor, G. W. (2009). Targeted deletion of the genes encoding NTH1 and NEIL1 DNA N-glycosylases reveals the existence of novel carcinogenic oxidative damage to DNA. *DNA Repair*, *8*(7), 786–794. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.03.001>
- Charames, G. S., Ramyar, L., Mitri, A., Berk, T., Cheng, H., Jung, J., Bocangel, P., Chodirker, B., Greenberg, C., Spriggs, E., & Bapat, B. (2008). A large novel deletion in the APC promoter region causes gene silencing and leads to classical familial adenomatous polyposis in a Manitoba Mennonite kindred. *Human Genetics*, *124*(5), 535–541. <https://doi.org/10.1007/S00439-008-0579-4>
- Chen, P. C., Dudley, S., Hagen, W., Dizon, D., Paxton, L., Reichow, D., Yoon, S. R., Yang, K., Arnheim, N., Liskay, R. M., & Lipkin, S. M. (2005). Contributions by MutL homologues Mlh3 and Pms2 to DNA mismatch repair and tumor suppression in the mouse. *Cancer Research*, *65*(19), 8662–8670. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0742>
- Chubb, D., Broderick, P., Dobbins, S. E., Frampton, M., Kinnersley, B., Penegar, S., Price, A., Ma, Y. P., Sherborne, A. L., Palles, C., Timofeeva, M. N., Bishop, D. T., Dunlop, M. G., Tomlinson, I., & Houlston, R. S. (2016). Rare disruptive mutations and their contribution to

- the heritable risk of colorectal cancer. *Nature Communications*, 7(May), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11883>
- Church, D. N., Stelloo, E., Nout, R. A., Valtcheva, N., Depreeuw, J., ter Haar, N., Noske, A., Amant, F., Tomlinson, I. P. M., Wild, P. J., Lambrechts, D., Jürgenliemk-Schulz, I. M., Jobsen, J. J., Smit, V. T. H. B. M., Creutzberg, C. L., & Bosse, T. (2015). Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(1), 402. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju402>
- Ciavarella, M., Miccoli, S., Prossomariti, A., Pippucci, T., Bonora, E., Buscherini, F., Palombo, F., Zuntini, R., Balbi, T., Ceccarelli, C., Bazzoli, F., Ricciardiello, L., Turchetti, D., & Piazzini, G. (2018). Somatic APC mosaicism and oligogenic inheritance in genetically unsolved colorectal adenomatous polyposis patients. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 26(3), 387–395. <https://doi.org/10.1038/S41431-017-0086-Y>
- Clarke, E., Green, R. C., Green, J. S., Mahoney, K., Parfrey, P. S., Younghusband, H. B., & Woods, M. O. (2012). Inherited deleterious variants in GALNT12 are associated with CRC susceptibility. *Human Mutation*, 33(7), 1056–1058. <https://doi.org/10.1002/humu.22088>
- Cunningham, J. M., Christensen, E. R., Tester, D. J., Kim, C. Y., Roche, P. C., Burgart, L. J., & Thibodeau, S. N. (1998). Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Research*, 58(15), 3455–3460.
- Dabir, P. D., Bruggeling, C. E., van der Post, R. S., Dutilh, B. E., Hoogerbrugge, N., Ligtenberg, M. J. L., Boleij, A., & Nagtegaal, I. D. (2020). Microsatellite instability screening in colorectal adenomas to detect Lynch syndrome patients? A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 28(3), 277–286. <https://doi.org/10.1038/S41431-019-0538-7>
- Dahm, C. C., Keogh, R. H., Spencer, E. A., Greenwood, D. C., Key, T. J., Fentiman, I. S., Shipley, M. J., Brunner, E. J., Cade, J. E., Burley, V. J., Mishra, G., Stephen, A. M., Kuh, D., White, I. R., Luben, R., Lentjes, M. A. H., Khaw, K. T., & Rodwell, S. A. (2010). Dietary Fiber and Colorectal Cancer Risk: A Nested Case–Control Study Using Food Diaries. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(9), 614–626. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJQ092>
- Dámaso, E., González-Acosta, M., Vargas-Parra, G., Navarro, M., Balmaña, J., Y Cajal, T. R., Tuset, N., Thompson, B. A., Marín, F., Fernández, A., Gómez, C., Velasco, À., Solanes, A., Iglesias, S., Urgel, G., López, C., Valle, J. del, Campos, O., Santacana, M., ... Capellá, G. (2020). Comprehensive Constitutional Genetic and Epigenetic Characterization of Lynch-Like Individuals. *Cancers*, 12(7), 1–32. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12071799>
- de Leon, M. P., Pedroni, M., Roncucci, L., Domati, F., Rossi, G., Magnani, G., Pezzi, A., Fante, R., & Bonetti, L. R. (2017). Attenuated polyposis of the large bowel: a morphologic and molecular approach. *Familial Cancer*, 16(2), 211–220. <https://doi.org/10.1007/S10689-016-9938-9>
- De'angelis, G. L., Bottarelli, L., Azzoni, C., De'angelis, N., Leandro, G., di Mario, F., Gaiani, F., & Negri, F. (2018). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Bio-Medica : Atenei Parmensis*, 89(9-S), 97–101. <https://doi.org/10.23750/ABM.V89I9-S.7960>

- Desmet, F. O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-B eroud, G., Claustres, M., & B eroud, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, *37*(9). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP215>
- Diaz, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *32*(6), 579–586. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011>
- Dihlmann, S., Gebert, J., Siermann, A., Herfarth, C., & von Knebel Doeberitz, M. (1999). Dominant negative effect of the APC1309 mutation: A possible explanation for genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *Cancer Research*, *59*(8), 1857–1860.
- Doll e, L., Theise, N. D., Schmelzer, E., Boulter, L., Gires, O., & van Grunsven, L. A. (2015). EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *308*(4), G233–G250. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00069.2014>
- Dominguez-Valentin, M., Therkildsen, C., da Silva, S., & Nilbert, M. (2015). Familial colorectal cancer type X: Genetic profiles and phenotypic features. *Modern Pathology*, *28*(1), 30–36. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.49>
- Dong, X., Seelan, R. S., Qian, C., Mai, M., & Liu, W. (2001). Genomic structure, chromosome mapping and expression analysis of the human AXIN2 gene. *Cytogenetics and Cell Genetics*, *93*(1–2), 26–28. <https://doi.org/10.1159/000056942>
- Eijkelenboom, A., Kamping, E. J., Kastner-van Raaij, A. W., Hendriks-Cornelissen, S. J., Neveling, K., Kuiper, R. P., Hoischen, A., Nelen, M. R., Ligtenberg, M. J., Tops, B. B. (2016). Reliable Next-Generation Sequencing of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Using Single Molecule Tags. *The Journal of Molecular Diagnostics*, *18*(6), 851–863. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.06.010>
- Elsayed, F. A., Tops, C. M. J., Nielsen, M., Morreau, H., Hes, F. J., & van Wezel, T. (2022). Use of sanger and next-generation sequencing to screen for mosaic and intronic APC variants in unexplained colorectal polyposis patients. *Familial Cancer*, *21*(1), 79–83. <https://doi.org/10.1007/S10689-021-00236-2>
- Esteban-Jurado, C., Gim enez-Zaragoza, D., Muñoz, J., Franch-Exp osito, S., Álvarez-Barona, M., Oca a, T., Cuatrecasas, M., Carballal, S., López-Cer n, M., Marti-Solano, M., Díaz-Gay, M., Wezel, T. van, Castells, A., Bujanda, L., Balmaña, J., Gonzalo, V., Llort, G., Ruiz-Ponte, C., Cubiella, J., ... Castellví-Bel, S. (2017). POLE and POLD1 screening in 155 patients with multiple polyps and early-onset colorectal cancer. *Oncotarget*, *8*(16), 26732–26743. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15810>
- Esteban-Jurado, C., Vila-Casades s, M., Garre, P., Lozano, J. J., Pristoupilova, A., Beltran, S., Muñoz, J., Oca a, T., Balaguer, F., López-Cer n, M., Cuatrecasas, M., Franch-Exp osito, S., Piqu e, J. M., Castells, A., Carracedo, A., Ruiz-Ponte, C., Abul , A., Bessa, X., Andreu, M., ... Castellví-Bel, S. (2015). Whole-exome sequencing identifies rare pathogenic variants in new predisposition genes for familial colorectal cancer. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *17*(2), 131–142. <https://doi.org/10.1038/GIM.2014.89>

- Fearon, E. R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *https://doi.org/10.1146/Annurev-Pathol-011110-130235*, 6, 479–507. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PATHOL-011110-130235>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. In *Cell* (Vol. 61, Issue 5, pp. 759–767). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)
- Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., la Vecchia, C., Boffetta, P., & Jenab, M. (2011). Alcohol drinking and colorectal cancer risk: An overall and dose-Response meta-analysis of published studies. *Annals of Oncology*, 22(9), 1958–1972. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq653>
- Ficari, F., Cama, A., Valanzano, R., Curia, M. C., Palmirotta, R., Aceto, G., Esposito, D. L., Crognale, S., Lombardi, A., Messerini, L., Mariani-Costantini, R., Tonelli, F., & Battista, P. (2000). APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *British Journal of Cancer*, 82(2), 348–353. <https://doi.org/10.1054/BJOC.1999.0925>
- Fleming, A. M., Ding, Y., & Burrows, C. J. (2017). Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(10), 2604–2609. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1619809114>
- Fodde, R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 38(7), 867–871. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00040-0)
- Fornaro, R., Frascio, M., Denegri, A., Stabilini, C., Impenatore, M., Mandolino, F., Lazzara, F., & Gianetta, E. (2009). [Chron's disease and cancer]. *Annali Italiani Di Chirurgia*, 80(2), 119–125. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19681293/>
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, 6(269). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2004088>
- Garre, P., Briceño, V., Xicola, R. M., Doyle, B. J., de La Hoya, M., Sanz, J., Llovet, P., Pescador, P., Puente, J., Díaz-Rubio, E., Llor, X., & Caldés, T. (2011). Analysis of the oxidative damage repair genes NUDT1, OGG1, and MUTYH in patients from mismatch repair proficient HNPCC families (MSS-HNPCC). *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(7), 1701–1712. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2491>
- Garre, P., Martín, L., Bando, I., Tosar, A., Llovet, P., Sanz, J., Romero, A., de La Hoya, M., Díaz-Rubio, E., & Caldés, T. (2014). Cancer risk and overall survival in mismatch repair proficient hereditary non-polyposis colorectal cancer, Lynch syndrome and sporadic colorectal cancer. *Familial Cancer*, 13(1), 109–119. <https://doi.org/10.1007/S10689-013-9683-2>
- Garre, P., Martín, L., Sanz, J., Romero, A., Tosar, A., Bando, I., Llovet, P., Diaque, P., García-Paredes, B., Díaz-Rubio, E., de la Hoya, M., & Caldés, T. (2015). BRCA2 gene: a candidate

- for clinical testing in familial colorectal cancer type X. *Clinical Genetics*, 87(6), 582–587. <https://doi.org/10.1111/CGE.12427>
- Giardiello, F. M., Brensinger, J. D., & Petersen, G. M. (2001). AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology*, 121(1), 198–213. <https://doi.org/10.1053/GAST.2001.25581>
- Giardiello, F. M., Brensinger, J. D., Tersmette, A. C., Goodman, S. N., Petersen, G. M., Booker, S. v., Cruz-Correa, M., & Offerhaus, J. A. (2000). Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*, 119(6), 1447–1453. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.20228>
- Giardiello, F. M., & Trimbath, J. D. (2006). Peutz-Jeghers Syndrome and Management Recommendations. In *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 4, Issue 4, pp. 408–415). <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2005.11.005>
- Gómez-Fernández, N., Castellví-Bel, S., Fernández-Rozadilla, C., Balaguer, F., Muñoz, J., Madrigal, I., Milà, M., Graña, B., Vega, A., Castells, A., Carracedo, Á., & Ruiz-Ponte, C. (2009). Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Medical Genetics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-10-57>
- Grady, W. M., Rajput, A., Myeroff, L., Liu, D. F., Kwon, K. H., Willis, J., & Markowitz, S. (1998). Mutation of the type II transforming growth factor- β receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Research*, 58(14), 3101–3104.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., Sargeant, L., Krapcho, K., Wolff, E., Burt, R., Hughes, J. P., Warrington, J., McPherson, J., Wasmuth, J., le Paslier, D., ... White, R. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66(3), 589–600. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90021-0)
- Grolleman, J. E., de Voer, R. M., Elsayed, F. A., Nielsen, M., Weren, R. D. A., Palles, C., Ligtenberg, M. J. L., Vos, J. R., ten Broeke, S. W., de Miranda, N. F. C. C., Kuiper, R. A., Kamping, E. J., Jansen, E. A. M., Vink-Börger, M. E., Popp, I., Lang, A., Spier, I., Hüneburg, R., James, P. A., ... Kuiper, R. P. (2019). Mutational Signature Analysis Reveals NTHL1 Deficiency to Cause a Multi-tumor Phenotype. *Cancer Cell*, 35(2), 256-266.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.12.011>
- Grolleman, J. E., Díaz-Gay, M., Franch-Expósito, S., Castellví-Bel, S., & de Voer, R. M. (2019). Somatic mutational signatures in polyposis and colorectal cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 69, 62–72. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2019.05.002>
- Grover, S., Kastrinos, F., Steyerberg, E. W., Cook, E. F., Dewanwala, A., Burbidge, L. A., Wenstrup, R. J., & Syngal, S. (2012). Prevalence and phenotypes of APC and MUTYH mutations in patients with multiple colorectal adenomas. *JAMA*, 308(5), 485–492. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2012.8780>
- Guda, K., Moinova, H., He, J., Jamison, O., Ravi, L., Natale, L., Lutterbaugh, J., Lawrence, E., Lewis, S., Willson, J. K. V., Lowe, J. B., Wiesner, G. L., Parmigiani, G., Barnholtz-Sloan,

- J., Dawson, D. W., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., ... Markowitz, S. D. (2009). Inactivating germ-line and somatic mutations in polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 in human colon cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12921–12925. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901454106>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., de Sousa .E Melo, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., ... Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21(11), 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/NM.3967>
- Guo, J. M., Chen, H. L., Wang, G. M., Zhang, Y. K., & Narimatsu, H. (2004). Expression of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-12 in gastric and colonic cancer cell lines and in human colorectal cancer. *Oncology*, 67(3–4), 271–276. <https://doi.org/10.1159/000081328>
- Guo, J.-M., Zhang, Y., Cheng, L., Iwasaki, H., Wang, H., Kubota, T., Tachibana, K., & Narimatsu, H. (2002). Molecular cloning and characterization of a novel member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, pp-GalNAc-T12. *FEBS Letters*, 524(1–3), 211–218. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03007-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03007-7)
- Guraya, S. Y. (2015). Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review. *World Journal of Gastroenterology*, 21(19), 6026–6031. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i19.6026>
- Haggar, F. A., & Boushey, R. P. (2009). Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 22(4), 191–197. <https://doi.org/10.1055/S-0029-1242458/ID/42>
- Halford, S. E. R., Rowan, A. J., Lipton, L., Sieber, O. M., Pack, K., Thomas, H. J. W., Hodgson, S. v., Bodmer, W. F., & Tomlinson, I. P. M. (2003). Germline mutations but not somatic changes at the MYH locus contribute to the pathogenesis of unselected colorectal cancers. *The American Journal of Pathology*, 162(5), 1545–1548. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64288-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64288-5)
- Hamilton, S. R., Liu, B., Parsons, R. E., Papadopoulos, N., Jen, J., Powell, S. M., Krush, A. J., Berk, T., Cohen, Z., Tetu, B., Burger, P. C., Wood, P. A., Taqi, F., Booker, S. v., Petersen, G. M., Offerhaus, G. J. A., Tersmette, A. C., Giardiello, F. M., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1995). The molecular basis of Turcot's syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 332(13), 839–847. <https://doi.org/10.1056/NEJM199503303321302>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. In *Cell* (Vol. 100, Issue 1, pp. 57–70). Cell. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). Cell. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Hankey, W., Frankel, W. L., & Groden, J. (2018). Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 37, Issue 1, pp. 159–172). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9725-6>
- Hansen, M. F., Johansen, J., Bjørnevoll, I., Sylvander, A. E., Steinsbekk, K. S., Sætrum, P., Sandvik, A. K., Drabløs, F., & Sjrursen, W. (2015). A novel POLE mutation associated with cancers of colon, pancreas, ovaries and small intestine. *Familial Cancer*, *14*(3), 437–448. <https://doi.org/10.1007/s10689-015-9803-2>
- Haugen, A. C., Goel, A., Yamada, K., Marra, G., Nguyen, T.-P., Nagasaka, T., Kanazawa, S., Koike, J., Kikuchi, Y., Zhong, X., Arita, M., Shibuya, K., Oshimura, M., Hemmi, H., Boland, C. R., & Koi, M. (2008). Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer Research*, *68*(20), 8465–8472. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0002>
- He, X., Arrotta, N., Radhakrishnan, D., Wang, Y., Romigh, T., & Eng, C. (2013). Cowden syndrome-related mutations in PTEN associate with enhanced proteasome activity. *Cancer Research*, *73*(10), 3029–3040. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3811>
- Heald, B., Mester, J., Rybicki, L., Orloff, M. S., Burke, C. A., & Eng, C. (2010). Frequent gastrointestinal polyps and colorectal adenocarcinomas in a prospective series of PTEN mutation carriers. *Gastroenterology*, *139*(6), 1927–1933. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.061>
- Hegde, M., Ferber, M., Mao, R., Samowitz, W., & Ganguly, A. (2014). ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *16*(1), 101–116. <https://doi.org/10.1038/GIM.2013.166>
- Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Höglund, P., Järvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpää, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W., Olschwang, S., Olsen, A. S., ... Aaltonen, L. A. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, *391*(6663), 184–187. <https://doi.org/10.1038/34432>
- Henninger, E. E., & Pursell, Z. F. (2014). DNA polymerase ε and its roles in genome stability. In *IUBMB Life* (Vol. 66, Issue 5, pp. 339–351). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/iub.1276>
- Heppner Goss, K., Trzepacz, C., Tuohy, T. M. F., & Groden, J. (2002). Attenuated APC alleles produce functional protein from internal translation initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(12), 8161–8166. <https://doi.org/10.1073/pnas.112072199>
- Herzig, D., Hardimann, K., Weiser, M., Yu, N., Paquette, I., Feingold, D. L., & Steele, S. R. (2017). The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Management of Inherited Polyposis Syndromes. *Diseases of the Colon and Rectum*, *60*(9), 881–894. <https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000000912>

- Hes, F. J., Nielsen, M., Bik, E. C., Konvalinka, D., Wijnen, J. T., Bakker, E., Vasen, H. F. A., Breuning, M. H., & Tops, C. M. J. (2008). Somatic APC mosaicism: an underestimated cause of polyposis coli. *Gut*, *57*(1), 71–76. <https://doi.org/10.1136/GUT.2006.117796>
- Hesson, L. B., Hitchins, M. P., & Ward, R. L. (2010). Epimutations and cancer predisposition: Importance and mechanisms. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 20, Issue 3, pp. 290–298). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.02.005>
- Hitchins, M. P. (2016). Finding the needle in a haystack: identification of cases of Lynch syndrome with MLH1 epimutation. *Familial Cancer*, *15*(3), 413–422. <https://doi.org/10.1007/S10689-016-9887-3>
- Hoang, J. M., Cottu, P. H., Thuille, B., Salmon, R. J., Thomas, G., & Hamelin, R. (1997). BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Research*, *57*(2), 300–303. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9000572/>
- Howe, J. R., Bair, J. L., Sayed, M. G., Anderson, M. E., Mitros, F. A., Petersen, G. M., Velculescu, V. E., Traverso, G., Vogelstein, B. (2001). Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nature Genetics*. *28*(2):184-7. <https://doi.org/10.1038/88919>
- Howe, J. R., Haidle, J. L., Lal, G., Bair, J., Song, C., Pechman, B., Chinnathambi, S., Lynch, H. T. ENG mutations in MADH4/BMPR1A mutation negative patients with juvenile polyposis. (2007). *Clinical Genetics*. *71*(1):91-92. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00734.x>.
- Howe, J. R., Roth, S., Ringold, J. C., Summers, R. W., Järvinen, H. J., Sistonen, P., Tomlinson, I. P., Houlston, R. S., Bevan, S., Mitros, F. A., Stone, E. M., Aaltonen, L. A. (1998). Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science*, *280*(5366), 1086–1088. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1086>
- Huang, L., Yang, Y., Yang, F., Liu, S., Zhu, Z., Lei, Z., & Guo, J. (2018). Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, *42*(4), 1771–1785. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2018.3764>
- Hyman, N. H., Anderson, P., & Blasyk, H. (2004). Hyperplastic polyposis and the risk of colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, *47*(12), 2101–2104. <https://doi.org/10.1007/s10350-004-0709-6>
- IJspeert, J. E. G., Bevan, R., Senore, C., Kaminski, M. F., Kuipers, E. J., Mroz, A., Bessa, X., Cassoni, P., Hassan, C., Repici, A., Balaguer, F., Rees, C. J., & Dekker, E. (2017). Detection rate of serrated polyps and serrated polyposis syndrome in colorectal cancer screening cohorts: a European overview. *Gut*, *66*(7), 1225–1232. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310784>
- Imai, K., Sarker, A. H., Akiyama, K., Ikeda, S., Yao, M., Tsutsui, K., Shohmori, T., & Seki, S. (1998). Genomic structure and sequence of a human homologue (NTHL1/NTH1) of Escherichia coli endonuclease III with those of the adjacent parts of TSC2 and SLC9A3R2 genes. *Gene*, *222*(2), 287–295. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00485-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00485-5)

- Imperiale, T. F., Wagner, D. R., Lin, C. Y., Larkin, G. N., Rogge, J. D., & Ransohoff, D. F. (2002). Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *The New England Journal of Medicine*, *346*(23), 1781–1785. <https://doi.org/10.1056/NEJM200206063462304>
- Iwaizumi, M., Tao, H., Yamaguchi, K., Yamada, H., Shinmura, K., Kahyo, T., Yamanaka, Y., Kurachi, K., Sugimoto, K., Furukawa, Y., & Sugimura, H. (2015). A novel APC mosaicism in a patient with familial adenomatous polyposis. *Human Genome Variation*, *2*(1). <https://doi.org/10.1038/HGV.2015.57>
- Jaeger, E., Leedham, S., Lewis, A., Segditsas, S., Becker, M., Cuadrado, P. R., Davis, H., Kaur, K., Heinemann, K., Howarth, K., East, J., Taylor, J., Thomas, H., & Tomlinson, I. (2012). Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nature Genetics*, *44*(6), 699–703. <https://doi.org/10.1038/ng.2263>
- Jaeger, E., Webb, E., Howarth, K., Carvajal-Carmona, L., Rowan, A., Broderick, P., Walther, A., Spain, S., Pittman, A., Kemp, Z., Sullivan, K., Heinemann, K., Lubbe, S., Domingo, E., Barclay, E., Martin, L., Gorman, M., Chandler, I., Vijayakrishnan, J., ... Tomlinson, I. (2008). Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. *Nature Genetics*, *40*(1), 26–28. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.41>
- Jahid, S., Sun, J., Gelincik, O., Blecua, P., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Zhou, K., Jasin, M., Gümüş, Z. H., & Lipkin, S. M. (2017). Inhibition of colorectal cancer genomic copy number alterations and chromosomal fragile site tumor suppressor FHIT and WWOX deletions by DNA mismatch repair. *Oncotarget*, *8*(42), 71574–71586. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.17776>
- Jamuar, S. S. hekhkar, & Tan, E. C. (2015). Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. *Human Genomics*, *9*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/S40246-015-0031-5>
- Jansen, A. M. L., Crobach, S., Geurts-Giele, W. R. R., van den Akker, B. E. W. M., Garcia, M. V., Ruano, D., Nielsen, M., Tops, C. M. J., Wijnen, J. T., Hes, F. J., van Wezel, T., Dinjens, W. N. M., & Morreau, H. (2017). Distinct Patterns of Somatic Mosaicism in the APC Gene in Neoplasms From Patients With Unexplained Adenomatous Polyposis. *Gastroenterology*, *152*(3), 546-549.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.040>
- Jansen, A. M., van Wezel, T., van den Akker, B. E., Ventayol Garcia, M., Ruano, D., Tops, C. M., Wagner, A., Letteboer, T. G., Gómez-García, E. B., Devilee, P., Wijnen, J. T., Hes, F. J., & Morreau, H. (2016). Combined mismatch repair and POLE/POLD1 defects explain unresolved suspected Lynch syndrome cancers. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *24*(7), 1089–1092. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.252>
- Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2044–2058. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2010.01.054>

- Jass, J. R. (2007a). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50(1), 113–130. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2559.2006.02549.X>
- Jass, J. R. (2007b). Heredity and DNA methylation in colorectal cancer. *Gut*, 56(1), 154. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.109686>
- Jass, J. R., Stewart, S. M., Stewart, J., & Lane, M. R. (1994). Hereditary non-polyposis colorectal cancer--morphologies, genes and mutations. *Mutation Research*, 310(1), 125–133. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90016-7)
- Jenkins, M. A., Hayashi, S., O'Shea, A. M., Burgart, L. J., Smyrk, T. C., Shimizu, D., Waring, P. M., Ruzskiewicz, A. R., Pollett, A. F., Redston, M., Barker, M. A., Baron, J. A., Casey, G. R., Dowty, J. G., Giles, G. G., Limburg, P., Newcomb, P., Young, J. P., Walsh, M. D., ... Jass, J. R. (2007). Pathology Features in Bethesda Guidelines Predict Colorectal Cancer Microsatellite Instability: A Population-Based Study. *Gastroenterology*, 133(1), 48–56. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.044>
- Jess, T., Rungoe, C., & Peyrin-Biroulet, L. (2012). Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(6), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.01.010>
- Jones, S., Emmerson, P., Maynard, J., Best, J. M., Jordan, S., Williams, G. T., Sampson, J. R., & Cheadle, J. P. (2002). Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Human Molecular Genetics*, 11(23), 2961–2967. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.23.2961>
- Kadrić, N., Mesić, D., Bazardzanović, M. Anatomija kolona, rektuma i anusa [Anatomy of the colon, rectum and anus]. (2003). *Med Arh*. 57(3 Suppl 1):29-31.
- Kastrinos, F., & Stoffel, E. M. (2014). History, genetics, and strategies for cancer prevention in lynch syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 12(5), 715–727. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.06.031>
- Kawasaki, T., Ohnishi, M., Noshō, K., Suemoto, Y., Kirkner, G. J., Meyerhardt, J. A., Fuchs, C. S., & Ogino, S. (2008). CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) colorectal cancer shows not only few methylated CIMP-high-specific CpG islands, but also low-level methylation at individual loci. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21(3), 245–255. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.3800982>
- Kesti, T., Frantti, H., & Syväoja, J. E. (1993). Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of human DNA polymerase epsilon. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(14), 10238–10245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486689>
- Kim, S. E., Paik, H. Y., Yoon, H., Lee, J. E., Kim, N., Sung, M. K. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. (2015). *World J Gastroenterology*, 21(17):5167-75. doi: 10.3748/wjg.v21.i17.5167.

- Knudsen, A. L., Bisgaard, M. L., & Bülow, S. (2003). Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Familial Cancer*, 2(1), 43–55. <https://doi.org/10.1023/A:1023286520725>
- Kolodner, R. D., & Marsischky, G. T. (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion in Genetics and Development*, 9(1), 89–96. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)80013-6](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(99)80013-6)
- Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), 1073–1082. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
- Lagarde, A., Rouleau, E., Ferrari, A., Noguchi, T., Qiu, J., Briaux, A., Bourdon, V., Rémy, V., Gaildrat, P., Adélaïde, J., Birnbaum, D., Lidereau, R., Sobol, H., & Olschwang, S. (2010). Germline APC mutation spectrum derived from 863 genomic variations identified through a 15-year medical genetics service to French patients with FAP. *Journal of Medical Genetics*, 47(10), 721–722. <https://doi.org/10.1136/JMG.2010.078964>
- Lammi, L., Arte, S., Somer, M., Jarvinen, H., Lahermo, P., Thesleff, I., Pirinen, S., & Nieminen, P. (2004). Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *American Journal of Human Genetics*, 74(5), 1043–1050. <https://doi.org/10.1086/386293>
- Levi, Z., Baris, H. N., Kedar, I., Niv, Y., Geller, A., Gal, E., Gingold, R., Morgenstern, S., Baruch, Y., Leach, B. H., Bronner, M. P., & Eng, C. (2011). Upper and Lower Gastrointestinal Findings in PTEN Mutation-Positive Cowden Syndrome Patients Participating in an Active Surveillance Program. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 2(11). <https://doi.org/10.1038/CTG.2011.4>
- Levy, S. E., & Myers, R. M. (2016). Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17(1), 95–115. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022413>
- Liang, J., Lin, C., Hu, F., Wang, F., Zhu, L., Yao, X., Wang, Y., Zhao, Y. (2013). APC polymorphisms and the risk of colorectal neoplasia: a HuGE review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 177(11), 1169–79. <https://doi.org/10.1093/aje/kws382>
- Liang, P. S., Chen, T. Y., & Giovannucci, E. (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 124(10), 2406–2415. <https://doi.org/10.1002/IJC.24191>
- Ligtenberg, M. J. L., Kuiper, R. P., Chan, T. L., Goossens, M., Hebeda, K. M., Voorendt, M., Lee, T. Y. H., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S. J. B., Tsui, W. Y., Kong, C. K., Brunner, H. G., van Kessel, A. G., Yuen, S. T., van Krieken, J. H. J. M., Leung, S. Y., & Hoogerbrugge, N. (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nature Genetics*, 41(1), 112–117. <https://doi.org/10.1038/NG.283>
- Lindor, N. M., Rabe, K., Petersen, G. M., Haile, R., Casey, G., Baron, J., Gallinger, S., Bapat, B., Aronson, M., Hopper, J., Jass, J., LeMarchand, L., Grove, J., Potter, J., Newcomb, P., Terdiman, J. P., Conrad, P., Moslein, G., Goldberg, R., ... Seminara, D. (2005). Lower

- cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: Familial colorectal cancer type X. *Journal of the American Medical Association*, 293(16), 1979–1985. <https://doi.org/10.1001/jama.293.16.1979>
- Lipton, L., Halford, S. E., Johnson, V., Novelli, M. R., Jones, A., Cummings, C., Barclay, E., Sieber, O., Sadat, A., Bisgaard, M.-L., Hodgson, S. v, Aaltonen, L. A., Thomas, H. J. W., & Tomlinson, I. P. M. (2003). Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Research*, 63(22), 7595–7599. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633673>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R. S., Taniguchi, K., Krishnadath, K. K., Halling, K. C., Cunningham, J. M., Qian, C., Christensen, E., Roche, P. C., Smith, D. I., & Thibodeau, S. N. (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nature Genetics*, 26(2), 146–147. <https://doi.org/10.1038/79859>
- Llor, X., Pons, E., Xicola, R. M., Castells, A., Alenda, C., Piñol, V., Andreu, M., Castellví-Bel, S., Payá, A., Jover, R., Bessa, X., Girós, A., Roca, A., & Gassull, M. A. (2005). Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(20), 7304–7310. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0965>
- Long, J. M., Powers, J. M., & Katona, B. W. (2022). Evaluation of Classic, Attenuated, and Oligopolyposis of the Colon. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 32(1), 95–112. <https://doi.org/10.1016/J.GIEC.2021.08.003>
- Lubbe, S. J., Pittman, A. M., Matijssen, C., Twiss, P., Olver, B., Lloyd, A., Qureshi, M., Brown, N., Nye, E., Stamp, G., Blagg, J., Houlston, R. S. (2011). Evaluation of germline BMP4 mutation as a cause of colorectal cancer. *Human Mutation*. 32(1):1928-1938. <https://doi.org/10.1002/humu.21376>.
- Lucci-Cordisco, E., Risio, M., Venesio, T., & Genuardi, M. (2013). The growing complexity of the intestinal polyposis syndromes. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 161A(11), 2777–2787. <https://doi.org/10.1002/AJMG.A.36253>
- Lynch, H. T., Lynch, P. M., Lanspa, S. J., Snyder, C. L., Lynch, J. F., & Boland, C. R. (2009). Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics*, 76(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/J.1399-0004.2009.01230.X>
- Macken, W. L., Tischkowitz, M., & Lachlan, K. L. (2019). PTEN Hamartoma tumor syndrome in childhood: A review of the clinical literature. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 181(4), 591–610. <https://doi.org/10.1002/AJMG.C.31743>

- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387–402. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENOM.9.081307.164359>
- Markkanen, E., Dorn, J., & Hübscher, U. (2013). MUTYH DNA glycosylase: The rationale for removing undamaged bases from the DNA. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 4, Issue FEB). <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00018>
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Brattain, M., & Willson, J. K. V. (1995). Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 268(5215), 1336–1338. <https://doi.org/10.1126/science.7761852>
- Martín-Morales, L., Feldman, M., Vershinin, Z., Garre, P., Caldés, T., & Levy, D. (2017). SETD6 dominant negative mutation in familial colorectal cancer type X. *Human Molecular Genetics*, 26(22), 4481–4493. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx336>
- Marvin, M. L., Mazzoni, S. M., Herron, C. M., Edwards, S., Gruber, S. B., & Petty, E. M. (2011). AXIN2-associated autosomal dominant ectodermal dysplasia and neoplastic syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 155(4), 898–902. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33927>
- McGarrity, T. J., Kulin, H. E., & Zaino, R. J. (2000). Peutz-Jeghers syndrome. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(3), 596–604. <https://doi.org/10.1111/J.1572-0241.2000.01831.X>
- Mester, J. L., Ghosh, R., Pesaran, T., Huether, R., Karam, R., Hruska, K. S., Costa, H. A., Lachlan, K., Ngeow, J., Barnholtz-Sloan, J., Sesock, K., Hernandez, F., Zhang, L., Milko, L., Plon, S. E., Hegde, M., & Eng, C. (2018). Gene-specific criteria for PTEN variant curation: Recommendations from the ClinGen PTEN Expert Panel. *Human Mutation*, 39(11), 1581–1592. <https://doi.org/10.1002/HUMU.23636>
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., & Pesole, G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology*, 3(3). <https://doi.org/10.1186/GB-2002-3-3-REVIEWS0004>
- Minoo, P., Moyer, M. P., & Jass, J. R. (2007). Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumourigenesis. *Journal of Pathology*, 212(2), 124–133. <https://doi.org/10.1002/path.2160>
- Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T., & Nakamura, Y. (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Human Molecular Genetics*, 1(4), 229–233. <https://doi.org/10.1093/hmg/1.4.229>
- Moisio, A. L., Järvinen, H., & Peltomäki, P. (2002). Genetic and clinical characterisation of familial adenomatous polyposis: a population based study. *Gut*, 50(6), 845–850. <https://doi.org/10.1136/GUT.50.6.845>
- Mongin, C., Coulet, F., Lefevre, J. H., Colas, C., Svrcek, M., Eyries, M., Lahely, Y., Fléjou, J. F., Soubrier, F., & Parc, Y. (2012). Unexplained polyposis: a challenge for geneticists,

- pathologists and gastroenterologists. *Clinical Genetics*, 81(1), 38–46. <https://doi.org/10.1111/J.1399-0004.2011.01676.X>
- Morak, M., Heidenreich, B., Keller, G., Hampel, H., Laner, A., de La Chapelle, A., & Holinski-Feder, E. (2014). Biallelic MUTYH mutations can mimic Lynch syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 22(11), 1334–1337. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.15>
- Morak, M., Massdorf, T., Sykora, H., Kerscher, M., & Holinski-Feder, E. (2011). First evidence for digenic inheritance in hereditary colorectal cancer by mutations in the base excision repair genes. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 47(7), 1046–1055. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2010.11.016>
- Moreira, L., Pellisé, M., Carballal, S., Bessa, X., Ocaña, T., Serradesanferm, A., Grau, J., Macià, F., Andreu, M., Castells, A., & Balaguer, F. (2013). High prevalence of serrated polyposis syndrome in FIT-based colorectal cancer screening programmes. *Gut*, 62(3), 476–477. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2012-303496>
- Myers, D. J., & Arora, K. (2022). Villous Adenoma. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470272/>
- Nagase, H., Miyoshi, Y., Horii, A., Aoki, T., Ogawa, M., Utsunomiya, J., Baba, S., Sasazuki, T., & Nakamura, Y. (1992). Correlation between the Location of Germ-Line Mutations in the APC Gene and the Number of Colorectal Polyps in Familial Adenomatous Polyposis Patients. *Cancer Research*, 52(14), 4055–4057.
- Nagy, R., Sweet, K., & Eng, C. (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 2004 23:38, 23(38), 6445–6470. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207714>
- Nguyen, L. H., Goel, A., & Chung, D. C. (2020). Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158(2), 291–302. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2019.08.059>
- Nieminen, T. T., Pavicic, W., Porkka, N., Kankainen, M., Järvinen, H. J., Lepistö, A., & Peltomäki, P. (2016). Pseudoexons provide a mechanism for allele-specific expression of APC in familial adenomatous polyposis. *Oncotarget*, 7(43), 70685–70698. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12206>
- Nieuwenhuis, M. H., & Vasen, H. F. A. (2007). Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 61(2), 153–161. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2006.07.004>
- Olkinuora, A., Nieminen, T. T., Mårtensson, E., Rohlin, A., Ristimäki, A., Koskenvuo, L., Lepistö, A., Silander, G., Kuchinskaya, E., Aravidis, C., Zagoras, T., Nilbert, M., Borg, Å., Gebre-Medhin, S., Nordling, M., & Peltomäki, P. (2019). Biallelic germline nonsense variant of MLH3 underlies polyposis predisposition. *Genetics in Medicine*, 21(8), 1868–1873. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0405-x>
- Palles, C., Cazier, J. B., Howarth, K. M., Domingo, E., Jones, A. M., Broderick, P., Kemp, Z., Spain, S. L., Almeida, E. G., Salguero, I., Sherborne, A., Chubb, D., Carvajal-Carmona, L. G., Ma, Y., Kaur, K., Dobbins, S., Barclay, E., Gorman, M., Martin, L., ... Rimmer, A. (2013). Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1

- predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nature Genetics*, 45(2), 136–143. <https://doi.org/10.1038/NG.2503>
- Pendergrass, C. J., Edelstein, D. L., Hyland, L. M., Phillips, B. T., Iacobuzio-Donahue, C., Romans, K., Griffin, C. A., Cruz-Correa, M., Tersmette, A. C., Offerhaus, G. J. A., & Giardiello, F. M. (2008). Occurrence of colorectal adenomas in younger adults: an epidemiologic necropsy study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 6(9), 1011–1015. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2008.03.022>
- Peterlongo, P., Howe, L. R., Radice, P., Sala, P., Hong, Y. J., Hong, S. il, Mitra, N., Offit, K., & Ellis, N. A. (2005). Germline mutations of AXIN2 are not associated with nonsyndromic colorectal cancer. *Human Mutation* 25(5), 498–500. <https://doi.org/10.1002/humu.20189>
- Peters, U., Jiao, S., Schumacher, F. R., Hutter, C. M., Aragaki, A. K., Baron, J. A., Berndt, S. I., Bézieau, S., Brenner, H., Butterbach, K., Caan, B. J., Campbell, P. T., Carlson, C. S., Casey, G., Chan, A. T., Chang-Claude, J., Chanock, S. J., Chen, L. S., Coetzee, G. A., ... Hsu L; Colon Cancer Family Registry and the Genetics and Epidemiology of Colorectal Cancer Consortium. (2013). Identification of Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Tumors in a Genome-Wide Meta-analysis. *Gastroenterology*. 144(4):799-807.e24. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.12.020>.
- Peters, U., Bien, S., Zubair, N. (2015). Genetic architecture of colorectal cancer. *Gut*. 64(10):1623-36. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306705>.
- Petersen, B. S., Fredrich, B., Hoepfner, M. P., Ellinghaus, D., & Franke, A. (2017). Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genetics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12863-017-0479-5>
- Pilarski, R., Burt, R., Kohlman, W., Pho, L., Shannon, K. M., & Swisher, E. (2013). Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: systematic review and revised diagnostic criteria. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(21), 1607–1616. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt277>
- Plesec, T., Brown, K., Allen, C., A. Burke, C., Church, J., Kalady, M., LaGuardia, L., O'Malley, M., & Heald, B. (2017). Clinicopathological features of a kindred with SCG5-GREM1-associated hereditary mixed polyposis syndrome. *Human Pathology*, 60, 75–81. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2016.10.002>
- Porter, M. G., & Stoeger, S. M. (2017). Atypical Colorectal Neoplasms. In *Surgical Clinics of North America* (Vol. 97, Issue 3, pp. 641–656). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2017.01.011>
- Poulsen, M., & Bisgaard, M. (2008). MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Current Genomics*, 9(6), 420–435. <https://doi.org/10.2174/138920208785699562>
- Preston, B. D., Albertson, T. M., & Herr, A. J. (2010). DNA replication fidelity and cancer. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 20, Issue 5, pp. 281–293). <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.10.009>

- Quintana, I., Mejías-Luque, R., Terradas, M., Navarro, M., Piñol, V., Mur, P., Belhadj, S., Grau, E., Darder, E., Solanes, A., Brunet, J., Capellá, G., Gerhard, M., & Valle, L. (2018). Evidence suggests that germline RNF43 mutations are a rare cause of serrated polyposis. In *Gut* (Vol. 67, Issue 12, pp. 2230–2232). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315733>
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., & Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302), 967–969. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5302.967>
- Randall Cooper, C., Scully, B. F., & Lee-Kong, S. (2018). Colorectal sarcoma: More than a gastrointestinal stromal tumor. In *Translational Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 3, Issue July). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tgh.2018.07.05>
- Ravi, R. K., Walton, K., & Khosroheidari, M. (2018). MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1706, 223–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_12
- Reha-Krantz, L. J. (2010). DNA polymerase proofreading: Multiple roles maintain genome stability. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1804, Issue 5, pp. 1049–1063). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.06.012>
- Renkonen, E. T., Nieminen, P., Abdel-Rahman, W. M., Moisio, A. L., Järvelä, I., Arte, S., Järvinen, H. J., & Peltomäki, P. (2005). Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(24), 5651–5659. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.14.712>
- Rex, D. K., Ahnen, D. J., Baron, J. A., Batts, K. P., Burke, C. A., Burt, R. W., Goldblum, J. R., Guillem, J. G., Kahi, C. J., Kalady, M. F., O'Brien, M. J., Odze, R. D., Ogino, S., Parry, S., Snover, D. C., Torlakovic, E. E., Wise, P. E., Young, J., & Church, J. (2012). Serrated lesions of the colorectum: Review and recommendations from an expert panel. In *American Journal of Gastroenterology* (Vol. 107, Issue 9, pp. 1315–1329). <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.161>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/GIM.2015.30>
- Riggins, G. J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Thiagalingam, S. (1997). Frequency of Smad gene mutations in human cancers. *Cancer Research*, 57(13), 2578–2580. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9205057/>
- Rivera, B., Castellsagué, E., & Bah, I. (2015). Biallelic NTHL1 mutations in a woman with multiple primary tumors: To the editor. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 373, Issue 20, pp. 1985–1986). Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1506878>

- Rivera, B., González, S., Sánchez-Tomé, E., Blanco, I., Mercadillo, F., Letón, R., Benítez, J., Robledo, M., Capellá, G., & Urioste, M. (2011). Clinical and genetic characterization of classical forms of familial adenomatous polyposis: a Spanish population study. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 22(4), 903–909. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDQ465>
- Rivera, B., Perea, J., Sánchez, E., Villapún, M., Sánchez-Tomé, E., Mercadillo, F., Robledo, M., Benítez, J., & Urioste, M. (2014). A novel AXIN2 germline variant associated with attenuated FAP without signs of oligodontia or ectodermal dysplasia. *European Journal of Human Genetics*, 22(3), 423–426. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.146>
- Rodriguez-Bigas, M. A., Boland, C. R., Hamilton, S. R., Henson, D. E., Jass, J. R., Khan, P. M., Lynch, H., Perucho, M., Smyrk, T., Sobin, L., & Srivastava, S. (1997). A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(23), 1758–1762. <https://doi.org/10.1093/JNCI/89.23.1758>
- Rofes, P., González, S., Navarro, M., Moreno-Cabrera, J. M., Solanes, A., Darder, E., Carrasco, E., Iglesias, S., Salinas, M., Gómez, C., Velasco, À., Tuset, N., Varela, M., Llort, G., Ramon y Cajal, T., Grau, È., Dueñas, N., de la Ossa Merlano, N., Matías-Guiu, X., ... Lázaro, C. (2021). Paired Somatic-Germline Testing of 15 Polyposis and Colorectal Cancer-Predisposing Genes Highlights the Role of APC Mosaicism in de Novo Familial Adenomatous Polyposis. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 23(11), 1452–1459. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2021.07.024>
- Rohlin, A., Eiengård, F., Lundstam, U., Zagoras, T., Nilsson, S., Edsjö, A., Pedersen, J., Svensson, J., Skullman, S., Karlsson, B. G., Björk, J., & Nordling, M. (2016). GREM1 and POLE variants in hereditary colorectal cancer syndromes. *Genes Chromosomes and Cancer*, 55(1), 95–106. <https://doi.org/10.1002/gcc.22314>
- Rohlin, A., Engwall, Y., Fritzell, K., Göransson, K., Bergsten, A., Einbeigi, Z., Nilbert, M., Karlsson, P., Björk, J., & Nordling, M. (2011). Inactivation of promoter 1B of APC causes partial gene silencing: evidence for a significant role of the promoter in regulation and causative of familial adenomatous polyposis. *Oncogene*, 30(50), 4977–4989. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.201>
- Rohlin, A., Rambech, E., Kvist, A., Törngren, T., Eiengård, F., Lundstam, U., Zagoras, T., Gebre-Medhin, S., Borg, Å., Björk, J., Nilbert, M., & Nordling, M. (2017a). Expanding the genotype-phenotype spectrum in hereditary colorectal cancer by gene panel testing. *Familial Cancer*, 16(2), 195–203. <https://doi.org/10.1007/s10689-016-9934-0>
- Rohlin, A., Wernersson, J., Engwall, Y., Wiklund, L., Björk, J., & Nordling, M. (2009). Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Human Mutation*, 30(6), 1012–1020. <https://doi.org/10.1002/HUMU.20980>
- Rustin, R. B., Jagelman, D. G., McGannon, E., Fazio, V. W., Lavery, I. C., & Weakley, F. L. (1990). Spontaneous mutation in familial adenomatous polyposis. *Diseases of the Colon and Rectum*, 33(1), 52–55. <https://doi.org/10.1007/bf02053203>

- Sampson, J. R., Dolwani, S., Jones, S., Eccles, D., Ellis, A., Evans, D. G., Frayling, I., Jordan, S., Maher, E. R., Mak, T., Maynard, J., Pigatto, F., Shaw, J., & Cheadle, J. P. (2003). Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet*, *362*(9377), 39–41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13805-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13805-6)
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2004). High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science*, *304*(5670), 554. <https://doi.org/10.1126/science.1096502>
- Schreibman, I. R., Baker, M., Amos, C., & McGarrity, T. J. (2005). The hamartomatous polyposis syndromes: A clinical and molecular review. In *American Journal of Gastroenterology* (Vol. 100, Issue 2, pp. 476–490). <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.40237.x>
- Schubert, S. A., Ruano, D., Tiersma, Y., Drost, M., de Wind, N., Nielsen, M., van Hest, L. P., Morreau, H., de Miranda, N. F. C. C., & van Wezel, T. (2020). Digenic inheritance of MSH6 and MUTYH variants in familial colorectal cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *59*(12), 697–701. <https://doi.org/10.1002/GCC.22883>
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). Mutationtaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. In *Nature Methods* (Vol. 11, Issue 4, pp. 361–362). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
- Seguí, N., Mina, L. B., Lázaro, C., Sanz-Pamplona, R., Pons, T., Navarro, M., Bellido, F., López-Doriga, A., Valdés-Mas, R., Pineda, M., Guinó, E., Vidal, A., Soto, J. L., Caldés, T., Durán, M., Urioste, M., Rueda, D., Brunet, J., Balbín, M., ... Valle, L. (2015). Germline Mutations in FAN1 Cause Hereditary Colorectal Cancer by Impairing DNA Repair. *Gastroenterology*, *149*(3), 563–566. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2015.05.056>
- Shibutani, S., Takeshita, M., & Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, *349*(6308), 431–434. <https://doi.org/10.1038/349431a0>
- Shirts, B. H., Salipante, S. J., Casadei, S., Ryan, S., Martin, J., Jacobson, A., Vlaskin, T., Koehler, K., Livingston, R. J., King, M. C., Walsh, T., & Pritchard, C. C. (2014). Deep sequencing with intronic capture enables identification of an APC exon 10 inversion in a patient with polyposis. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *16*(10), 783–786. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.30>
- Sieber, O. M., Segditsas, S., Knudsen, A. L., Zhang, J., Luz, J., Rowan, A. J., Spain, S. L., Thirlwell, C., Howarth, K. M., Jaeger, E. E. M., Robinson, J., Volikos, E., Silver, A., Kelly, G., Aretz, S., Frayling, I., Hutter, P., Dunlop, M., Guenther, T., ... Tomlinson, I. P. M. (2006). Disease severity and genetic pathways in attenuated familial adenomatous polyposis vary greatly but depend on the site of the germline mutation. *Gut*, *55*(10), 1440–1448. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.087106>
- Signori, E., Bagni, C., Papa, S., Primerano, B., Rinaldi, M., Amaldi, F., & Fazio, V. M. (2001). A somatic mutation in the 5'UTR of BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes down-modulation of translation efficiency. *Oncogene*, *20*(33), 4596–4600. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1204620>

- Slupska, M. M., Baikalov, C., Luther, W. M., Chiang, J. H., Wei, Y. F., & Miller, J. H. (1996). Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *Journal of Bacteriology*, *178*(13), 3885–3892. <https://doi.org/10.1128/jb.178.13.3885-3892.1996>
- Smith, C. G., Naven, M., Harris, R., Colley, J., West, H., Li, N., Liu, Y., Adams, R., Maughan, T. S., Nichols, L., Kaplan, R., Wagner, M. J., Mcleod, H. L., & Cheadle, J. P. (2013). Exome resequencing identifies potential tumor-suppressor genes that predispose to colorectal cancer. *Human Mutation*, *34*(7), 1026–1034. <https://doi.org/10.1002/HUMU.22333>
- Song, M., Garrett, W. S., & Chan, A. T. (2015). Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. *Gastroenterology*, *148*(6), 1244–1260.e16. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.12.035>
- Spier, I., Drichel, D., Kerick, M., Kirfel, J., Horpaopan, S., Laner, A., Holzapfel, S., Peters, S., Adam, R., Zhao, B., Becker, T., Lifton, R. P., Perner, S., Hoffmann, P., Kristiansen, G., Timmermann, B., Nöthen, M. M., Holinski-Feder, E., Schweiger, M. R., & Aretz, S. (2016). Low-level APC mutational mosaicism is the underlying cause in a substantial fraction of unexplained colorectal adenomatous polyposis cases. *Journal of Medical Genetics*, *53*(3), 172–179. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103468>
- Spier, I., Holzapfel, S., Altmüller, J., Zhao, B., Horpaopan, S., Vogt, S., Chen, S., Morak, M., Raeder, S., Kayser, K., Stienen, D., Adam, R., Nürnberg, P., Plotz, G., Holinski-Feder, E., Lifton, R. P., Thiele, H., Hoffmann, P., Steinke, V., & Aretz, S. (2015). Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas. *International Journal of Cancer*, *137*(2), 320–331. <https://doi.org/10.1002/ijc.29396>
- Spier, I., Horpaopan, S., Vogt, S., Uhlhaas, S., Morak, M., Stienen, D., Draaken, M., Ludwig, M., Holinski-Feder, E., Nöthen, M. M., Hoffmann, P., & Aretz, S. (2012). Deep intronic APC mutations explain a substantial proportion of patients with familial or early-onset adenomatous polyposis. *Human Mutation*, *33*(7), 1045–1050. <https://doi.org/10.1002/HUMU.22082>
- Stanich, P. P., Pearlman, R., Hinton, A., Gutierrez, S., LaDuca, H., Hampel, H., & Jasperson, K. (2019). Prevalence of Germline Mutations in Polyposis and Colorectal Cancer–Associated Genes in Patients With Multiple Colorectal Polyps. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *17*(10), 2008–2015.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.12.008>
- Stanich, P. P., Pilarski, R., Rock, J., Frankel, W. L., El-Dika, S., & Meyer, M. M. (2014). Colonic manifestations of PTEN hamartoma tumor syndrome: case series and systematic review. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(7), 1833–1838. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I7.1833>
- Stoffel, E. M., Mangu, P. B., & Limburg, P. J. (2015). Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology clinical practice guidelines. *Journal of Oncology Practice*, *11*(3), e437–e441. <https://doi.org/10.1200/JOP.2015.003665>

- Strum, W. B. (2016). Colorectal Adenomas. *The New England Journal of Medicine*, 374(11), 1065–1075. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1513581>
- Su, L.-K., Steinbach, G., Sawyer, J. C., Hindi, M., Ward, P. A., & Lynch, P. M. (2000). Genomic rearrangements of the APC tumor-suppressor gene in familial adenomatous polyposis. *Human Genetics*, 106(1), 101–107. <https://doi.org/10.1007/S004399900195>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Sweet, K., Willis, J., Zhou, X. P., Gallione, C., Sawada, T., Alhopuro, P., Khoo, S. K., Patocs, A., Martin, C., Bridgeman, S., Heinz, J., Pilarski, R., Lehtonen, R., Prior, T. W., Frebourg, T., Teh, B. T., Marchuk, D. A., Aaltonen, L. A., & Eng, C. (2005). Molecular classification of patients with unexplained hamartomatous and hyperplastic polyposis. *JAMA*, 294(19), 2465–2473. <https://doi.org/10.1001/JAMA.294.19.2465>
- Syngal, S., Brand, R. E., Church, J. M., Giardiello, F. M., Hampel, H. L., & Burt, R. W. (2015). ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *The American Journal of Gastroenterology*, 110(2), 223–262. <https://doi.org/10.1038/AJG.2014.435>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Takane, K., Matsusaka, K., Ota, S., Fukuyo, M., Yue, Y., Nishimura, M., Sakai, E., Matsushita, K., Miyauchi, H., Aburatani, H., Nakatani, Y., Takayama, T., Matsubara, H., Akagi, K., & Kaneda, A. (2016). Two subtypes of colorectal tumor with distinct molecular features in familial adenomatous polyposis. *Oncotarget*, 7(51), 84003–84016. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.11510>
- Takao, M., Yamaguchi, T., Eguchi, H., Yamada, T., Okazaki, Y., Tomita, N., Nomizu, T., Momma, T., Takayama, T., Tanakaya, K., Akagi, K., & Ishida, H. (2021). APC germline variant analysis in the adenomatous polyposis phenotype in Japanese patients. *International Journal of Clinical Oncology*, 26(9), 1661–1670. <https://doi.org/10.1007/S10147-021-01946-4>
- Takayama, T., Miyanishi, K., Hayashi, T., Sato, Y., & Niitsu, Y. (2006). Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. In *Journal of gastroenterology* (Vol. 41, Issue 3, pp. 185–192). <https://doi.org/10.1007/s00535-006-1801-6>
- Theodoratou, E., Montazeri, Z., Hawken, S., Allum, G. C. D. L., Gong, J., Tait, V., Kirac, I., Tazari, M., Farrington, S. M., Demarsh, A., Zgaga, L., Landry, D., Benson, H. E., Read, S. H., Rudan, I., Tenesa, A., Dunlop, M. G., Campbell, H., & Little, J. (2012). Systematic Meta-Analyses and Field Synopsis of Genetic Association Studies in Colorectal Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 104(19), 1433–1457. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJS369>

- Thiagalingam, S., Lengauer, C., Leach, F. S., Schutte, M., Hahn, S. A., Overhauser, J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nature Genetics*, *13*(3), 343–346. <https://doi.org/10.1038/ng0796-343>
- Thomas, L. E., Hurley, J. J., Meuser, E., Jose, S., Ashelford, K. E., Mort, M., Idziaszczyk, S., Maynard, J., Brito, H. L., Harry, M., Walters, A., Raja, M., Walton, S. J., Dolwani, S., Williams, G. T., Morgan, M., Moorghen, M., Clark, S. K., & Sampson, J. R. (2017). Burden and Profile of Somatic Mutation in Duodenal Adenomas from Patients with Familial Adenomatous- and MUTYH-associated Polyposis. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *23*(21), 6721–6732. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1269>
- Thomas, M., Sakoda, L. C., Hoffmeister, M., Rosenthal, E. A., Lee, J. K., van Duijnhoven, F. J. B., Platz, E. A., Wu, A. H., Dampier, C. H., de la Chapelle, A., Wolk, A., Joshi, A. D., Burnett-Hartman, A., Gsur, A., Lindblom, A., Castells, A., Win, A. K., Namjou, B., van Guelpen, B., ... Hsu, L. (2020). Genome-wide Modeling of Polygenic Risk Score in Colorectal Cancer Risk. *American Journal of Human Genetics*, *107*(3), 432–444. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2020.07.006>
- Thorpe, J., Osei-Owusu, I. A., Avigdor, B. E., Tupler, R., & Pevsner, J. (2020). Mosaicism in Human Health and Disease. *Annual Review of Genetics*, *54*, 487–510. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-041720-093403>
- Tok Çelebi, J., Chen, F. F., Zhang, H., Ping, X. L., Tsou, H. C., & Peacocke, M. (1999). Identification of PTEN mutations in five families with Bannayan-Zonana syndrome. *Experimental Dermatology*, *8*(2), 134–139. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0625.1999.TB00361.X>
- Tuohy, T. M., & Burt, R. W. (2008). Somatic mosaicism: a cause for unexplained cases of FAP? *Gut*, *57*(1), 10–12. <https://doi.org/10.1136/GUT.2007.133108>
- Tuohy, T. M. F., Done, M. W., Lewandowski, M. S., Shires, P. M., Saraiya, D. S., Huang, S. C., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Large intron 14 rearrangement in APC results in splice defect and attenuated FAP. *Human Genetics*, *127*(3), 359–369. <https://doi.org/10.1007/S00439-009-0776-9>
- Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Rüschoff, J., Fishel, R., Lindor, N. M., Burgart, L. J., Hamelin, R., Hamilton, S. R., Hiatt, R. A., Jass, J., Lindblom, A., Lynch, H. T., Peltomaki, P., Ramsey, S. D., Rodriguez-Bigas, M. A., Vasen, H. F. A., ... Srivastava, S. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*, *96*(4), 261–268. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh034>
- Valle, L. (2014). Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives. *Http://Www.Wjgnet.Com/*, *20*(29), 9828–9849. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I29.9828>
- Valle, L., de Voer, R. M., Goldberg, Y., Sjursen, W., Försti, A., Ruiz-Ponte, C., Caldés, T., Garré, P., Olsen, M. F., Nordling, M., Castellvi-Bel, S., Hemminki, K. (2019). Update on genetic

- predisposition to colorectal cancer and polyposis. *Molecular Aspects of Medicine*, 69, 10-26. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.03.001>.
- Valle, L., Vilar, E., Tavtigian, S. v., & Stoffel, E. M. (2019). Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *The Journal of Pathology*, 247(5), 574. <https://doi.org/10.1002/PATH.5229>
- van der Klift, H. M., Tops, C. M. J., Bik, E. C., Boogaard, M. W., Borgstein, A. M., Hansson, K. B. M., Ausems, M. G. E. M., Garcia, E. G., Green, A., Hes, F. J., Izatt, L., van Hest, L. P., Alonso, A. M., Vriends, A. H. J. T., Wagner, A., van Zelst-Stams, W. A. G., Vasen, H. F. A., Morreau, H., Devilee, P., & Wijnen, J. T. (2010). Quantification of sequence exchange events between PMS2 and PMS2CL provides a basis for improved mutation scanning of Lynch syndrome patients. *Human Mutation*, 31(5), 578–587. <https://doi.org/10.1002/HUMU.21229>
- van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias. *Experimental Cell Research*, 322(1), 12–20. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2014.01.008>
- van Loon, B., & Hübscher, U. (2009). An 8-oxo-guanine repair pathway coordinated by MUTYH glycosylase and DNA polymerase λ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43), 18201–18206. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907280106>
- Varesco, L., Gismondi, V., Presciuttini, S., Groden, J., Spirio, L., Sala, P., Rossetti, C., de Benedetti, L., Bafico, A., & Heouaine, A. (1994). Mutation in a splice-donor site of the APC gene in a family with polyposis and late age of colonic cancer death. *Human Genetics*, 93(3), 281–286. <https://doi.org/10.1007/bf00212023>
- Vargas-Parra, G. M., González-Acosta, M., Thompson, B. A., Gómez, C., Fernández, A., Dámaso, E., Pons, T., Morak, M., del Valle, J., Iglesias, S., Velasco, À., Solanes, A., Sanjuan, X., Padilla, N., de la Cruz, X., Valencia, A., Holinski-Feder, E., Brunet, J., Feliubadaló, L., ... Capellá, G. (2017). Elucidating the molecular basis of MSH2-deficient tumors by combined germline and somatic analysis. *International Journal of Cancer*, 141(7), 1365–1380. <https://doi.org/10.1002/ijc.30820>
- Vasen, H. F. A., Mecklin, J. P., Meera Khan, P., & Lynch, H. T. (1991). The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Diseases of the Colon and Rectum*, 34(5), 424–425. <https://doi.org/10.1007/BF02053699>
- Vasen, H. F. A., Möslein, G., Alonso, A., Aretz, S., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., Bülow, S., Burn, J., Capella, G., Colas, C., Engel, C., Frayling, I., Friedl, W., Hes, F. J., Hodgson, S., Järvinen, H., Mecklin, J. P., Møller, P., ... Wijnen, J. (2008). Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut*, 57(5), 704–713. <https://doi.org/10.1136/GUT.2007.136127>
- Vasen, H. F. A., Möslein, G., Alonso, A., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., Burn, J., Capella, G., Engel, C., Frayling, I., Friedl, W., Hes, F. J., Hodgson, S., Mecklin, J. P., Møller, P., Nagengast, F., Parc, Y., Renkonen-Sinisalo, L., Sampson, J. R., ... Wijnen, J. (2007). Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis

- cancer). *Journal of Medical Genetics*, 44(6), 353–362. <https://doi.org/10.1136/JMG.2007.048991>
- Vasen, H. F. A., Watson, P., Mecklin, J. P., & Lynch, H. T. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*, 116(6), 1453–1456. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70510-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70510-X)
- Vaughn, C. P., Robles, J., Swensen, J. J., Miller, C. E., Lyon, E., Mao, R., Bayrak-Toydemir, P., & Samowitz, W. S. (2010). Clinical analysis of PMS2: mutation detection and avoidance of pseudogenes. *Human Mutation*, 31(5), 588–593. <https://doi.org/10.1002/HUMU.21230>
- Venesio, T., Molatore, S., Cattaneo, F., Arrigoni, A., Risio, M., & Ranzani, G. N. (2004). High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 126(7), 1681–1685. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.022>
- von Karsa, L., Patnick, J., Segnan, N., Atkin, W., Halloran, S., Lansdorp-Vogelaar, I., Malila, N., Minozzi, S., Moss, S., Quirke, P., Steele, R. J., Vieth, M., Aabakken, L., Altenhofen, L., Ancelle-Park, R., Antoljak, N., Anttila, A., Armaroli, P., Arrossi, S., ... Valori, R. (2013). European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: Overview and introduction to the full Supplement publication. In *Endoscopy* (Vol. 45, Issue 1, pp. 51–59). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1325997>
- Wagner, J. R., Ge, B., Pokholok, D., Gunderson, K. L., Pastinen, T., & Blanchette, M. (2010). Computational analysis of whole-genome differential allelic expression data in human. *PLoS Computational Biology*, 6(7), 24. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1000849>
- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 51(6), 2647–2693. <https://doi.org/10.1159/000495956>
- Wang, T. F., Kleckner, N., & Hunter, N. (1999). Functional specificity of MutL homologs in yeast: Evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13914–13919. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13914>
- Watson, P., Vasen, H. F. A., Mecklin, J.-P., Bernstein, I., Aarnio, M., Järvinen, H. J., Myrthøj, T., Sunde, L., Wijnen, J. T., & Lynch, H. T. (2008). The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *International Journal of Cancer*, 123(2), 444–449. <https://doi.org/10.1002/ijc.23508>
- Wei, K., Kucherlapati, R., & Edlmann, W. (2002). Mouse models for human DNA mismatch-repair gene defects. *Trends in Molecular Medicine*, 8(7), 346–353. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02359-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02359-6)
- Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., Kang, G. H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., Koh, H., Simms, L., Barker, M., Leggett, B., Levine, J., Kim, M., French, A. J., Thibodeau, S. N., Jass, J., ... Laird, P. W.

- (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genetics*, 38(7), 787–793. <https://doi.org/10.1038/NG1834>
- Weren, R. D. A., Ligtenberg, M. J. L., Geurts van Kessel, A., de Voer, R. M., Hoogerbrugge, N., & Kuiper, R. P. (2018). NTHL1 and MUTYH polyposis syndromes: two sides of the same coin? In *Journal of Pathology* (Vol. 244, Issue 2, pp. 135–142). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/path.5002>
- Weren, R. D. A., Ligtenberg, M. J. L., Kets, C. M., de Voer, R. M., Verwiel, E. T. P., Spruijt, L., van Zelst-Stams, W. A. G., Jongmans, M. C., Gilissen, C., Hehir-Kwa, J. Y., Hoischen, A., Shendure, J., Boyle, E. A., Kamping, E. J., Nagtegaal, I. D., Tops, B. B. J., Nagengast, F. M., Geurts Van Kessel, A., van Krieken, J. H. J. M., ... Hoogerbrugge, N. (2015). A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene NTHL1 causes adenomatous polyposis and colorectal cancer. *Nature Genetics*, 47(6), 668–671. <https://doi.org/10.1038/NG.3287>
- Whitelaw, S. C., Murday, V. A., Tomlinson, I. P., Thomas, H. J., Cottrell, S., Ginsberg, A., Bukofzer, S., Hodgson, S. v, Skudowitz, R. B., Jass, J. R., Talbot, I. C., Northover, J. M., Bodmer, W. F., & Solomon, E. (1997). Clinical and molecular features of the hereditary mixed polyposis syndrome. *Gastroenterology*, 112(2), 327–334. <https://doi.org/10.1053/gast.1997.v112.pm9024286>
- Wimmer, Katharina, Kratz, C. P., Vasen, H. F. A., Caron, O., Colas, C., Entz-Werle, N., Gerdes, A. M., Goldberg, Y., Ilencikova, D., Muleris, M., Duval, A., Lavoine, N., Ruiz-Ponte, C., Slavic, I., Burkhardt, B., & Brugieres, L. (2014). Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Suggestions of the European consortium “Care for CMMRD” (C4CMMRD). *Journal of Medical Genetics*, 51(6), 355–365. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102284>
- Wimmer, K., Beilken, A., Nustede, R., Ripperger, T., Lamottke, B., Ure, B., Steinmann, D., Reineke-Plaass, T., Lehmann, U., Zschocke, J., Valle, L., Fauth, C., & Kratz, C. P. (2017). A novel germline POLE mutation causes an early onset cancer prone syndrome mimicking constitutional mismatch repair deficiency. *Familial Cancer*, 16(1), 67–71. <https://doi.org/10.1007/s10689-016-9925-1>
- Wynter, C. V. A., Walsh, M. D., Higuchi, T., Leggett, B. A., Young, J., & Jass, J. R. (2004). Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. *Gut*, 53(4), 573–580. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.030841>
- Yamaguchi, K., Komura, M., Yamaguchi, R., Imoto, S., Shimizu, E., Kasuya, S., Shibuya, T., Hatakeyama, S., Takahashi, N., Ikenoue, T., Hata, K., Tsurita, G., Shinozaki, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Miyano, S., & Furukawa, Y. (2015). Detection of APC mosaicism by next-generation sequencing in an FAP patient. *Journal of Human Genetics*, 60(5), 227–231. <https://doi.org/10.1038/JHG.2015.14>
- Yang, C. L., Chang, L. S., Zhang, P., Hao, H., Zhu, L., Toomey, N. L., & Lee, M. Y. (1992). Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of human DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Research*, 20(4), 735–745. <https://doi.org/10.1093/nar/20.4.735>

- Yao, R., Zhang, C., Yu, T., Li, N., Hu, X., Wang, X., Wang, J., & Shen, Y. (2017). Evaluation of three read-depth based CNV detection tools using whole-exome sequencing data. *Molecular Cytogenetics*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/S13039-017-0333-5>
- Young, J., & Jass, J. R. (2006). The case for a genetic predisposition to serrated neoplasia in the colorectum: hypothesis and review of the literature. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *15*(10), 1778–1784. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0164>
- Zhou, X. P., Marsh, D. J., Hampel, H., Mulliken, J. B., Gimm, O., & Eng, C. (2000). Germline and germline mosaic PTEN mutations associated with a Proteus-like syndrome of hemihypertrophy, lower limb asymmetry, arteriovenous malformations and lipomatosis. *Human Molecular Genetics*, *9*(5), 765–768. <https://doi.org/10.1093/HMG/9.5.765>

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Lorca V, Rueda D, Martín-Morales L, Poves C, Fernández-Aceñero MJ, Ruiz-Ponte C, Llovet P, Marrupe D, García-Barberán V, García-Paredes B, Pérez-Segura P, de la Hoya M, Díaz-Rubio E, Caldés T, Garre P. Role of GALNT12 in the genetic predisposition to attenuated adenomatous polyposis syndrome. *PLoSOne*. 2017 Nov 2;12(11):e0187312. doi: 10.1371/journal.pone.0187312.

Lorca V, Rueda D, Lorena Martín-Morales L, Fernández-Aceñero MJ, Grolleman J, Poves C, Llovet P, Tapial S, García-Barberán V, Sanz J, Pérez-Segura P, de Voer RM, Díaz-Rubio E, de la Hoya M, Caldés T, Garre P. Contribution of new adenomatous polyposis predisposition genes in an unexplained attenuated spanish cohort by multigene panel testing. *SciRep*. 2019 July 08. doi: 10.1038/s41598-019-46403-5.

Lorca V, Garre P. Current status of the genetic susceptibility in attenuated adenomatous polyposis. *World J Gastrointest Oncol*. 2019 Dec 15;11(12):1101-1114. doi: 10.4251/wjgo.v11.i12.1101.

OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS

Martin-Morales L, Rofes P, Diaz-Rubio E, Llovet P, **Lorca V**, Bando I, Perez-Segura P, de la Hoya M, Garre P, García-Barberán V, Caldés T. Novel genetic mutations detected by multigene panel are associated with hereditary colorectal cancer predisposition. *PLoSOne*. 2018 Sep 26;13(9):e0203885. doi: 10.1371/journal.pone.0203885.

Díaz Del Arco C, Garré P, Molina Roldán E, **Lorca V**, Cerón Nieto MÁ, Fernández Aceñero MJ. MUC1 expression in colorectal carcinoma: Clinicopathological correlation and prognostic significance. *Rev Esp Patol*. 2018 Oct - Dec;51(4):204-209. doi: 10.1016/j.patol.2018.03.002.

Patel VL, Busch EL, Friebel TM, Cronin A, Leslie G, McGuffog L, Adlard J, Agata S, **Lorca V**, et al. Association of Genomic Domains in BRCA1 and BRCA2 with Prostate Cancer Risk and Aggressiveness. *Cancer Res*. 2019 Nov 13. pii: canres.1840.2019. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1840.

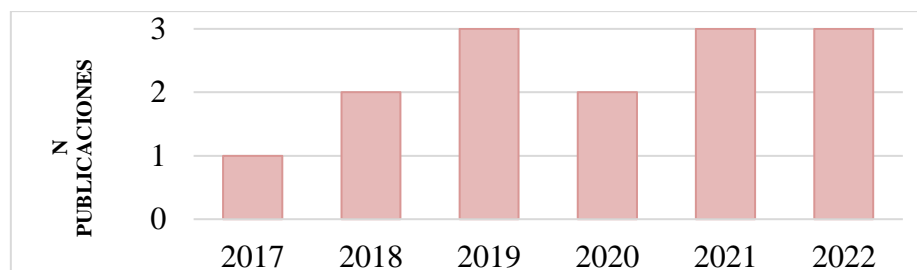
Martín-Morales L, Garre P, **Lorca V**, Cazorla M, Llovet P, Bando I, García-Barberan V, González-Morales ML, Esteban-Jurado C, de la Hoya M, Castellví-Bel S, Caldés T. BRIP1, a Gene Potentially Implicated in Familial Colorectal Cancer Type X. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2021 Feb;14(2):185-194. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-20-0316.

Bueno-Martínez E, Sanoguera-Miralles L, Valenzuela-Palomo A, **Lorca V**, Gómez-Sanz A, Carvalho S, Allen J, Infante M, Pérez-Segura P, Lázaro C, Easton DF, Devilee P, Vreeswijk MPG, de la Hoya M, Velasco EA. RAD51D Aberrant Splicing in Breast Cancer: Identification of Splicing Regulatory Elements and Minigene-Based Evaluation of 53 DNA Variants. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 7;13(11):2845. doi: 10.3390/cancers13112845.

Valenzuela-Palomo A, Bueno-Martínez E, Sanoguera-Miralles L, **Lorca V**, Fraile-Bethencourt E, Esteban-Sánchez A, Gómez-Barrero S, Carvalho S, Allen J, García-Álvarez A, Pérez-Segura P, Dorling L, Easton DF, Devilee P, Vreeswijk MP, de la Hoya M, Velasco EA. Splicing predictions, minigene analyses, and ACMG-AMP clinical classification of 42 germline PALB2 splice-site variants. *J Pathol*. 2022 Mar;256(3):321-334. doi: 10.1002/path.5839.

Bueno-Martínez E, Sanoguera-Miralles L, Valenzuela-Palomo A, Esteban-Sánchez A, **Lorca V**, Llinares-Burguet I, Allen J, García-Álvarez A, Pérez-Segura P, Durán M, Easton DF, Devilee P, Vreeswijk MP, de la Hoya M, Velasco-Sampedro EA. Minigene-based splicing analysis and ACMG/AMP-based tentative classification of 56 ATM variants. *J Pathol*. 2022 Sep;258(1):83-101. doi: 10.1002/path.5979.

Martin-Morales L, Manzano S, Rodrigo-Faus M, Vicente-Barrueco A, **Lorca V**, Núñez-Moreno G, Bragado P, Porras A, Caldes T, Garre P, Gutierrez-Uzquiza A. Germline gain-of-function MMP11 variant results in an aggressive form of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2022 Sep 12. doi: 10.1002/ijc.34289.



ANEXOS

Anexo 1. Criterios clínicos de selección de familias HNPCC.

Criterios de Amsterdam (1991)
1. Tres o más familiares afectados de CCR, uno de los cuales debe ser familiar en primer grado de los otros dos; debe excluirse la FAP.
2. Afectación de, al menos, 2 generaciones.
3. Uno o más de los casos de CCR debe ser diagnosticado antes de los 50 años.
Criterios de Amsterdam II (1999)
1. Tres o más familiares con tumores asociados a HNPCC (CCR, endometrio, intestino delgado, uréter, o pelvis renal), uno de los cuales debe ser familiar de primer grado de los otros dos; debe excluirse FAP.
2. Afectación por CCR de, al menos, dos generaciones.
3. Uno o más casos de cáncer diagnosticados antes de los 50 años.
Criterios de Bethesda (1997) y modificados (2004)
1. Individuos con cáncer en familias que cumplen los criterios de Amsterdam
2. Individuos con 2 tumores relacionados con HNPCC, incluyendo CCR sincrónico o metacrónico o tumores extracolónicos asociados (endometrio, ovario, estómago, hepatobiliar, intestino delgado, carcinoma de células transicionales de pelvis renal o uréter) independientemente de la edad de diagnóstico.
3. Individuos con CCR y un familiar en primer grado con CCR y/o tumor extracolónico relacionado con HNPCC y/o adenoma colorrectal; uno de ellos diagnosticado antes de los 45 años*, y el adenoma diagnosticado antes de los 40 años.
4. Individuos con CCR con histología MSI-H** o endometrial diagnosticado antes de los 45 años*.
5. Individuos con adenomas diagnosticados antes de los 40 años.

* Se conocen como Criterios de Bethesda modificados cuando la edad se cambia de 45 a 50 años.

** De histología poco diferenciada, con un exceso de moco, células en anillo de sello, infiltración linfocitaria y patrón de crecimiento medular.

Anexo 2. Lista de genes de predisposición a la poliposis/CCR incluidos en el panel personalizado de NGS.

GEN DIANA	AMPLICONES	COBERTURA (%)	REGIONES CON COBERTURA >90%	REGIONES CON COBERTURA <90%
<i>APC</i>	18	99,8	17	1
<i>AXIN2</i>	11	99,7	11	0
<i>POLE</i>	49	99,68	49	0
<i>POLD1</i>	27	100	27	0
<i>MUTYH</i>	17	100	17	0
<i>NTHL1</i>	6	100	6	0
<i>MSH3</i>	24	100	24	0
<i>MLH3</i>	13	99,06	13	0
<i>GREM1</i>	2	100	2	0
<i>SCG5</i>	6	99,87	6	0
<i>BMP4</i>	5	100	5	0
<i>BMPRI1</i>	13	98,82	12	0
<i>SMAD4</i>	13	100	13	0
<i>ENG</i>	15	100	15	0
<i>STK11</i>	9	100	9	0
<i>PTEN</i>	9	100	9	0
<i>MLH1</i>	19	100	19	0
<i>MSH2</i>	17	100	17	1
<i>MSH6</i>	11	99,98	11	0
<i>PMS2</i>	15	99,22	15	0
<i>MSH4</i>	20	100	20	0
<i>GALNT12</i>	10	100	10	0

Anexo 3. Bases de datos y programas de predicción utilizados para la anotación de variantes.

TIPO DE BASE DE DATOS	BASE DE DATOS	URL
Poblacional	1000genomes	https://www.genome.gov/27528684/1000-genomes-project
	Exome Variant Server	http://evs.gs.washington.edu/EVS/
	ExAC	http://exac.broadinstitute.org/
	gnomAD	http://gnomad.broadinstitute.org
Mutacional	ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
	LOVD	http://www.lovd.nl/3.0/home
	InSIGHT	https://www.insight-group.org/
	COSMIC	http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
Dominio funcional	STRING	https://string-db.org/
TIPO DE PREDICTORES	PREDICTOR	URL
<i>Missense</i>	PolyPhen	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
	SIFT	https://sift.bii.a-star.edu.sg/
	Mutation Taster	http://www.mutationtaster.org/
<i>Splicing</i>	Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF/
	MaxEntScan	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html

Anexo 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación en los distintos experimentos.

GEN	EXÓN/ INTRÓN	Tª HIB (°C)	CICLOS	OLIGONUCLEÓTIDO DIRECTO (5' -> 3')	OLIGONUCLEÓTIDO REVERSO (5' -> 3')	ESTUDIO
<i>APC</i>	E3	58	30	AAGGTGCGTGCTTTGAGAGT	AAGCTGTACTTGGATCTACACACC	VALIDACIÓN
<i>APC</i>	E4	58	30	TTACCCTGACCCAAGTGGAC	CTGGAGTACACAAGGCAATGTT	VALIDACIÓN
<i>APC</i>	E10	55	30	GCAGCACTCCACAACATCAT	CACATTTGCTTTGAAACATGC	VALIDACIÓN
<i>APC</i>	E12	58	30	TGGTACCAGTTTGTTTTATTTTAGATG	TGAAAGTAAATTAACATACCTGAGC	VALIDACIÓN
<i>APC</i>	E16 (c.1966)	56	30	TGTTACTGCATACACATTGTGACC	CCATGTCCATAATGCTTCC	VALIDACIÓN
<i>APC</i>	E16 (c.3199)	56	30	GGAAGGCAAAGTCCTTCA	CCCCTGACCTGTATGGAGAA	VALIDACIÓN
<i>APC</i>	E16 (c.3949)	58	30	GGATGTAATCAGACGACACAGG	ACATGAGTGGGGTCTCCTGA	VALIDACIÓN
<i>APC</i>	E16 (c.4414)	56	30	TAAGCCCCAGTGATCTTCCA	TTTCCTGAACTGGAGGCATT	VALIDACIÓN
<i>APC</i>	E16 (c.7399)	60	30	GAGTCTGCCTCCAAAGGACT	GGGACCTAGTGGGAGAAGC	VALIDACIÓN
<i>APC</i>	E16 (c.8501)	55	30	AGAATCCAGTGAACCCAAA	TGGCTTCCAGAACAAAAACC	VALIDACIÓN
<i>AXIN2</i>	E2	58	30	AGCAGCAGCTTCCGTGAG	CTTGATCGCCCAATAAGGAG	VALIDACIÓN
<i>AXIN2</i>	E3	58	30	GACTGAACCACTTTGTACTTTGC	TAAGTGCTCAGGTGGCATCC	VALIDACIÓN
<i>AXIN2</i>	E8	58	30	CCCAGTTTCTTTCCTTCTGTTTT	GCCTCAACCTAGGACCCTTC	VALIDACIÓN
<i>AXIN2</i>	E10	56	30	TGCTAAACTTGTTCCATTCCA	TGAGCAAACAAACTGAGAGCA	VALIDACIÓN
<i>BMP4</i>	E3	58/56	5/25	TAACCTTCCACTCCCCTCC	GAACTCTTCTCCCCAGGGC	VALIDACIÓN
<i>BMP4</i>	E4	58	30	CTGGTCCACCACAATGTGAC	CGCTGTGAGTGATGCTTAGG	VALIDACIÓN
<i>BMPRI1A</i>	E10	56	30	TGAGCATTACTTCTCCCTAGCC	AAAACAGTGGGGCAAAGAAC	VALIDACIÓN
<i>BMPRI1A</i>	E11	56	30	TTTTAAACTCATCAACTGGACAGG	ATGCAGCAACTCCCATTTTT	VALIDACIÓN
<i>ENG</i>	E12	58	30	CCGAGTTCCTGCTCCAGTTA	CCCCTCACCTGGTCTTGAG	VALIDACIÓN
<i>ENG</i>	E4	58	30	ATGGGATAGAGAGGGGCACAG	GGAGCTCAGATTCTCCTGA	VALIDACIÓN
<i>GALNT12</i>	E3	58	30	GTGACCCCTGTTGCTTTGTT	CCAGGAAGGTCAGAACATCG	VALIDACIÓN
<i>GALNT12</i>	E4	58	30	GCATAGGAGAGACGGATGGA	GGAGCTCAGATTCTCCTGA	VALIDACIÓN
<i>MLH1</i>	E12	55	30	AATTATACCTCATACTAGC	GTTTTATTACAGAATAAAGGAGG	VALIDACIÓN
<i>MLH3</i>	5'UTR	55	30	CCATGCCAAAAGGGAATAAG	CAAATTCTCCGACACCAACC	VALIDACIÓN
<i>MLH3</i>	E2	56	30	AAGCCCTGAAAGCTTGTGAA	CGGGAACATACGTCTTTGGT	VALIDACIÓN

GEN	EXÓN/ INTRÓN	Tª HIB (°C)	CICLOS	OLIGONUCLEÓTIDO DIRECTO (5' -> 3')	OLIGONUCLEÓTIDO REVERSO (5' -> 3')	ESTUDIO
<i>MLH3</i>	E2A	58	30	GAGGAACCTGGCCCTCAACAG	GTCCTGTACCGAGTGGCATT	VALIDACIÓN
<i>MLH3</i>	E2B	56	30	GCCCTTTTCAGACACCATGT	TGTTGTTGCAAAGGCAGAG	VALIDACIÓN
<i>MSH2</i>	E1	55	30	TCGCGCATTCTTCTCAACC	GTCCCTCCCCAGCACGC	VALIDACIÓN
<i>MSH2</i>	E12	56	30	ATCAGTATTCCTGTGTAC	CGTTACCCCCACAAAGC	VALIDACIÓN
<i>MSH2</i>	E2	55	30	GAAGTCCAGCTAATACAGTGC	CTTCACATTTTTATTTTTCTACTC	VALIDACIÓN
<i>MSH3</i>	E3	56	30	TGAGGACCAGGAATGTTTCA	GAAACTGCATTCTTTGCGTGT	VALIDACIÓN
<i>MSH4</i>	E15	56	30	TTAGCAATCAAACAGGGATGG	CCAATCTGGGCCATAATCTG	VALIDACIÓN
<i>MSH4</i>	E2	58	30	GCGACAAGAGCAAGACTCTG	CAGAAGATGAGCTTGACCA	VALIDACIÓN
<i>MSH4</i>	E7	58	30	TGACATTTCTGTGTTTGAAGG	TGATTTACCTGATTGAAGTCCAAA	VALIDACIÓN
<i>MSH6</i>	E8	56	30	CCTTTTTGTGTTTAATTCCT	CAAGAGAAGTGCCCTCTCAA	VALIDACIÓN
<i>MUTYH</i>	i11 (E9-E13)	65/60	10/25	CAGCCCAGGCTAACTCTTTG	CTTGCGCTGAAGCTGCTCT	VALIDACIÓN
<i>MUTYH</i>	E13	65/60	10/25	GGCAGTGGCATGAGTAACAAG	CTTGCGCTGAAGCTGCTCT	VALIDACIÓN
<i>MUTYH</i>	E15	58	30	GGACATGAAGTTAAGGGCAGA	AGTGAAGCCTGGAGTGGAGA	VALIDACIÓN
<i>MUTYH</i>	E6	58	30	TTGGGGTGGGTGTAGAGAAG	TCACCCGTCAGTCCCTCTAT	VALIDACIÓN
<i>MUTYH</i>	E8	58	30	GGGTAGGAACCCAGGAGTCT	AGAGGGGCCAAAGAGTTAGC	VALIDACIÓN
<i>MUTYH</i>	E9	56	30	CAGCCCAGGCTAACTCTTTG	AGAGCTCCTTTGCAGACACC	VALIDACIÓN
<i>NTHL1</i>	E2	60/58	10/25	ACCCCTACCTACCTTCACC	GGACCTTGCTAAGATGGGGG	VALIDACIÓN
<i>NTHL1</i>	E3	60/58	10/25	GGTCCCTGTCACTGCACAA	TTGACCCTCACTTCCTGCAC	VALIDACIÓN
<i>NTHL1</i>	E4	60/58	10/25	TGAACCCACCCCTGTCTTTC	GAATCCCAAGAGCAGCCAGT	VALIDACIÓN
<i>NTHL1</i>	E6	55	30	GAGTGGCTGCCTAGGTATGA	TCCTGAAGCGTAAAGCCACTT	VALIDACIÓN
<i>PMS2</i>	LR1	65	35	ACGTCGAAAGCAGCCAATGGGAGTT	CTTCCACCTGTGCATACCACAGGCT	VALIDACIÓN
<i>PMS2</i>	LR3	65	35	GCGTTGATATCAATGTTACTCCAGA	CCTCCATCTCCAAAACCAGCAAGA	VALIDACIÓN
<i>PMS2</i>	E4	PCR anidada	30	CTGGGCTAGTAAATAGCCAGAAAG	TATGACTTAGATTGGCAGCGAGACA	VALIDACIÓN
<i>PMS2</i>	E12	PCR anidada	30	TTACAGTGTCTATAACATAATCAG	AGTAGATAACAAGGTCTTGCTGTGTT	VALIDACIÓN
<i>POLD1</i>	5'UTR	55	30	GGCGGAGTTAAGGGGAATTTT	CCTCTACTCACCCGCTTCAA	VALIDACIÓN
<i>POLD1</i>	E10	58	30	AACATTCTGGAAGTAGGGGAATC	CTGAGAGAAGCCTCCCACCT	VALIDACIÓN
<i>POLD1</i>	E12	60	30	GTGTGTCCTGTCTTGAA	GTTGGGGTGAGAGGTGAGG	VALIDACIÓN
<i>POLD1</i>	E17, i16	58	30	AGTGTGCTTTCCCGTGTT	GAGTGCCACCTGTGAGAT	VALIDACIÓN

GEN	EXÓN/ INTRÓN	Tª HIB (°C)	CICLOS	OLIGONUCLEÓTIDO DIRECTO (5' -> 3')	OLIGONUCLEÓTIDO REVERSO (5' -> 3')	ESTUDIO
<i>POLD1</i>	E4	58	30	CCGCTGTCTTACCCTGTGAC	AGGGATGATCAGAGGTGCAG	VALIDACIÓN
<i>POLD1</i>	E5	56	30	TCTGATCATCCCTCCACAC	AAGCTGGGACCAGCCAAT	VALIDACIÓN
<i>POLE</i>	5'UTR	55	30	CTCTTGATGGACGGCGGC	GACATGGAGCCGTTGGCTA	VALIDACIÓN
<i>POLE</i>	E31	58	30	GCATTCCCATCTCACCCTT	CTCCCCTGGATCAAGGTCT	VALIDACIÓN
<i>POLE</i>	E48	56	30	AGCCTGTGAAGAAGCAGCAG	CACTCAGAGAGGAGGCCAAG	VALIDACIÓN
<i>POLE</i>	E2	56	30	AAAAAGAAGCAGCAGCAGGT	CATATTCTGGGTGGGAGAA	VALIDACIÓN
<i>POLE</i>	E8	56	30	GTCGCTGCTCACATGAATTT	GGATGAAGTAACACAAGCAAA	VALIDACIÓN
<i>PTEN</i>	E8	56	30	TGATAGTTTATTTTGTGACTTTTGC	CAACCCCAACAAAATGTTTAAAT	VALIDACIÓN
<i>NTHL1</i>	E1	60	30	GGAGCTTGTCTGGGAGTTGTA	CAGCCTGCAGCCCCTATC	VALIDACIÓN
<i>NTHL1</i>	E5	60	30	GGCTAGGCTGGTGGAGTGT	GGGGTGAGCTCTTCTCCCTA	VALIDACIÓN
<i>MSH4</i>	E5	56	30	AGAAAGCAGTTTGGGCAAG	TGATATTGGTAGCTGTGGGCTA	VALIDACIÓN
<i>APC</i>	E13	55	30	CAAGTTGTCTTTTAAATGATCCTCT	CCCTGCCTCAAAGAAAAAGA	HRM
<i>MUTYH</i>	E15	58	30	GGACATGAAGTTAAGGGCAGA	AGTGAAGCCTGGAGTGGAGA	HRM
<i>MSH2</i>	E4	55	30	TTCATTTTGTCTTTCTTATTCC	ATATGACAGAAATATCCTTC	HRM
<i>POLD1</i>	E15-E20	58	30	TGTGTTACACCACGCTCCTT	AGTGAGGCAGTGACCAGGTT	SPLICING
<i>AXIN2</i>	E7-E11	58	30	CATAGTGCCCAAAGCACAAA	CATCCTCCAGATCTCCTCA	SPLICING
<i>MUTYH</i>	E11-E16	65/60	30	GTCCTGACGTGGAGGAGTGT	AATGGGGGCTTCAGAGGTG	SPLICING
<i>MLH1</i>	E10-E16	60	30	TGTATGCAGCCTATTTGCCCA	CCTCTGTCCAGCCACTCTCTG	SPLICING
<i>NTHL1</i> WT	E2	58	30	TGCCAGTCTGGGAGCCCC	TGGTACCTGCGTACCTTTGG	EXPRESIÓN
<i>NTHL1</i> MUT	E2	58	30	TGCCAGTCTGGGAGCCCT	TGGTACCTGCGTACCTTTGG	EXPRESIÓN
<i>POLE</i> WT	E2	56	30	CGGATAAGATGGATTTGCGGT	AATCTCGGTAGGATGCATGTT	EXPRESIÓN
<i>POLE</i> MUT	E2	56	30	CGGATAAGATGGATTTGCGGT_	AATCTCGGTAGGATGCATGTT	EXPRESIÓN
<i>PSMB4</i>	E4-E5	58	30	GCATACTGGCTCAGCCTCT	CGCATGCAGCGTTCTACTAA	EXPRESIÓN
<i>PALB2</i>	E2-E3	58	30	AAATTAGCATTCTTGAAGGGAAT	GTGTTTTAGCTGCGGTGAGA	EXPRESIÓN
<i>MUTYH</i> EX9 ASA WT	E9-E13	65/60	35	GTGCTGTGCCGTGTCC	CTTGCGCTGAAGCTGCTCT	AMPLIFICACIÓN ALELO-ESPECÍFICA
<i>MUTYH</i> EX9 ASA MUT	E9-E13	65/60	35	GTGCTGTGCCGTGTCTG	CTTGCGCTGAAGCTGCTCT	AMPLIFICACIÓN ALELO-ESPECÍFICA
<i>MUTYH</i> ASA EX13 WT	E13-E15	65/60	35	CTGCCCTCCCTCTCAGG	AGTGAAGCCTGGAGTGGAGA	AMPLIFICACIÓN ALELO-ESPECÍFICA
<i>MUTYH</i> EX13 ASA MUT	E13-E15	65/60	35	CTGCCCTCCCTCTCAGA	AGTGAAGCCTGGAGTGGAGA	AMPLIFICACIÓN ALELO-ESPECÍFICA

Anexo 5. Criterios propuestos por la ACMG-AMP para la clasificación de variantes en el sistema de 5 niveles. Se organizan según el tipo de evidencia (patogénica o benigna) y el grado. Cada criterio patogénico se pondera como muy fuerte (PVS1), fuerte (PS1–4); moderado (PM1–6) o de apoyo (PP1–5), y cada criterio benigno se pondera como independiente (BA1), fuerte (BS1–4) o de apoyo (BP1–6).

TIPO DE EVIDENCIA	EVIDENCIA	DESCRIPCIÓN
PATOGENICA	PVS1	Variante nonsense, frameshift, localizada en sitio canónico de splicing (± 1 o 2), codón de iniciación, eliminación de uno o varios exones en un gen en el que la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad
	PS1	Mismo cambio de aminoácido que una variante patogénica previamente establecida, independientemente del cambio de nucleótido
	PS2	De novo (tanto maternidad como paternidad confirmada) en un paciente con la enfermedad y sin antecedentes familiares en un gen asociado con el fenotipo
	PS3	Estudios funcionales in vitro o in vivo bien establecidos que respaldan un efecto dañino en el gen o en el producto del gen
	PS4	La prevalencia de la variante en los individuos afectos aumenta significativamente en comparación con la prevalencia en los controles
	PM1	Ubicada en un punto crítico mutacional (hot spot) y/o en un dominio funcional crítico y bien establecido (por ejemplo, sitio activo de una enzima) sin variantes benignas
	PM2	Ausencia de la variante en poblaciones control (o con una frecuencia extremadamente baja si es recesivo) en Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project o Exome Aggregation Consortium
	PM3	Para trastornos recesivos, detectada en trans con una variante patogénica
	PM4	Deleciones/inserciones inframe en el marco de una región sin repetición o variantes stop-loss
	PM5	Nuevo cambio missense en un residuo de aminoácido donde se ha visto antes un cambio missense diferente determinado como patogénico
	PM6	Variante asumida de novo, pero sin confirmación de paternidad y maternidad
	PP1	Co-segregación con la enfermedad en múltiples miembros de la familia afectos en un gen del que se sabe definitivamente que está asociado a la enfermedad
	PP2	Variante missense en un gen que tiene una tasa baja de variantes missense benignas y en el que las variantes missense son un mecanismo común de enfermedad
	PP3	Múltiples líneas de evidencia computacional respaldan un efecto nocivo sobre el gen o el producto del gen (conservación del nucleótido, efecto en el splicing, etc.)
	PP4	El fenotipo o los antecedentes familiares del paciente son muy específicos de una enfermedad con una única etiología genética
PP5	Una fuente fiable informa recientemente que la variante es patogénica, pero la evidencia no está disponible para que el laboratorio realice una evaluación independiente	

TIPO DE EVIDENCIA	EVIDENCIA	DESCRIPCIÓN
BENIGNA	BA1	La frecuencia alélica en población control es >5 % en Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project o Exome Aggregation Consortium
	BS1	La frecuencia alélica es mayor de lo esperada para el trastorno
	BS2	Observada en un individuo adulto sano para un trastorno recesivo (homocigoto), dominante (heterocigoto) o ligado al cromosoma X (hemicigoto), con penetrancia completa esperada a una edad temprana
	BS3	Los estudios funcionales in vitro o in vivo bien establecidos no muestran ningún efecto dañino sobre la función de la proteína o el Splicing
	BS4	Falta de segregación en los miembros afectados de una familia
	BP1	Variante missense en un gen para el cual se sabe que principalmente las variantes truncantes causan enfermedad
	BP2	Detectada en trans con una variante patogénica para un gen/trastorno dominante totalmente penetrante u observado en cis con una variante patogénica en cualquier patrón de herencia
	BP3	Deleciones/inserciones inframe en una región repetitiva sin una función conocida
	BP4	Múltiples líneas de evidencia computacional sugieren que no hay impacto en el gen o el producto del gen (conservación, evolutivo, efecto en el splicing, etc.)
	BP5	Variante encontrada en un caso con una base molecular alternativa para la enfermedad
	BP6	Una fuente confiable informa recientemente que la variante es benigna, pero el laboratorio no dispone de pruebas para realizar una evaluación independiente
	BP7	Una variante sinónima para la cual los algoritmos de predicción de splicing no predicen ningún impacto en la secuencia de consenso de empalme ni la creación de un nuevo sitio de empalme y el nucleótido no es altamente conservado

Anexo 6. Combinación de los criterios propuestos por la ACMG-AMP para la clasificación de variantes.

VARIANTE PATOGENICA
1 PVS1 en combinación con:
≥ 1 PS
≥ 2 PM
1 PM y 1 PP
≥ 2 PP
≥ 2 PS
1 PS en combinación con:
≥ 3 PM
2 PM y ≥ 2 PP
1 PM y ≥ 4 PP
VARIANTE PROBABLEMENTE PATOGENICA
1 PVS1 y 1 PM
1 PS1 y 1-2 PM
1 PS y ≥ 2 PP
≥ 3 PM
2 PM y ≥ 2 PP
1 PM1 y ≥ 4 PP
VARIANTE BENIGNA
1 BA1
\geq BS
VARIANTE PROBABLEMENTE BENIGNA
1 BS y 1 BP
≥ 2 BP
VARIANTE DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO
No se cumplen ninguna de las combinaciones de criterios mostradas anteriormente
Los criterios benignos y patogénicos son contradictorios

Anexo 7. Regiones cubiertas por el panel *TruSight® Tumor 26* (Illumina).

GEN	Transcrito_ID	EXÓN	CROMOSOMA	POSICIÓN INICIAL	POSICIÓN FINAL
<i>AKT1</i>	NM_005163	2	14	105246425	105246558
<i>ALK</i>	NM_004304	23	2	29443642	29443706
<i>APC</i>	NM_000038	15_hotspot1	5	112173743	112173988
<i>APC</i>	NM_000038	15_hotspot2	5	112174526	112174778
<i>APC</i>	NM_000038	15_hotspot3	5	112174975	112175370
<i>APC</i>	NM_000038	15_hotspot4	5	112175469	112176130
<i>BRAF</i>	NM_004333	11	7	140481371	140481498
<i>BRAF</i>	NM_004333	15	7	140453072	140453195
<i>CDH1</i>	NM_004360	8	16	68846033	68846171
<i>CDH1</i>	NM_004360	9	16	68847213	68847403
<i>CDH1</i>	NM_004360	12	16	68855899	68856128
<i>CTNNB1</i>	NM_001904	2	3	41266012	41266161
<i>EGFR</i>	NM_005228	18	7	55241609	55241741
<i>EGFR</i>	NM_005228	19	7	55242412	55242518
<i>EGFR</i>	NM_005228	20	7	55248981	55249176
<i>EGFR</i>	NM_005228	21	7	55259407	55259572
<i>ERBB2</i>	NM_004448	20	17	37880974	37881169
<i>FBXW7</i>	NM_033632	7	4	153250819	153250942
<i>FBXW7</i>	NM_033632	8	4	153249355	153249546
<i>FBXW7</i>	NM_033632	9	4	153247153	153247388
<i>FBXW7</i>	NM_033632	10	4	153245331	153245551
<i>FBXW7</i>	NM_033632	11	4	153244028	153244303
<i>FGFR2</i>	NM_000141	6	10	123279488	123279688
<i>FOXL2</i>	NM_023067	1	3	138665109	138665221
<i>GNAQ</i>	NM_002072	4	9	80412431	80412569
<i>GNAQ</i>	NM_002072	5	9	80409374	80409513
<i>GNAQ</i>	NM_002072	6	9	80343425	80343588
<i>GNAS</i>	NM_000516	6	20	57480433	57480540
<i>GNAS</i>	NM_000516	8	20	57484403	57484483
<i>KIT</i>	NM_000222	9	4	55592018	55592221
<i>KIT</i>	NM_000222	11	4	55593577	55593713
<i>KIT</i>	NM_000222	13	4	55594175	55594292
<i>KIT</i>	NM_000222	17	4	55599231	55599363
<i>KIT</i>	NM_000222	18	4	55602662	55602780
<i>KRAS</i>	NM_004985	1	12	25398203	25398323
<i>KRAS</i>	NM_004985	2	12	25380163	25380351
<i>KRAS</i>	NM_004985	3	12	25378543	25378712
<i>KRAS</i>	NM_004985	4	12	25362724	25362850
<i>MAP2K1</i>	NM_002755	2	15	66727437	66727561
<i>MET</i>	NM_000245	1	7	116339543	116340298
<i>MET</i>	NM_000245	4	7	116380901	116381084
<i>MET</i>	NM_000245	13	7	116411898	116412048
<i>MET</i>	NM_000245	15	7	116417441	116417528
<i>MET</i>	NM_000245	16	7	116418825	116419016

GEN	Transcrito_ID	EXÓN	CROMOSOMA	POSICIÓN INICIAL	POSICIÓN FINAL
<i>MET</i>	NM_000245	17	7	116422037	116422156
<i>MET</i>	NM_000245	18	7	116423353	116423526
<i>MET</i>	NM_000245	20	7	116435936	116436183
<i>MSH6</i>	NM_000179	5	2	48030554	48030829
<i>NRAS</i>	NM_002524	1	1	115258677	115258786
<i>NRAS</i>	NM_002524	2	1	115256416	115256604
<i>NRAS</i>	NM_002524	3	1	115252185	115252354
<i>NRAS</i>	NM_002524	4	1	115251151	115251280
<i>PDGFRA</i>	NM_006206	11	4	55141003	55141145
<i>PDGFRA</i>	NM_006206	13	4	55144058	55144178
<i>PDGFRA</i>	NM_006206	17	4	55152003	55152135
<i>PIK3CA</i>	NM_006218	1	3	178916609	178916970
<i>PIK3CA</i>	NM_006218	2	3	178917473	178917692
<i>PIK3CA</i>	NM_006218	7	3	178927969	178928131
<i>PIK3CA</i>	NM_006218	9	3	178936039	178936127
<i>PIK3CA</i>	NM_006218	20	3	178951877	178952157
<i>PTEN</i>	NM_000314	1	10	89624222	89624310
<i>PTEN</i>	NM_000314	2	10	89653777	89653871
<i>PTEN</i>	NM_000314	3	10	89685266	89685319
<i>PTEN</i>	NM_000314	4	10	89690798	89690851
<i>PTEN</i>	NM_000314	5	10	89692765	89693013
<i>PTEN</i>	NM_000314	6	10	89711870	89712021
<i>PTEN</i>	NM_000314	7	10	89717605	89717781
<i>PTEN</i>	NM_000314	9	10	89725041	89725152
<i>SMAD4</i>	NM_005359	8	18	48591788	48591981
<i>SMAD4</i>	NM_005359	11	18	48604621	48604842
<i>SRC</i>	NM_005417	14	20	36031584	36031787
<i>STK11</i>	NM_000455	1	19	1206908	1207149
<i>STK11</i>	NM_000455	4	19	1220367	1220400
<i>STK11</i>	NM_000455	6	19	1221221	1221344
<i>STK11</i>	NM_000455	8	19	1222979	1223176
<i>TP53</i>	NM_000546	2	17	7579834	7579917
<i>TP53</i>	NM_000546	3	17	7579695	7579726
<i>TP53</i>	NM_000546	4	17	7579307	7579586
<i>TP53</i>	NM_000546	5	17	7578366	7578559
<i>TP53</i>	NM_000546	6	17	7578172	7578294
<i>TP53</i>	NM_000546	7	17	7577498	7577613
<i>TP53</i>	NM_000546	8	17	7577014	7577160
<i>TP53</i>	NM_000546	9	17	7576848	7576931
<i>TP53</i>	NM_000546	10	17	7573922	7574036
<i>TP53</i>	NM_000546	11	17	7572922	7573013

Anexo 8. Características clínicas de todos los participantes incluidos en el estudio. (M: mujer, V: varón, >10A: más de 10 adenomas, >20MA: más de 20 adenomas metacrónicos, >10SA: más de 10 adenomas sincrónicos, A: poliposis adenomatosa, MX: poliposis mixta, AI: caso aislado, D: dominante, R: recesiva).

ID	Género	Criterio	Edad de diagnóstico	Número de pólipos	Número de colonoscopias	Tipo de poliposis	Colectomía	CCR	Herencia
1	V	>20A	72	42	8	A	NO	NO	AI
2	M	>20A	71	20	8	A	NO	NO	R
3	M	>20A	57	96	14	A	NO	NO	R
4	V	>10A	57	19	6	A	NO	SÍ	D
5	V	>10SA	58	14	7	A	SÍ	SÍ	D
6	V	>20A	72	41	7	A	SÍ	SÍ	AI
7	V	>20A	64	20	5	M	NO	NO	AI
8	V	>20A	54	51	9	M	NO	NO	R
9	M	>20A	62	61	7	A	NO	NO	D
10	V	>20A	64	21	4	M	SÍ	NO	R
11	V	>20A	42	21	15	M	NO	SÍ	R
12	V	>20A	62	28	4	M	NO	NO	AI
13	V	>20A	43	26	4	A	SÍ	SÍ	R
14	M	>10SA	57	20	6	M	SÍ	SÍ	AI
15	V	>20A	63	52	8	M	SÍ	SÍ	AI
16	V	>20A	67	29	9	A	NO	NO	R
17	M	>20A	71	51	3	M	NO	NO	R
18	V	>20A	68	34	5	A	NO	NO	R
19	V	>20A	69	31	4	M	SÍ	NO	AI
20	V	>20A	75	31	4	A	SÍ	SÍ	AI
21	V	>20A	61	26	10	A	NO	NO	D
22	V	>20A	64	60	9	A	NO	NO	R
23	M	>20A	72	26	9	M	NO	NO	AI
24	V	>20A	52	41	11	M	SÍ	NO	R
25	V	>20A	74	30	4	A	NO	NO	AI
26	V	>20A	60	36	9	A	NO	NO	AI
27	V	>20A	49	35	10	M	SÍ	NO	R

ID	Género	Criterio	Edad de diagnóstico	Número de pólipos	Número de colonoscopias	Tipo de poliposis	Colectomía	CCR	Herencia
28	M	>20A	68	21	5	M	NO	NO	AI
29	V	>20A	74	49	10	M	SÍ	SÍ	AI
31	M	>10A	56	18	3	A	NO	NO	R
32	M	>10SA	57	26	7	M	NO	SÍ	R
34	V	>20A	74	24	3	M	NO	NO	AI
35	V	>20A	37	21	7	A	NO	NO	R
36	V	>20A	55	30	13	M	SÍ	SÍ	R
37	V	>20A	65	33	10	A	SÍ	SÍ	R
38	M	>20A	47	34	10	M	NO	NO	R
39	V	>20A	72	45	4	A	NO	SÍ	R
40	M	>20A	57	25	4	M	NO	NO	AI
41	V	>20A	66	21	8	A	NO	NO	R
42	V	>20A	77	31	2	A	NO	NO	AI
43	V	>10SA	61	20	5	M	NO	NO	R
44	V	>10A	67	17	7	M	NO	NO	AI
45	V	>20A	39	>80	11	A	NO	SÍ	AI
47	V	>20A	36	41	10	A	SÍ	SÍ	AI
48	M	>20A	66	43	11	A	SÍ	NO	R
49	V	>10A	68	15	4	A	NO	NO	AI
50	M	>20A	63	32	4	M	NO	NO	R
51	V	>10A	61	14	6	M	NO	NO	AI
52	M	>10SA	55	15	1	A	SÍ	NO	D
53	V	>10SA	60	17	6	A	NO	NO	R
54	V	>20A	62	23	6	M	NO	NO	AI
55	M	>10A	72	14	10	M	NO	SÍ	D
56	V	>10SA	74	18	3	A	NO	NO	AI
57	V	>20A	72	24	5	A	SÍ	NO	AI
58	V	>20A	75	20	9	M	NO	SÍ	AI
59	V	>20A	73	26	6	A	SÍ	SÍ	D
60	V	>10SA	66	19	4	A	NO	NO	AI

ID	Género	Criterio	Edad de diagnóstico	Número de pólipos	Número de colonoscopias	Tipo de poliposis	Colectomía	CCR	Herencia
61	V	>10A	54	15	7	A	NO	SÍ	AI
62	V	>20A	67	21	9	M	NO	NO	AI
63	V	>10A	64	13	4	M	NO	NO	AI
64	V	>20A	64	37	8	M	NO	NO	AI
65	V	>10A	70	16	9	M	NO	SÍ	R
66	M	>20A	55	41	2	A	SÍ	SÍ	AI
67	V	>20A	51	100	4	A	SÍ	NO	AI
68	V	>10A	60	17	3	M	NO	NO	AI
69	M	>20A	70	23	3	M	NO	NO	AI
70	V	>10SA	66	16	4	A	NO	NO	AI
71	V	>20A	33	21	3	A	SÍ	NO	R
72	V	>10SA	63	14	2	M	SÍ	SÍ	AI
73	V	>10A	56	14	6	M	NO	NO	AI
74	M	>10A	70	11	4	A	NO	NO	AI
75	V	>20A	64	31	1	M	NO	SÍ	AI
76	V	>10A	68	15	8	A	NO	NO	D
77	V	>10A	62	18	4	A	NO	NO	D
78	V	>10SA	47	44	10	M	NO	NO	AI
79	V	>10A	67	15	4	A	NO	NO	R
80	V	>10SA	61	18	2	M	NO	NO	AI
81	M	>20A	55	32	7	A	NO	NO	AI
82	V	>10SA	80	18	4	A	NO	NO	AI
83	M	>20A	74	24	5	A	NO	NO	AI
84	V	>10A	68	12	3	M	NO	NO	AI
85	V	>20A	62	21	4	M	NO	NO	R
87	V	>20A	67	29	6	A	NO	NO	D
88	V	>20A	70	22	6	M	NO	NO	R
89	V	>20A	56	40	2	A	NO	NO	AI
90	V	>20A	76	22	3	M	SÍ	NO	AI
91	V	>10A	57	12	5	A	NO	NO	D

ID	Género	Criterio	Edad de diagnóstico	Número de pólipos	Número de colonoscopias	Tipo de poliposis	Colectomía	CCR	Herencia
92	V	>10SA	72	19	4	A	NO	NO	AI
94	V	>10SA	73	21	5	M	NO	NO	AI
95	V	>10SA	74	20	4	A	NO	SÍ	AI
96	M	>20A	70	39	6	M	SÍ	SÍ	R
97	M	>20A	71	24	10	M	NO	NO	AI
98	V	>10A	64	10	7	A	NO	NO	R
99	V	>10SA	79	18	3	M	NO	NO	AI
100	V	>10A	77	10	9	A	NO	NO	R
101	V	>10A	55	16	7	M	NO	NO	AI
102	M	>10SA	68	10	2	A	SÍ	SÍ	R
103	V	>10SA	65	24	5	M	NO	NO	D
104	M	>10SA	63	21	5	M	NO	SÍ	AI
105	M	>20A	67	20	3	A	NO	NO	D
106	V	>20A	51	100	10	M	SÍ	SÍ	R
107	V	>10SA	80	12	5	A	NO	NO	D
108	M	>10SA	64	22	6	M	NO	NO	AI
109	V	>20A	47	20	6	A	NO	NO	D
110	M	>20A	63	30	5	A	NO	NO	AI
111	M	>10SA	56	19	5	M	NO	NO	R
112	M	>10A	61	15	8	A	SÍ	NO	R
113	V	>10A	60	10	3	A	NO	NO	D
114	M	>20A	55	35	10	M	NO	NO	AI
115	V	>10A	55	16	3	M	NO	NO	R
116	M	>10SA	47	24	5	M	SÍ	SÍ	D
117	V	>10SA	62	21	3	M	-	NO	R
118	M	>10A	57	12	3	A	-	NO	R
119	V	>10A	64	13	5	M	-	NO	R
121	V	>20A	58	65	8	M	-	NO	R
122	M	>10A	50	17	7	M	-	NO	R
123	V	>10SA	80	11	2	A	-	NO	AI

ID	Género	Criterio	Edad de diagnóstico	Número de pólipos	Número de colonoscopias	Tipo de poliposis	Colectomía	CCR	Herencia
125	V	>20A	47	45	-	A	-	NO	AI
126	M	>20A	40	55	-	A	-	SÍ	D
127	V	>20A	65	45	-	A	-	NO	AI
128	V	>20A	64	51	16	A	SÍ	SÍ	AI
129	V	>20A	61	51	8	A	SÍ	NO	D
130	V	>20A	72	41	-	A	-	NO	AI
131	V	>20A	79	51	6	A	NO	NO	AI
132	V	>10SA	68	42	10	M	NO	NO	AI
133	M	>20A	54	43	6	M	NO	NO	D
134	V	>20A	78	51	11	A	NO	NO	D
135	V	>20A	58	51	13	M	NO	NO	AI
136	V	>20A	66	48	-	A	-	NO	AI
137	V	>20A	76	51	1	A	SÍ	SÍ	AI
138	V	>20A	68	38	-	M	-	NO	AI
139	V	>20A	72	81	4	A	SÍ	SÍ	D
140	V	>20A	76	31	8	A	NO	NO	AI
141	V	>20A	61	41	-	A	-	NO	D
142	M	>20A	64	32	-	A	-	NO	R
143	V	>20A	60	61	-	M	-	NO	D
144	V	>20A	69	81	-	A	-	SÍ	AI
145	M	>20A	52	50	-	A	-	NO	AI
146	V	>20A	50	31	5	A	SÍ	NO	D
147	M	>20A	51	36	5	A	-	NO	D
148	M	>10SA	73	17	3	M	-	NO	D
149	V	>20A	77	25	4	M	-	NO	D
150	V	>20A	50	20	5	A	-	NO	R
151	V	>20A	48	31	-	A	SÍ	NO	D
152	V	>20A	68	40	-	A	-	NO	D
153	V	>20A	70	51	2	A	SÍ	SÍ	R
154	V	>20A	69	76	-	A	-	SÍ	D

ID	Género	Criterio	Edad de diagnóstico	Número de pólipos	Número de colonoscopias	Tipo de poliposis	Colectomía	CCR	Herencia
155	V	>20A	67	34	-	A	-	NO	R
156	V	>20A	69	30	-	A	-	SÍ	AI
157	V	>20A	68	51	12	A	NO	NO	D
158	V	>20A	54	42	-	A	-	SÍ	R
159	M	>20A	53	31	7	A	NO	NO	AI
160	V	>20A	64	31	-	A	SÍ	NO	AI
161	M	>20A	54	31	5	A	SÍ	NO	AI
162	V	>20A	52	31	7	M	NO	NO	D
163	M	>20A	54	51	8	M	NO	NO	R
164	V	>20A	79	37	6	M	SÍ	SÍ	D
165	V	>20A	54	38	13	M	NO	NO	AI
167	V	>20A	60	49	11	M	SÍ	NO	D

Anexo 9. Variantes obtenidas tras los análisis de filtrado. En gris se se resaltan las variantes no priorizadas y en rojo los falsos positivos, no validados por secuenciación Sanger. ^aFRECUENCIA ALÉLICA: nd=no descrita. ^bEVIDENCIAS DE PATOGENICIDAD: P=Patogénica, PP=Probablemente patogénica, VSD=Variante de significado desconocido, PB=Probablemente benigna, B=Benigna, nd=no descrita. ^cESTUDIOS IN SILICO: NA=No aplica, N=Neutral, D=Deletérea, BA=Broken acceptor, BD=Broken donor, NO=no se predice alteración en el splicing, NO*=Baja la fuerza del donador de splicing, pero no se predice una alteración significativa y aun así se decide estudiar el splicing mediante estudios in vitro.

PAAX-ID	Gen	NOMENCLATURA		FRECUENCIA ALÉLICA ^a (gnomAD)	EVIDENCIAS DE PATOGENICIDAD ^b			ESTUDIOS IN SILICO ^c				BIOTIPO
		HGVS (Coding)	HGVS (Protein)		UMD	LOVD	ClinVar	SIFT	Poly Phen-2	Mutation Taster	HSF-MaxEnt	
3	<i>APC</i>	c.266C>G	p.Ser89Ter	nd	nd	-	P	NA	NA	NA		Nonsense
3	<i>POLE</i>	c.2865-1 delTGAAA		nd	-	nd	nd	NA	NA	NA	BA	Splicing
9	<i>APC</i>	c.147_150del	p.Lys49Asnfs*20	nd	nd	-	nd	NA	NA	NA		Frameshift
10	<i>POLE</i>	c.2865-1delTGAAA		nd	-	nd	nd	NA	NA	NA	BA	Splicing
11	<i>MSH2</i>	c.308A>G	p.Tyr103Cys	nd	nd	-	VSD	D	D	D		Missense
13	<i>APC</i>	c.1441G>A	p.Val481Met	3.1e-05	nd	-	VSD	N	N	D		Missense
15	<i>MSH3</i>	c.398C>T	p.Ser133Phe	nd	-	nd	nd	D	D	D		Missense
16	<i>POLE</i>	c.3857G>A	p.Arg1286His	5.0e-05	-	nd	nd	D	D	D		Missense
16	<i>NTHL1</i>	c.527T>C	p.Ile176Thr	2.2e-03	-	-	VSD-PB	D	D	D		Missense
17	<i>GALNT12</i>	c.907G>A	p.Asp303Asn	1.9e-03	-	-	VSD	N	D	D		Missense
21	<i>POLE</i>	c.2865-2_2865-6delTGAAA		nd	-	nd	nd	NA	NA	NA	NO	Splicing
21	<i>POLE</i>	c.6716C>T	p.Ala2239Val	8.0e-06	-	nd	nd	D	D	D		Missense
25	<i>MUTYH</i>	c.998-9C>T		5.6e-04	PB	-	PB	NA	NA	NA	NO	Splicing
26	<i>MUTYH</i>	c.998-9C>T		5.6e-04	PB	-	PB	NA	NA	NA	NO	Splicing
27	<i>BMP4</i>	c.272C>G	p.Ser91Cys	3.8e-04	-	nd	P	D	D	D		Missense
28	<i>POLE</i>	c.2865-1 delTGAAA		nd	-	nd	nd	NA	NA	NA	BA	Splicing
29	<i>ENG</i>	c.1633G>A	p.Gly545Ser	5.2e-04	-	nd	PB	D	D	D		Missense
31	<i>MSH3</i>	c.2732T>G	p.Leu911Trp	3e-03	-	nd	nd	D	D	D		Missense
34	<i>APC</i>	c.1966C>G	p.Leu656Val	0	nd	nd	nd	D	D	D		Missense
34	<i>POLE</i>	c.2865-2_2865-6delTGAAA		nd	-	nd	nd	NA	NA	NA	NO	Splicing

PAAX-ID	Gen	NOMENCLATURA		FRECUENCIA ALÉLICA ^a (gnomAD)	EVIDENCIAS DE PATOGENICIDAD ^b			ESTUDIOS IN SILICO ^c				BIOTIPO
		HGVS (Coding)	HGVS (Protein)		UMD	LOVD	ClinVar	SIFT	Poly Phen-2	Mutation Taster	HSF-MaxEnt	
35	<i>MLH1</i>	c.376T>A	p.Tyr126Asn	7.7e-05	VSD	-	VSD	D	D	D		Missense
35	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A	p.Gly396Asp	4.8e-03	P	-	P	D	D	D		Missense
35	<i>MUTYH</i>	c.739C>G	p.Arg247Gly	nd	nd	-	nd	D	D	D		Missense
37	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A	p.Gly396Asp	4.8e-03	P	-	P	D	D	D		Missense
38	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A	p.Gly396Asp	4.8e-03	P	-	P	D	D	D		Missense
38	<i>POLE</i>	c.2865-1delTGAAA		nd	-	nd	nd	NA	NA	NA	BA	Splicing
45	<i>APC</i>	c.3199C>T	p.Gln1067*	nd		P	P	NA	NA	NA		Nonsense
49	<i>BMPRIA</i>	c.1327C>T	p.Arg443Cys	8.2e-04	-	nd	VSD	D	D	D		Missense
49	<i>MSH6</i>	c.3788G>A	p.Arg1263His	5.4e-05	nd	-	VSD	D	D	D		Missense
54	<i>MUTYH</i>	c.481G>C	p.Asp161His	5.5e-05	VSD	-	VSD	N	N	D		Missense
55	<i>AXIN2</i>	c.2141G>A	p.Arg714Gln	0	-	nd	nd	D	D	D	NO*	Missense
56	<i>APC</i>	c.1274A>G	p.Glu425Gly	nd	nd	-	nd	D	D	D		Missense
61	<i>MUTYH</i>	c.667A>G	p.Ile223Val	3.4e-04	VSD	-	VSD	D	D	D		Missense
70	<i>MLH1</i>	c.1050A>G	p.Pro350=	5.3e-05	nd	-	PB	NA	NA	NA	BA	Splicing
75	<i>APC</i>	c.4414G>A	p.Val1472Ile	8.8e-06	nd	nd	VSD	N	N	D		Missense
75	<i>NTHL1</i>	c.856G>A	p.Gly286Ser	3.2e-05	-	nd	nd	D	D	D		Missense
77	<i>MSH4</i>	c.2226+5C>A		nd	-	nd	nd	NA	NA	NA	NO	Splicing
79	<i>AXIN2</i>	c.203G>A	p.Arg68Gln	2.0e-04	-	PP	VSD	D	D	D		Missense
79	<i>MSH2</i>	c.1790A>C	p.Asp597Ala	0.000*	VSD	-	VSD	N	D	D		Missense
80	<i>POLE</i>	c.2865-2_2865-6delTGAAA		nd	-	nd	nd	NA	NA	NA	NO	Splicing
82	<i>NTHL1</i>	c.527T>C	p.Ile176Thr	2.2e-03	-	-	VSD-PB	D	D	D		Missense
83	<i>MSH3</i>	c.2732T>G	p.Leu911Trp	3e-03	-	nd	nd	D	D	D		Missense
83	<i>NTHL1</i>	c.268C>T	p.Gln90Ter	2.0e-03	-	P	P	NA	NA	NA		Nonsense
83	<i>POLE</i>	c.141delG	p.Phe48LeufsTer6	0	-	nd	nd	NA	NA	NA		Frameshift
85	<i>MLH3</i>	574G>A	p.Asp192Asn	nd	-	-	nd	D	D	D		Missense
85	<i>MSH3</i>	c.2732T>G	p.Leu911Trp	3e-03	-	nd	nd	D	D	D		Missense
85	<i>POLE</i>	c.2865-2_2865-6delTGAAA		nd	-	nd	nd	NA	NA	NA	NO	Splicing

PAAX-ID	Gen	NOMENCLATURA		FRECUENCIA ALÉLICA ^a (gnomAD)	EVIDENCIAS DE PATOGENICIDAD ^b			ESTUDIOS IN SILICO ^c				BIOTIPO
		HGVS (Coding)	HGVS (Protein)		UMD	LOVD	ClinVar	SIFT	Poly Phen-2	Mutation Taster	HSF-MaxEnt	
89	<i>AXIN2</i>	c.112_120delCCACCCCTG	p.Pro38_Val40del	8.9e-06	-	nd	nd	NA	NA	NA		Frameshift
89	<i>MSH3</i>	c.2732T>G	p.Leu911Trp	3e-03	-	nd	nd	D	D	D		Missense
89	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A	p.Gly396Asp	4.8e-03	P	-	P	D	D	D		Missense
89	<i>MUTYH</i>	c.1510_1517delins	p.Thr504fs	nd	nd	-	nd	NA	NA	NA	BD	Frameshift
92	<i>APC</i>	c.641C>A	p.Ala214Glu	nd	nd	nd	nd	D	N	D		Missense
95	<i>PTEN</i>	c.1003C>T	p.Arg335Ter	nd	-	P	P	NA	NA	NA		Nonsense
96	<i>POLD1</i>	c.-48G>A		4.4e-03	-	nd	nd	NA	NA	NA		UTR
98	<i>PMS2</i>	c.2108C>T	p.Thr703Met	8.8e-06	-	-	VSD	D	D	D		Missense
99	<i>MSH2</i>	c.138C>G	p.His46Gln	4.7e-04	VSD	-	VSD	D	D	D		Missense
99	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A	p.Gly396Asp	4.8e-03	P	-	P	D	D	D		Missense
101	<i>APC</i>	c.3949G>C	p.Glu1317Gln	6.3e-03	B	B	VSD	N	N	D		Missense
102	<i>POLD1</i>	c.-48G>A	a +6nt del primer nt del transcrito	4.4e-03	-	nd	nd	NA	NA	NA		UTR
104	<i>MSH4</i>	c.764A>C	p.Glu255Ala	7.8e-06	-	-	-	D	D	D		Missense
106	<i>MSH4</i>	c.1973C>T	p.Ser658Phe	nd	-	-	VSD	N	D	D		Missense
107	<i>GALNT12</i>	c.907G>A	p.Asp303Asn	1.9e-03	-	-	VSD	N	D	D		Missense
108	<i>POLD1</i>	c.-48G>A	a +6nt del primer nt del transcrito	4.4e-03	-	nd	nd	NA	NA	NA		UTR
110	<i>BMP4</i>	c.676C>T	p.Arg226Trp	5.7e-04	-	-	nd	D	D	D		Missense
110	<i>MSH3</i>	c.2732T>G	p.Leu911Trp	3.4e-03	-	nd	nd	N	N	N		Missense
111	<i>BMP4</i>	c.349G>T	p.Val117Leu	7.8e-06	-	-	nd	D	D	D		Missense
116	<i>POLD1</i>	c.2007-5C>T		2.5e-04	-	nd	PB	NA	NA	NA	NO	Splicing
118	<i>POLD1</i>	c.520C>T	p.Arg174Trp	2.7e-05	-	nd	VSD	D	D	D		Missense
119	<i>POLE</i>	c.-44C>A	primer nt transcrito	2e-03	-	-	nd	NA	NA	NA		UTR
122	<i>MSH4</i>	c.990G>C	p.Arg330Ser	nd	-	-	nd	N	D	D	BA	Missense
133	<i>APC</i>	c.7399C>A	p.Pro2467Thr	1.0e-04	VSD	-	VSD	D	N	D		Missense
135	<i>MLH3</i>	c.-153-6	a -6nt del primer nt del transcrito	nd	-	-	-	NA	NA	NA		UTR
136	<i>APC</i>	c.8501A>C	p.His2834Pro	nd	nd	-	nd	D	D	D		Missense
136	<i>BMPRIA</i>	c.917A>G	p.Tyr306Cys	8.8e-06	-	nd	nd	D	D	D		Missense

PAAX-ID	Gen	NOMENCLATURA		FRECUENCIA ALÉLICA ^a (gnomAD)	EVIDENCIAS DE PATOGENICIDAD ^b			ESTUDIOS IN SILICO ^c				BIOTIPO
		HGVS (Coding)	HGVS (Protein)		UMD	LOVD	ClinVar	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	HSF-MaxEnt	
139	<i>APC</i>	c.1240C>G	p.Arg414Gly	nd	VSD	-	VSD	D	D	D		Missense
139	<i>ENG</i>	c.1851G>A	p.Thr617=	4.1e-05	-	nd	nd	NA	NA	NA	NO	Splicing
140	<i>MLH1</i>	c.1050A>G	Pro350=	5.3e-05	nd	-	PB	NA	NA	NA	BA	Splicing
146	<i>GALNT12</i>	c.907G>A	p.Asp303Asn	1.9e-03	-	-	VSD	N	D	D		Missense
147	<i>POLE</i>	c.198G>A	p.Met66Ile	0	-	-	nd	D	N	D		Missense
152	<i>POLD1</i>	c.2052G>C	p.Gln684His	6.3e-04	-	nd	VSD	D	D	D		Missense
153	<i>PMS2</i>	c.2186_2187delTC	p.Leu729Glnfs*6	nd	-	-	VSD	NA	NA	NA		Frameshift
155	<i>POLE</i>	c.-44C>A	primer nt transcrito	2e-03	-	-	nd	NA	NA	NA		UTR
157	<i>POLD1</i>	c.1465G>A	p.Val489Met	3.3e-05	-	nd	nd	D	D	D		Missense
160	<i>PMS2</i>	c.253C>G	p.Leu85Val	nd	-	-	nd	D	D	D		Missense
163	<i>BMPRI1A</i>	c.1327C>T	p.Arg443Cys	8.2e-04	-	nd	VSD	D	D	D		Missense
164	<i>GALNT12</i>	c.907G>A	p.Asp303Asn	1.9e-03	-	-	VSD	N	D	D		Missense
164	<i>MSH4</i>	c.2080G>C	p.Ala694Pro	nd	-	-	-	D	D	D		Missense

Secuencias de referencia: APC= NM_000038.4, NP_000029.2; AXIN2= NM_004655.3, NP_004646.3; BMP4= NM_001202.3, NP_001193.2; BMPRI1A= NM_004329.2, NP_004320.2; ENG= NM_000118.3, NP_000109.1; GALNT12= NM_024642.4, NP_078918.3; MLH1= NM_000249.3, NP_000240.1; MLH3= NM_001040108.1, NP_001035197.1; MSH2= NM_000251.2, NP_000242.1; MSH3= NM_002439.4, NP_002430.3; MSH4= NM_002440.3, NP_002431.2; MSH6= NM_000179.2, NP_000170.1; MUTYH= NM_012222, NP_036354; NTHL1= NM_002528.5, NP_002519.1; PMS2= NM_000535.5, NP_000526.1; POLD1= NM_001256849.1, NP_001243778.1; POLE= NM_006231.3, NP_006222.2; PTEN= NM_000314.6, NP_000305.3.

Anexo 10. Estudios moleculares en muestras de tejido de pacientes PAAX. RES Germinal=Resultado en panel germinal; Muestra: AD= adenoma, AC= adenocarcinoma, HIST= Histología: ATDBG=Adenoma tubular con displasia de bajo grado, ATVDBG= Adenoma túbulo-veloso con displasia de bajo grado, ATDMG = Adenoma tubular con displasia de moderado grado, AS= Adenoma serrado, ACEIP= Adenocarcinoma enteroide infiltrante de patrón polipoide, ACSA=Adenocarcinoma sobre adenoma; MSI=Resultado de inestabilidad de microsatélites; IHQ MMR=Inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras MMR: MMR+=expresión conservada de las 4 proteínas MMR, MLH1/PMS2-=falta de expresión de MLH1 y PMS2; BRAF=Resultado del Genotipado de *BRAF* V600E; MET MLH1=Resultado de la metilación en MLH1: MET=Metilado, NO=No metilado; FA (%)= fracción alélica; RD= Profundidad de lectura.

RES Germinal	PACIENTE	MUESTRA	HIST	Tamaño (mm)	RES MSI	IHQ MMR	BRAF	MET MLH1	RES TST26				
									GEN	HGVSc	HGVSp	FA (%)	RD
WT	1	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-
WT	2	AD1	AT	5	MSS	MMR+	-	-	-	-	-	-	-
APC (Clase 5)	3	AD1	ATDBG	2	MSS	MMR+	WT	NO	APC	c.3340C>T	p.Arg1114*	8,7	2106
									APC	c.4348C>T	p.Arg1450*	8,5	8944
									APC	c.4660_4661insA	p.Thr1556Asnfs*3	5,5	13164
WT	6	AD1	ATDBG	2	MSS	MMR+	WT	NO	CTNNB1	c.134C>T	p.Ser45Phe	3,1	1705
									KRAS	c.34G>A	p.Gly12Ser	13,5	4644
									APC	c.4660_4661insA	p.Thr1556Asnfs*3	18,4	13158
WT	8	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-
APC (Clase 5)	9	AD1	ATVDBG	10-11	-	-	-	-	APC	c.3856G>T	p.Glu1286*	19,9	11413
		AD2	ATDBG	<5	MSS	MMR+	WT	NO	APC	c.4385_4386delAG	p.Ser1465Trpfs*3	18,3	6578
MSH2 (Clase 2)	11	AD1	ATDBG	15	MSI	MLH1/PMS2-	MUT	MET	CDH1	c.1896C>T	p.His632=	50,8	8454
									BRAF	c.1799T>A	p.Val600Glu	7,2	10299
									TP53	c.642_643delTA	p.His214Glnfs*7	7,2	7529
WT	12	AD1	ATVDBG	5	-	-	-	-	APC	c.4241delT	p.Val1414Glnfs*5	25,8	13076
		AD2	ATDBG	15	MSS	MMR+	WT	NO	APC	c.4189G>T	p.Glu1397*	30,1	6513
WT	13	AC1	AC-ATVDBG	20	MSS	MMR+	MUT	NO	APC	c.4606G>T	p.Glu1536*	29,2	5093
									APC	c.4661delA	p.Thr1556Leufs*9	29,8	9143
									BRAF	c.1799T>A	p.Val600Glu	27,8	6547
		AC2	ACSA	4	MSS	MMR+	MUT	NO	BRAF	c.1799T>A	p.Val600Glu	20,9	8357
WT	14	AD1	AT	5	MSS	-	-	-	PTEN	c.453C>T	p.Ala151=	3,1	5643

RES Germinal	PACIENTE	MUESTRA	HIST	Tamaño (mm)	RES MSI	IHQ MMR	BRAF	MET MLH1	RES TST26				
									GEN	HGVSc	HGVSp	FA (%)	RD
WT	15	AD1	AT	5	MSI	MLH1/ PMS2-	WT	NO	-	-	-	-	-
<i>POLE+NTHL1</i> (Clases 3)	16	AC1	ATVM-H0	10	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.3925G>T	p.Glu1309*	50,5	8367
		AD1	ATDBG	5	MSS	MMR+	WT	NO	<i>TP53</i>	c.1096T>G	p.Ser366Ala	46,2	792
<i>GALNT12</i> (Clase 1)	17	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-
WT	18	AD1	AVDBG	15	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4654G>T	p.Glu1552*	5,3	12241
WT	19	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-
WT	20	AD1	ATDBG	5	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4348C>T	p.Arg1450*	26,5	7922
		AD2	ATDBG	3	MSS	MMR+	MUT	NO	<i>BRAF</i>	c.1780G>A	p.Asp594Asn	17,6	9795
									<i>NRAS</i>	c.35G>T	p.Gly12Val	24,3	4695
<i>POLE</i> (Clase 2)	21	AD1	ATDBG	5	MSS	MMR+	WT	NO	<i>CTNNB1</i>	c.121A>G	p.Thr41Ala	60,3	1354
WT	22	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-
WT	23	AD1	AT	5	MSS	MMR+	-	-	-	-	-	-	-
WT	24	AD1	ATDBG	2	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4831C>G	p.Gln1611Glu	42,5	3687
		AD2	ATDBG	2	MSS	MMR+	MUT	NO	<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu	11,0	9681
WT	26	AD1	ATDBG	>10	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.3899_3900delAT	p.Thr1301Profs*13	20,6	7754
									<i>PDGFRA</i>	c.2478delG	p.Ala827Hisfs*6	5,6	3177
									<i>SMAD4</i>	c.1578A>G	p.=Glu526=	5,6	1618
<i>BMB4</i> (Clase 3)	27	AD1	ATDBG	<10	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.3908delA	p.Ile1304*	63,0	14737
<i>ENG</i> (Clase 3)	29	AD1	ATDBG	3-10	-	-	-	-	<i>PIK3CA</i>	c.319A>T	p.Asn107Tyr	4,4	5012
		AD2	ATDBG	6	MSS	MMR+	WT	NO	<i>CTNNB1</i>	c.134C>T	p.Ser45Phe	15,5	1122
									<i>KRAS</i>	c.335T>C	p.Val112Ala	3,6	773
WT	32	AD1	AT	5	MSS	MMR+	-	-	-	-	-	-	-
<i>APC</i> (Clase 3)	34	AD1	ATDBG	8	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4189G>T	p.Glu1397*	26,1	5338
		AD2	ATDBG	6	MSS	MMR+	WT	NO	<i>CTNNB1</i>	c.134C>T	p.Ser45Phe	32,0	1467
<i>MUTYH</i> Bialélico	35	AD1	ATDBG	5	MSS	MMR+	WT	NO	<i>TP53</i>	c.859G>T	p.Glu287*	19,1	1904
									<i>MAP2K1</i>	c.171G>T	p.Lys57Asn	16,8	4329
									<i>APC</i>	c.4479_4480delGGinsAT	p.Glu1494*	18,3	9853
		AD2	ATDBG	8	-	-	-	-	<i>KRAS</i>	c.37G>T	p.Gly13Cys	6,7	2775

RES Germinal	PACIENTE	MUESTRA	HIST	Tamaño (mm)	RES MSI	IHQ MMR	BRAF	MET MLH1	RES TST26					
									GEN	HGVSc	HGVSp	FA (%)	RD	
									APC	c.2626C>T	p.Arg876*	6,8	7904	
									APC	c.4230C>A	p.Cys1410*	7,6	9566	
WT	36	AD1	AI	-	-	-	-	-	APC	c.3388delT	p.Cys1130Valfs*35	25,5	855	
		AC1	ATVM-H1	5-20	MSS	MMR+	WT	NO	KRAS	c.35G>A	p.Gly12Asp	28,0	4062	
MUTYH Monoalélico	37	AD1	ATVDAG	10	MSS	MMR+	WT	NO	APC	c.3955delC	p.Pro1319Leufs*2	15,7	10802	
									TP53	c.524G>A	p.Arg175His	11,5	4362	
MUTYH Monoalélico	38	AD1	AVDBG	14-15	MSS	MMR+	WT	NO	MAP2K1	c.171G>T	p.Lys57Asn	4,6	2895	
		AD2	ATDBG	<8	-	-	-	-	APC	c.4233delT	p.Ser1411Argfs*4	37,1	16994	
WT	39	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-	
WT	40	AD1	AT	5	MSS	MMR+	-	-	-	-	-	-	-	
WT	42	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-	
APC (Clase 5)	45	AD1	ATVDBG	5	-	-	-	-	APC	c.4307delG	p.Ser1436Ilefs*37	7,7	12863	
									APC	c.4660_4661insA	p.Thr1556Asnfs*3	17,6	10759	
									KRAS	c.34G>T	p.Gly12Cys	8,3	4480	
		AD2	ATVDBG	10	MSS	MMR+	WT	NO	FBXW7	c.1394G>A	p.Arg465His	9,8	7939	
									FBXW7	c.1973G>A	p.Arg658Gln	13,5	1308	
									KRAS	c.35G>T	p.Gly12Val	7,5	2537	
								TP53	c.1121dupG	p.Gln375Serfs*7	3,0	4324		
APC (Mosaico)	47	AD1	ATDBG	10	MSS	MMR+	WT	NO	PIK3CA	c.3170G>A	p.Trp1057*	3,4	3531	
									KRAS	c.436G>A	p.Ala146Thr	24,0	12165	
									KRAS	c.35G>A	p.Gly12Asp	26,6	1927	
									PIK3CA	c.1633G>A	p.Glu545Lys	7,3	5675	
									SMAD4	c.1067C>T	p.Pro356Leu	13,9	1979	
									PIK3CA	c.3140A>G	p.His1047Arg	10,7	5073	
									MET	c.1668G>A	p.Trp556*	4,2	1244	
		TP53	c.586C>T	p.Arg196*	11,0	1192								
		AC1	AVM-H0	25	-	-	-	-	-	KRAS	c.35G>A	p.Gly12Asp	37,9	2145
										PIK3CA	c.1636C>A	p.Gln546Lys	3,7	3502
										PIK3CA	c.1633G>A	p.Glu545Lys	16,9	3526
										PTEN	c.113C>T	p.Pro38Leu	3,1	3485
										SMAD4	c.1067C>T	p.Pro356Leu	10,4	1948
SMAD4	c.1057T>C									p.Tyr353His	3,3	3001		

RES Germinal	PACIENTE	MUESTRA	HIST	Tamaño (mm)	RES MSI	IHQ MMR	BRAF	MET MLH1	RES TST26				
									GEN	HGVSc	HGVSp	FA (%)	RD
WT	48	AD1	ATDBG	5	-	-	-	-	<i>FBXW7</i>	c.1275G>A	p.Trp425*	4,2	6189
									<i>KIT</i>	c.1934G>A	p.Ser645Asn	12,1	6189
									<i>PIK3CA</i>	c.506C>T	p.Pro169Leu	5,6	6248
									<i>MET</i>	c.723C>T	p.Phe241=	5,1	17679
									<i>MET</i>	c.3477C>T	p.Tyr1159=	4,2	3044
<i>BMPRIA</i> + <i>MSH6</i> (Clases 3)	49	AD1	ATVDBG	14	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4262_4263delGT	p.Ser1421Argfs*5	7,9	9849
									<i>APC</i>	c.2623A>T	p.Lys875*	14,9	8932
									<i>APC</i>	c.3922A>T	p.Lys1308*	12,0	11842
									<i>APC</i>	c.4668_4669delTA	p.Ile1557*	16,5	8635
									<i>KRAS</i>	c.35G>T	p.Gly12Val	27,4	1575
WT	50	AD1	ATVDBG	2-5	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4189G>T	p.Glu1397*	11,5	6092
		AD2	ATDBG	2-4	MSS	MMR+	WT	NO	<i>CDHI</i>	c.1896C>T	p.His632=	8,2	5455
WT	54	AD1	ATDBG	10	MSS	MMR+	WT	NO	<i>KRAS</i>	c.38G>A	p.Gly13Asp	26,8	1567
									<i>APC</i>	c.3386T>C	p.Leu1129Ser	44,5	2368
									<i>APC</i>	c.4280_4283delCTGG	p.Pro1427Hisfs*45	12,4	9680
<i>AXIN2</i> (Clase 3)	55	AD1	ATDBG	5	MSS	MMR+	WT	NO	<i>TP53</i>	c.733G>A	p.Gly245Ser	3,5	12530
									<i>APC</i>	c.2626C>T	p.Arg876*	4,8	7339
									<i>ALK</i>	c.3559C>T	p.Leu1187=	3,3	738
									<i>APC</i>	c.4348C>T	p.Arg1450*	4,7	7318
									<i>TP53</i>	c.651G>A	p.Val217=	4,1	1600
WT	57	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4189G>T	p.Glu1397*	4,4	7067
									<i>APC</i>	c.4660_4661insA	p.Thr1556Asnfs*3	6,2	11427
WT	59	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-
<i>MUTYH</i> Homocigoto (clase 3)	61	AD1	ATDBG	3	MSS	MMR+	WT	NO	<i>CDHI</i>	c.1885_1886insA	p.Leu630Thrfs*33	7,2	7637
									<i>NRAS</i>	c.360G>A	p.Leu120=	50,6	5662
									<i>CTNNB1</i>	c.121A>G	p.Thr41Ala	12,1	2033
WT	63	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO					
WT	64	AD1	ATVDBG	8	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4317delT	p.Pro1440Hisfs*33	3,8	16715
									<i>CTNNB1</i>	c.121A>G	p.Thr41Ala	5,8	1889
		AD2	ATDAG	30	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.3902delC	p.Leu1302Cysfs*3	25,9	11594
WT	66	AD1	ATDBG	7	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4738delA	p.Ile1580Phefs*70	6,2	3946
WT									<i>APC</i>	c.3786T>C	p.Tyr1262=	58,3	9717

RES Germinal	PACIENTE	MUESTRA	HIST	Tamaño (mm)	RES MSI	IHQ MMR	BRAF	MET MLH1	RES TST26				
									GEN	HGVSc	HGVSp	FA (%)	RD
									<i>APC</i>	c.3815C>G	p.Ser1272*	26,5	12263
									<i>APC</i>	c.4348C>T	p.Arg1450*	28,7	13971
		AD2	ATDBG	4	MSS	MMR+	WT	NO	<i>KRAS</i>	c.35G>T	p.Gly12Val	14,6	302
	<i>APC</i>								c.3786T>C	p.Tyr1262=	49,6	7436	
	<i>APC</i>								c.4348C>T	p.Arg1450*	27,9	14357	
	<i>APC</i>								c.4831C>G	p.Gln1611Glu	15,8	4789	
WT	67	AD1	ATDBG	3	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4831C>G	p.Gln1611Glu	15,8	4789
<i>MLH1</i> (Clase 1)	70	AD1	ATVDBG	2-5	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.3964G>T	p.Glu1322*	25,8	11652
WT	71	AD1	ATVDAG	8	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4270delC	p.Pro1424Glnfs*49	3,2	6978
		AD2	ATDBG	<10	-	-	-	-	<i>FBXW7</i>	c.1393C>T	p.Arg465Cys	5,1	5582
WT	72	AD1	ATDBG	10	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4321delC	p.Pro1441Hisfs*32	19,6	18209
									<i>APC</i>	c.2626C>T	p.Arg876*	7,3	6211
WT	73	AD1	AT	5	MSS	-	-	-	<i>APC</i>	c.3922A>T	p.Lys1308*	7,7	10094
<i>NTHL1</i> monoalélico (Clase 3)	75	AD1	ATDBG	10	MSI-L	MLH1/ PMS2-	MUT	MET	<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu	13,0	2456
		AD2	ATDBG	3-7	-	-	-	-	<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu	11,2	3920
WT	77	AD1	ATDBG	4	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4561_4562delGAinsTG	p.Glu1521*	20,5	6030
WT	78	AD1	ATDBG	5	MSS	MMR+	MUT	NO	<i>APC</i>	c.4233delT	p.Ser1411Argfs*4	8,2	10238
									<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu	5,2	1816
<i>AXIN2+MSH2</i> (Clases 3)	79	AD1	ATI	14	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4348C>T	p.Arg1450*	24,7	16402
WT	80	AC1	ATVM-H2	15	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.3964G>T	p.Glu1322*	9,5	12734
									<i>APC</i>	c.4216C>T	p.Gln1406*	8,7	11823
									<i>APC</i>	c.3963_3964insT	p.Glu1322*	9,5	12596
		AD2	ATDBG	<5	-	-	-	-	<i>TP53</i>	c.816_821delGCGTGT	p.Arg273_Val274del	3,1	2889
WT	81	AD1	ATDBG	4	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.3845C>G	p.Ser1282*	61,7	8886
									<i>APC</i>	c.2546_2547delAT	p.Asp849Glnfs*62	15,5	4752
<i>NTHL1</i> monoalélico (Clase 3)	82	AD1	ATDBG	3	MSS	MMR+	WT	NO	<i>KRAS</i>	c.35G>T	p.Gly12Val	7,7	4553
									<i>TP53</i>	c.725G>T	p.Cys242Phe	18,2	11102
									<i>APC</i>	c.3925G>T	p.Glu1309*	26,1	8791
									<i>KRAS</i>	c.38G>A	p.Gly13Asp	4,6	1404
									<i>KRAS</i>	c.35G>A	p.Gly12Asp	7,4	1405

RES Germinal	PACIENTE	MUESTRA	HIST	Tamaño (mm)	RES MSI	IHQ MMR	BRAF	MET MLH1	RES TST26				
									GEN	HGVSc	HGVSp	FA (%)	RD
		AD2	ATDBG	<9	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4348C>T	p.Arg1450*	23,0	7206
<i>POLE+NTHL1</i> (Clases 5)	83	AD5	ATDBG	<9	-	-	-	-	<i>CTNNB1</i>	c.134C>T	p.Ser45Phe	12,9	788
									<i>APC</i>	c.4348C>T	p.Arg1450*	5,7	7581
									<i>APC</i>	c.4381G>T	p.Glu1461*	6,6	3785
									<i>APC</i>	c.3916G>T	p.Glu1306*	24,6	10442
		AC1	ATVM-H0	10	MSS	MMR+	WT	NO	<i>NRAS</i>	c.38G>A	p.Gly13Asp	3,3	4323
									<i>APC</i>	c.2626C>T	p.Arg876*	7,1	7034
		AD1	ATDBG	2	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.3926delA	p.Lys1310Argfs*11	16,3	9601
									<i>APC</i>	c.3924_3925delAG	p.Glu1309Lysfs*5	8,2	9199
									<i>APC</i>	c.3916G>T	p.Glu1306*	34,7	15728
									<i>APC</i>	c.2626C>T	p.Arg876*	3,3	7105
AD4	ATDBG	2	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.3926delA	p.Lys1310Argfs*11	9,8	18460		
							<i>APC</i>	c.3924_3925delAG	p.Glu1309Lysfs*5	3,6	17868		
							<i>BRAF</i>	c.1397G>T	p.Gly466Val	18,6	3865		
WT	88	AD1	ATDBG	10	MSS	MMR+	MUT	NO	<i>APC</i>	c.3386T>C	p.Leu1129Ser	40,0	3162
									<i>APC</i>	c.4385_4386delAG	p.Ser1465Trpfs*3	22,3	6424
<i>MUTYH</i> Bialélico (Clase 5)	89	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	<i>KRAS</i>	c.34G>T	p.Gly12Cys	4,5	12995
WT		AD2	AT	2	-	-	-	-	<i>KRAS</i>	c.34G>T	p.Gly12Cys	3,5	3769
WT	95	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-
<i>POLD1</i> UTR5'	96	AC1	ATVM-H4 ATVM-H4	10	MSS	MMR+	WT	NO	<i>KRAS</i>	c.35G>A	p.Gly12Asp	3,4	1937
									<i>PIK3CA</i>	c.1637A>G	p.Gln546Arg	3,1	4654
									<i>TP53</i>	c.725G>T	p.Cys242Phe	4,5	12995
									<i>TP53</i>	c.818G>A	p.Arg273His	3,5	3769
WT	97	AD1	AT	5	MSS	MMR+	-	-	-	-	-	-	-
<i>MUTYH</i> (Monoalélico) + <i>MSH2</i> (Clase 2)	99	AD1	ATDBG	11	MSS	MMR+	WT	NO	<i>KRAS</i>	c.34G>A	p.Gly12Ser	45,6	3688
									<i>APC</i>	c.4348C>T	p.Arg1450*	35,7	14453
									<i>FBXW7</i>	c.1436G>A	p.Arg479Gln	35,5	7083
WT	100	AD1	AT	5	MSS	MMR+	-	-					
WT	101	AD1	ATVM-H3+HP	20	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.3957_3958delTG	p.Val1320Glufs*11	4,9	8076
<i>MSH4</i> (Clase 3)	104	AD1	ATDBG	9	MSS	MMR+	WT	NO	<i>KRAS</i>	c.35G>A	p.Gly12Asp	13,0	2050
									<i>KRAS</i>	c.112-5C>T		50,2	5889

RES Germinal	PACIENTE	MUESTRA	HIST	Tamaño (mm)	RES MSI	IHQ MMR	BRAF	MET MLH1	RES TST26				
									GEN	HGVSc	HGVSp	FA (%)	RD
WT	105	AC1	AC	10	MSS	MMR+	-	-	-	-	-	-	-
<i>MSH4</i> (Clase 3)	106	AC1	AC	10	MSS	MMR+	-	-	-	-	-	-	-
<i>GALNT12</i> (Clase 1)	107	AD1	ATDBG	10	MSS	MMR+	WT	NO	<i>TP53</i>	c.638G>A	p.Arg213Gln	34,5	8156
									<i>TP53</i>	c.838A>G	p.Arg280Gly	16,5	1728
									<i>APC</i>	c.3922A>T	p.Lys1308*	56,7	14351
<i>POLD1</i> UTR5'	108	AD1	ATDBG	<9	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.3922A>T	p.Lys1308*	22,5	11100
WT	109	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-
<i>BMP4</i> (Clase 3)	110	AD1	ATDBG	3	-	-	-	-	<i>KRAS</i>	c.38G>A	p.Gly13Asp	9,6	2774
									<i>APC</i>	c.4348C>T	p.Arg1450*	16,5	8847
									<i>PIK3CA</i>	c.363C>T	p.Ile121=	35,4	3674
		AD2	ATDBG	10	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.3707_3708delCA	p.Gln1237Glufs*2	3,4	8736
									<i>PIK3CA</i>	c.363C>T	p.Ile121=	34,0	3575
<i>APC</i>	c.4348C>T	p.Arg1450*	8,0	9903									
<i>BMP4</i> (Clase 3)	111	AD1	AT	5	MSS	MMR+	WT	NO	-	-	-	-	-
WT	112	AD1	AT	5	MSS	MMR+	-	-	-	-	-	-	-
<i>POLD1</i>	116	AD1	ATDBG	3	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4285C>T	p.Gln1429*	34,7	14551
									<i>KRAS</i>	c.35G>A	p.Gly12Asp	32,9	1544
									<i>SMAD4</i>	c.1610A>G	p.Asp537Gly	16,6	7689
		AD2	ATDBG	5	MSS	MMR+	MUT	NO	<i>KRAS</i>	c.35G>T	p.Gly12Val	9,2	2596
<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu	4,0	8501									
<i>POLD1</i> (Clase 1)	118	AD1	ATDBG	2	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4318delC	p.Pro1440Hisfs*33	8,8	9363
		AD2	ATDBG	8	MSS	MMR+	WT	NO	<i>CTNNB1</i>	c.14-4A>G	-	17,6	5060
<i>POLE</i> UTR5'	119	AD2	ATVDMG	30	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4216C>T	p.Gln1406*	36,0	10036
WT	121	AD1	ATDBG	4	MSS	MMR+	WT	NO	<i>APC</i>	c.4348C>T	p.Arg1450*	7,5	10592
		AD2	ATDBG	7	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4385_4386delAG	p.Ser1465Trpfs*3	8,7	5356
									<i>APC</i>	c.4345delA	p.Lys1449Serfs*24	7,8	11487
<i>MSH4</i> (Clase 3)	122	AD1	ATDMG	10	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4304delG	p.Arg1435Lysfs*38	11,9	6693
									<i>FBXW7</i>	c.1920C>T	p.Ser640=	3,4	7123
									<i>PIK3CA</i>	c.322C>T	p.Arg108Cys	8,8	2049

RES Germinal	PACIENTE	MUESTRA	HIST	Tamaño (mm)	RES MSI	IHQ MMR	BRAF	MET MLH1	RES TST26				
									GEN	HGVSc	HGVSp	FA (%)	RD
		AD2	AS	5	MSS	MMR+	MUT	NO	<i>KRAS</i>	c.38G>A	p.Gly13Asp	5,3	3759
									<i>BRAF</i>	c.1411G>T	p.Val471Phe	5,8	4565
WT	150	AD1	ATDMG	3	MSS	MMR+	WT	NO	<i>FBXW7</i>	c.1832G>A	p.Gly611Glu	12,0	25044
									<i>TP53</i>	c.209C>T	p.Ala70Val	3,8	789
WT	162	AD1	ATVDBG	20	MSS	MMR+	MUT	NO	<i>APC</i>	c.4617_4618delAG	p.Glu1540Alafs*3	26,6	5430
									<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu	29,6	7209
									<i>CDHI</i>	c.1774G>A	p.Ala592Thr	45,3	4019
<i>BMPRIA</i> (Clase 3)	163	AD1	ATDBG	>10	MSS	MMR+	MUT	NO	<i>APC</i>	c.4326T>A	p.Pro1442=	3,7	11724
									<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu	21,0	7613
<i>GALNT12</i> (Clase 1)+ <i>MSH4</i> (Clase 3)	164	AC1	ACEIP-H4	17	-	-	-	-	<i>APC</i>	c.4216C>T	p.Gln1406*	40,3	13924
		AD1	ATDBG	<10	MSS	MMR+	WT	NO	<i>KRAS</i>	c.38G>A	p.Gly13Asp	3,8	1716
WT	165	AD1	AT	5	MSS	MMR+	-	-	<i>CTNNB1</i>	c.134C>T	p.Ser45Phe	35,9	1231
									-	-	-	-	-

Secuencias de referencia: *APC*: NM_000038.5,NP_000029.2; *BRAF*: NM_004333.4,NP_004324.2; *CDHI*: NM_004360.3,NP_004351.1; *CTNNB1*: NM_001098210.1,NP_001091680.1; *FBXW7*: NM_033632.3,NP_361014.1; *KIT*: NM_000222.2,NP_000213.1; *KRAS*: NM_033360.2,NP_203524.1; *MAP2K1*: NM_002755.3,NP_002746.1; *MET*: NM_001127500.1,NP_001120972.1; *NRAS*: NM_002524.4,NP_002515.1; *PDGFRA*: NM_006206.4,NP_006197.1; *PIK3CA*: NM_006218.2,NP_006209.2; *PTEN*: NM_000314.4,NP_000305.3; *TP53*: NM_000546.5,NP_000537.3; *SMAD4*: NM_005359.5,NP_005350.1.

Anexo 11. Resumen de las muestras analizadas para la confirmación de mosaicos en el gen APC. AVM=Adenoma veloso malignizado, AT=Adenoma tubular, ATV=Adenoma túbulo-veloso, HP=Pólipo hiperplásico, TN=Tejido normal, S=Sangre periférica.

PACIENTE	VARIANTE (HGVS)	BIOTIPO	MUESTRA	HISTOLOGÍA	FA (%)	MOSAICO
PAAX-47	c.4127_4128delAT p.(Tyr1376Cysfs*9)	<i>Frameshift</i>	47-1	AVM	41,5	SI
			47-3	AT	nd	
			47-4	AT	24,2	
			47-5	AT	17,6	
			47-6	ATV	40,9	
			47-7	HP	nd	
			47-8	AT	20,8	
			47-9	TN	nd	
			47-10	AT	1,3	
			47-11	AT	nd	
			47-S	S	nd	
PAAX-67	c.646-2A>T	<i>Splicing</i>	67-1	AT	0,9	NO
			67-2	AT	nd	
			67-3	AT	38,8	
			67-4	AT	nd	
			67-5	AT	20,6	
			67-6	AT	nd	
			67-7	TN	nd	
			67-8	TN	nd	
			67-S	S	nd	
PAAX-50	c.4156A>T p.(Arg1386*)	<i>Nonsense</i>	50-1	ATV	nd	NO
			50-2	HP	52	
			50-3	AT	nd	
			50-4	ATV	22,8	
			50-5	AT	nd	
			50-6	AT	nd	
			50-7	AT	nd	
			50-S	S	nd	
PAAX-66	c.4348C>T p.(Arg1450*)	<i>Nonsense</i>	66-1	AC	26,3	SI
			66-2	AT	31,7	
			66-4	TN	nd	
			66-5	AT	27,9	
			66-6	AT	28,7	
			66-7	AT	24,6	
			66-8	AT	14,8	
			66-9	TN	nd	
			66-S	S	nd	

RESEARCH ARTICLE

Role of *GALNT12* in the genetic predisposition to attenuated adenomatous polyposis syndrome

Víctor Lorca¹, Daniel Rueda², Lorena Martín-Morales¹, Carmen Poves³, María Jesús Fernández-Aceñero⁴, Clara Ruiz-Ponte⁵, Patricia Llovet¹, David Marrupe⁶, Vanesa García-Barberán¹, Beatriz García-Paredes⁷, Pedro Pérez-Segura⁷, Miguel de la Hoya¹, Eduardo Díaz-Rubio⁷, Trinidad Caldés¹, Pilar Garre¹*

1 Laboratorio de Oncología Molecular, CIBERONC, IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, **2** Laboratorio de Cáncer Hereditario, Servicio de Bioquímica, i+12, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, **3** Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, **4** Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, **5** Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX)-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica-USC, IDIS. Santiago de Compostela, Spain, **6** Servicio de Oncología Médica. Hospital de Móstoles. Madrid. Spain, **7** Servicio de Oncología Médica, CIBERONC, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

* pilar_garre@hotmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Lorca V, Rueda D, Martín-Morales L, Poves C, Fernández-Aceñero MJ, Ruiz-Ponte C, et al. (2017) Role of *GALNT12* in the genetic predisposition to attenuated adenomatous polyposis syndrome. PLoS ONE 12(11): e0187312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187312>

Editor: Peh Yean Cheah, Singapore General Hospital, SINGAPORE

Received: June 28, 2017

Accepted: October 17, 2017

Published: November 2, 2017

Copyright: © 2017 Lorca et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The present study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Spain (www.isciii.es) and European Regional Development FEDER funds: PI14/00929 to Pilar Garre, PI16/01292 to Trinidad Caldés and PI14/00230 to Clara Ruiz-Ponte. The funders had no role in study design, data collection and analysis,

Abstract

The involvement of *GALNT12* in colorectal carcinogenesis has been demonstrated but it is not clear to what extent it is implicated in familial CRC susceptibility. Partially inactivating variant, NM_024642.4:c.907G>A, p.(D303N), has been previously detected in familial CRC and proposed as the causative risk allele. Since phenotypes of the described carrier families showed not only CRC but also a polyp history, we hypothesized that *GALNT12* could be involved in adenoma predisposition and consequently, in hereditary polyposis CRC syndromes. For that purpose, we have screened the *GALNT12* gene in germline DNA from 183 unrelated attenuated polyposis patients. c.907G>A, p.(D303N) was detected in 4 cases (MAF = 1.1%) and no other candidate variants were found. After segregation studies, LOH analyses, glycosylation pattern tests and case-control studies, our results did not support the role of c.907G>A, p.(D303N) as a high-penetrance risk allele for polyposis CRC.

Introduction

Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 (*GALNT12*) is part of a large family of hexosyltransferases involved in the initial steps of mucin-type *O*-glycosylation process [1]. Alterations in the activity of these enzymes lead to aberrant glycosylation, which has been associated with alterations in cell growth, differentiation, transformation, adhesion, metastasis and immune surveillance in cancers [2]. Particularly, *GALNT12* is highly expressed in the digestive tract [1] and it is frequently downregulated in colorectal cancer (CRC) [3].

Evidence on the association between *GALNT12* (MIM#610290) and colorectal carcinogenesis had been reported when 6 fully and 1 partially inactivating variants were detected in heterozygosis in the germline DNA of CRC patients, while no inactivating variants were detected in

decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

a cohort of cancer-free controls older than 70 [4]. Tumors from the 6 fully inactivating mutation carriers showed aberrant glycosylation patterns of MUC1, main target of GALNT12 in the digestive tract, providing evidence of their involvement in CRC carcinogenesis. However, the variant NM_024642.4:c.907G>A, p.(D303N), which showed a partial activity of 37% compared to the wild type protein was not tested, leaving its role in the genesis of CRC unclear. Later on, c.907G>A, p.(D303N) was detected in three families fulfilling the Bethesda clinical criteria for the identification of individuals at risk for Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) along with a high polyp burden [5]. Authors proposed inactivating GALNT12 alleles, in particular, c.907G>A, p.(D303N), as high-predisposition risk alleles which could explain part of the missing heritability of familial CRC. Recently, no functionally relevant mutations at the GALNT12 locus were detected in a cohort of CRC type X (families fulfilling the strict Amsterdam clinical criteria for the identification of HNPCC and displaying mismatch-proficient tumors), what discarded this gene as a major predisposition gene for HNPCC [6].

Adenomatous polyposis (AP) is characterized by the development of adenomas along the large intestine and rectum, conferring a high risk of CRC. Therefore, it is a CRC-predisposition syndrome whose risk of cancer depends on the severity of the polyposis. The attenuated forms of adenomatous polyposis (AAP) constitute a large and heterogeneous group in terms of polyposis severity, family history, and genetic predisposition. Around 20% of AAP can be explained by germline mutations in well-known high-penetrance predisposition genes, such as APC and MUTYH [7] or the newly described POLE [8], POLD1 [8], NTHL1 [9] and MSH3 [10]. Nevertheless, the vast majority is still not explained, pointing to the involvement of other unknown high-predisposition genes, polygenic inheritance consisting in the additive effect of low-predisposition alleles or environmental factors.

Given that inactivating GALNT12 variants were detected in Bethesda families with a high polyp burden [5], we hypothesized that GALNT12 could account for part of the unexplained AAP susceptibility. Therefore, our aim is to contribute to the clarification of the role of GALNT12 in the predisposition to familial polyposis CRC through the screening and characterization of GALNT12 mutations in an unexplained AAP cohort.

Material and methods

Study cohort

Inclusion criteria were more than 20 accumulated or 10 synchronic adenomas regardless of age or more than 10 adenomas before the age of 70. Previous detection of candidate variants in any known CRC predisposition gene was established as exclusion criteria.

Germline DNAs from a total of 183 unrelated polyposis cases were included in the study; 127 subjects from Hospital Clínico San Carlos (Madrid), 37 from Hospital 12 de Octubre (Madrid) and 19 from Grupo de Medicina Xenomica-USC (Galicia). Ethical approval was obtained from Hospital Clínico San Carlos' Ethical Research Committee (approval number: C:P:-14/241-E_BS). A written informed consent was obtained from each participant.

GALNT12 mutational screening

The first 164 samples (Madrid) were screened through an NGS Haloplex custom panel (Agilent Technologies, U.S.) of 22 CRC-related predisposition genes sequenced in a MiSeq System (Illumina, U.S.) (Table 1). Data analysis and variant calling were performed with the SureCall software (Agilent Technologies, U.S.). Exome data provided by Grupo de Medicina Xenomica-USC (Galicia) was used to screen for GALNT12 variants in the remaining 19 samples. The exome

Table 1. List of CRC predisposition genes included in the NGS custom panel.

GENE	TARGET COVERAGE	GENE	TARGET COVERAGE
APC	99.8%	MSH4	100%
AXIN2	99.7%	MSH6	99.98%
BMP4	100%	MUTYH	100%
BMPR1A	98.82%	NTHL1	100%
ENG	100%	PMS2	99.22%
GALNT12	100%	POLD1	100%
GREM1	100%	POLE	99.68%
MLH1	100%	PTEN	100%
MLH3	99.06%	SCG5	99.87%
MSH2	100%	SMAD4	100%
MSH3	100%	STK11	100%

All coding regions, intron-exon boundaries and UTR regions of the listed genes were included in the custom panel

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187312.t001>

enrichment system used was SureSelect Human All Exon v6 (Agilent Technologies) and sequencing was carried out in an Ion Proton System (Thermo Fisher Scientific, U.S.).

The filtering strategy is described in Fig 1. All rare (novel or MAF<0.01), deleterious or possibly deleterious variants (according to protein and/or splicing alteration prediction tools) were selected for validation by direct sequencing. MaxEnt and HSF [11] were used to predict splicing alterations and SIFT [12], Polyphen2 [13] and MutationTaster [14] to predict protein damage. *GALNT12* candidate variants have been submitted to ClinVar, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Segregation and LOH

Both loss of heterozygosity (LOH) in adenoma/tumor DNA and segregation analyses in the germline DNA of family members were achieved by direct sequencing.

FFPE-immunohistochemistry

Immunohistochemistry of total and unglycosylated MUC1 was performed on 5 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) matched normal and adenoma tissue sections. MUC1 (VU4H5) mouse monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, U.S.), which binds to the extracellular domain only if the threonine residue of the tandem repeat is not glycosylated, was used to specifically detect non-glycosylated MUC1. MUC1 (EMA, E29) mouse monoclonal antibody (DAKO, Thermo Fisher Scientific, U.S.), which reacts with the MUC1 cytoplasmic domain, was used to detect total MUC1. Detection was done with the Dako Omnis Staining System (DAKO) and slides were counterstained with hematoxylin. Two expert pathologists reviewed all the staining. Levels of staining were classified into 0, +, ++, +++ according to the antibody intensity.

Case-control study

Germline DNAs from 451 unrelated polyposis cases and 714 cancer-free controls were tested for c.907G>A, p.(D303N) by TaqMan genotyping assays (Thermo Fisher Scientific, U.S.). Data from the 1000 Genomes Project [15], Exome Variant Server [16] and Exome Aggregation Consortium [17] was also used to check the association of c.907G>A, p.(D303N) with the AAP cohort. Fisher's exact test was used to assess differences in the allelic distribution between

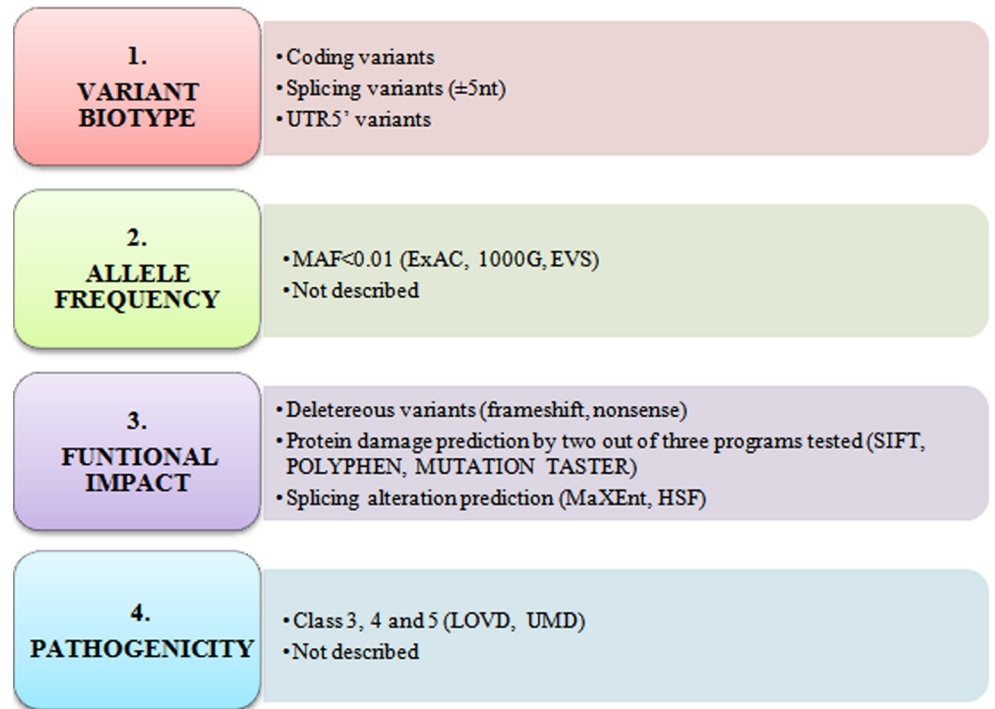


Fig 1. Filtering strategy for the detection of candidate variants.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187312.g001>

cohorts and CaTS [18] to estimate the statistical power. A p value of 0.05 was considered statistically significant.

Results and discussion

Summary of the clinicopathological characteristics of the study and validation cohorts are shown in Table 2.

Germline DNAs from 183 AAP patients (Table 2) were screened for mutations in the *GALNT12* gene. Identified variants are shown in S1 Table. After applying our filtering strategy (Fig 1) only 4 cases were found to harbor the *GALNT12* variant c.907G>A, p.(D303N) and no other candidate *GALNT12* variants were detected (S1 Table). c.907G>A, p.(D303N) carriers were all screened by the 22-gene NGS panel, therefore carrier data from the remaining genes

Table 2. Clinicopathological characteristics of study cohorts.

	AAP COHORT	VALIDATION COHORT
N	183	268
Dx Age; average(range)	61 (32–79)	64.3 (30–85)
N adenoma; average (range)	30 (10–100)	20 (10–150)
Hyperplastic polyps	87 (47.5%)	60 (22.5%)
Full-blown AAP ^a	140 (76.5%)	164 (61.2%)
CRC	49 (26.7%)	78 (29.1%)

^aFull-blown polyposis = subjects with more than 20 adenomas or 10 synchronic adenomas. The remaining subjects presented between 10–20 adenomas.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187312.t002>

Table 3. Clinical characteristics of c.907G>A, p.(D303N) carriers.

Family	Id	Inclusion criteria	Dx age ^a	No. of adenomas	Cancer	
					type	age
PAX1	I:1	20A ^b	71	>50	no	
PAX2	I:1	10SA ^c	80	12	no	
PAX3	I:1	20A ^b	50	>30	no	
PAX4	I:1	20A ^b	78	37	CRC/renal	78/76

^aDx age: age at diagnosis of polyposis.

^b20A = more than 20 adenomas

^c10SA = 10 synchronous adenomas.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187312.t003>

was reviewed and filtered according to the same strategy, and no other candidate variants were found in any other CRC susceptibility gene (S2 Table). All probands harboring c.907G>A (p. D303N) presented full-blown late-onset AAP, and all of them had both adenoma and CRC family history (Table 3).

Looking at public genome databases, c.907G>A, p.(D303N) is a rare allele present in less than 0.3% of all tested populations, which makes a statistical difference with respect to the polyposis study cohort (Table 4). Moreover, as it has been mentioned above, c.907G>A, p.(D303N) had been previously described in CRC patients, functional characterization of the encoded protein showed a partial activity of 37% when compared with the wild type protein [4] and co-segregation with CRC and polyps was also described in families fulfilling the Bethesda clinical criteria [5]. Together, all this data suggest that the c.907G>A, p.(D303N) variant could be a quite good high-predisposition candidate allele for unexplained AAP. Therefore, subsequent tests were performed in order to shed light on the polyposis causality of the c.907G>A, p.(D303N) variant. For this purpose, segregation and LOH analyses, glycosylation pattern tests and case-control studies were achieved.

Table 4. c.907G>A, p.(D303N) allelic population frequencies and association analysis.

POPULATION	N	ALT ^g	REF ^h	MAF	p-value	OR
AAP ^a	183	4	362	0,011		
1000G ^b	503	3	1003	0.003	0.087	3.69
EVS ^c	4300	1	8589	0.001	0.003	8.63
ExAC ^d	31072	122	62022	0.002	0.007	5.62
HCSC ^e	714	4	1424	0.003	0.059	3.93
VAL ^f	268	0	536	0		
HCSC	714	4	1424	0.003	0.41	0.2950
AAP+VAL	451	4	898	0,004		
HCSC	714	4	1424	0.003	0.496	1.59

^aAAP = attenuated adenomatous polyposis study cohort.

^b1000G = European population from the 1000 Genomes database.

^cEVS = European-American population from the Exome Variant Server.

^dExAC = Non-Finnish European population from the Exome Aggregation Consortium database.

^eHCSC = cancer-free control population recruited at Hospital Clínico San Carlos (Madrid).

^fVAL = validation cohort.

^gALT = altered allele count

^hREF = reference allele count.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187312.t004>

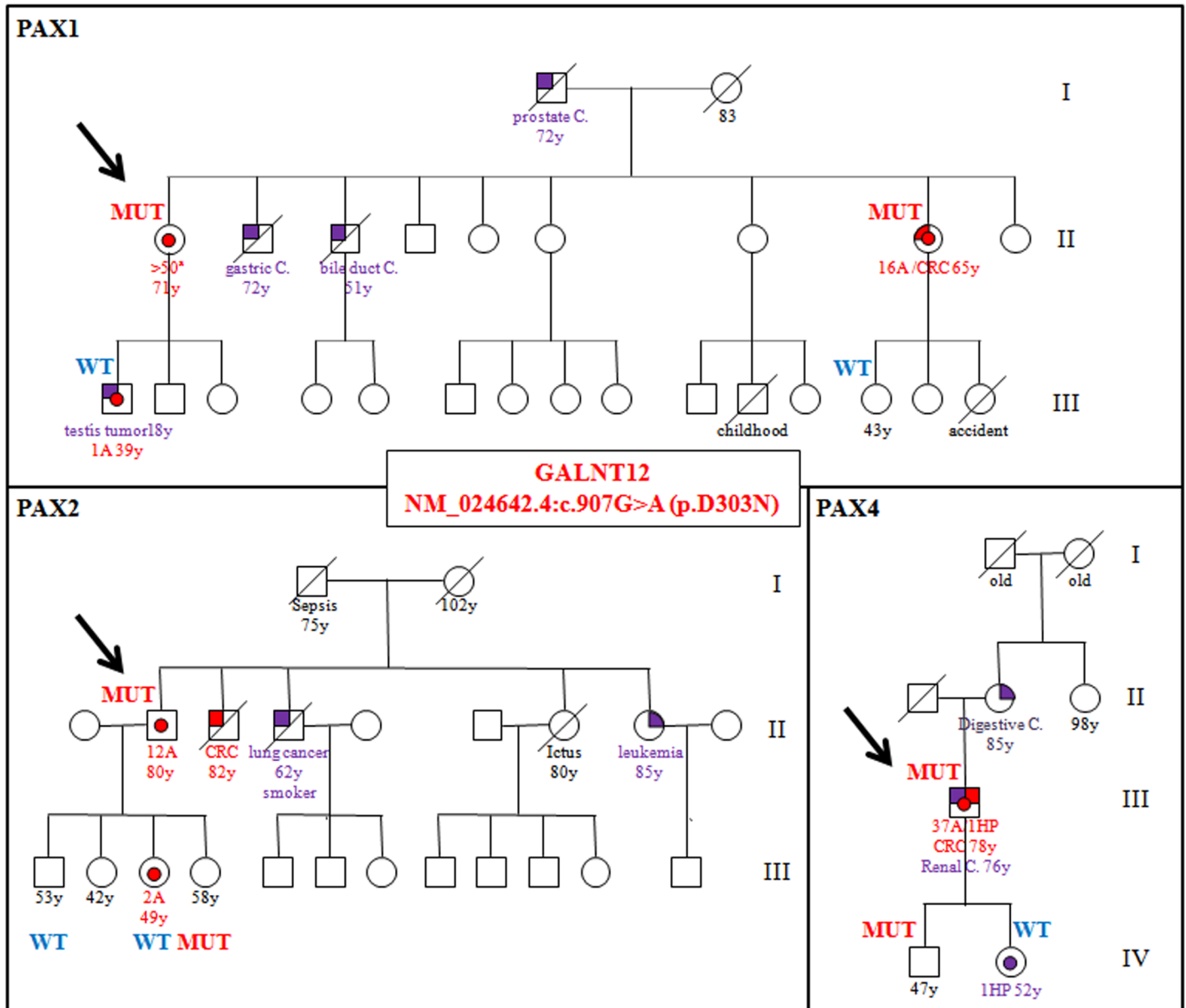


Fig 2. Pedigrees of families harboring c.907G>A (p.D303N) and segregation analysis. Proband is marked with arrows. MUT = individual carrying the c.907G>A (p.D303N) allele. WT = individual not carrying the c.907G>A, p.(D303N) allele. CRC = colorectal cancer. y = age at diagnosis or age at the time of DNA extraction (in healthy subjects).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187312.g002>

First, the variant was tested in the germline DNA of those relatives who had agreed to participate in the study. None of the three families tested for segregation showed a clear high-penetrance allele segregation pattern (Fig 2). There was only one relative with polyposis diagnosis (pedigree PAX1_II:8) and she harbored the variant. In pedigrees PAX1 and PAX2, there were two relatives with a diagnosis of adenomas and they didn't harbor the variant. Conversely, two relatives in pedigrees PAX2 and PAX4 harbored the variant and they didn't show any adenoma at the ages of 58 and 47.

Since all probands showed late-onset AAP and most of the healthy relatives tested were in their forties, carriers who had not developed polyposis could still develop it at later ages.

Table 5. Adenomas tested for LOH and MUC1 IHC.

Family	Patient	Adenoma	Histology	LOH	IHC-N ^a	IHC-T ^b
PAX1	I:1	12B3204	Low-grade tubulovillous adenoma	NO	++/+++	++/+++
		13B12094	Low-grade tubular adenoma	NO	++/+++	++/+++
PAX2	I:1	9B66481	High-grade tubular adenoma	NO	++/+++	++/+++
		9B66483	Low-grade tubular adenoma	NO	++/+++	++/+++
PAX3	I:1	16B23342	High-grade tubular adenoma	NO	++/+++	++/+++
		15B10052	Adenocarcinoma Haggitt 4	NO		

^aIHC-N = IHC evaluation for matched-normal tissues (ratio between non-glycosylated MUC1 and total MUC1 levels)

^bIHC-T = Immunohistochemistry evaluation for matched-adenomatous tissue (ratio between non-glycosylated MUC1 and total MUC1 levels).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187312.t005>

However, it is noteworthy that 2 relatives had already developed some adenomas at younger ages (Fig 2: PAX1_III:1 and PAX2_III:3) and none of them harbored the c.907G>A (p.D303N) variant. Described frequencies of adenomas in populations ranging from 40 to 50 years is around 4% [19, 20] so these cases could be explained as phenocopy phenomena, but within a context of suspected polyposis genetic predisposition we would not expect to have many cases of adenomas at early ages that are not explained by the putative polyposis susceptibility cause. Clarke et al. also observed similar results in two Bethesda families harboring the variant [5]. They observed two polyp cases and one CRC in which the variant was not detected. Therefore, considering both studies, co-segregation results are inconclusive.

Guda et al. [4] suggest that CRC associated GALNT12 complete inactivation alleles are most likely to act as simple null allele rather than dominant effect or oncogenic alleles. Consequently, LOH events were investigated in 3 low-grade dysplastic adenomas, 2 high-grade dysplastic adenomas and 1 CRC (Table 5). No LOH of the c.907G>A, p.(D303N) allele was detected in any of the samples. It was not possible, though, to achieve full GALNT12 somatic mutational screening and methylation analysis, so we cannot discard other somatic second hits at GALNT12 or haploinsufficiency mechanisms leading to the adenoma development. In any case, we would expect a decrease in GALNT12's activity and therefore to an increase in improperly glycosylated or unglycosylated proteins in carrier adenomas. In order to test this, two antibodies against both, total and unglycosylated forms of GALNT12's target protein MUC1, were tested to detect any change in the glycosylation pattern of the same 5 adenomas tested for LOH and their matched normal tissues similarly to Guda et al. [4]. Any alteration in the glycosylation activity would imply an increase in the amounts of unglycosylated but not total MUC1 levels. However, no differences were detected in any of the adenoma-normal tissue pairs (Table 5 and S1 Fig), ruling out the causality of this allele in the adenoma development.

Taken together, these results make us distrust c.907G>A, p.(D303N) as a high-predisposition allele for AAP. Nevertheless, due to the high association of the variant with the study cohort and in order to validate the previous results, a case-control study was conducted in a larger validation cohort with the same inclusion criteria (Table 2) and a home cancer-free control cohort. In this case, the statistical analysis did not detect significant differences on the c.907G>A, p.(D303N) allele frequency between cohorts (Table 4). The clinical information about the 4 controls harboring the c.907G>A, p.(D303N) allele was further investigated. Two of them died at old age without any personal or familial history of adenomas. One other control had two second-degree relatives with late onset CRC (>70), but underwent several colonoscopies with no adenomas detected. And the last one had a melanoma diagnosis at the age of 42.

It should be noted, though, that due to the low frequency of the variant in control populations, the sample size used in this analysis allow us to detect statistical significance with a minimum statistical power of 80% when the OR is greater than 4. Therefore, the case-control analysis discards the c.907G>A, p.(D303N) variant as a high-penetrance risk allele for AAP, but not as a low-penetrance allele. Our results discard the causality of c.907G>A, p.(D303N) in hereditary polyposis CRC syndromes but not the role of the variant as a modifier allele or its involvement in other forms of sporadic polyposis, which points to the necessity of larger sample sizes to be able to further confirm or discard the role of this variant as a low-penetrance allele.

These results, together with the absence of other functionally relevant *GALNT12* mutations in our cohort, discard *GALNT12* as a major high-predisposition gene for adenomatous polyposis. Considering that its major role as a high-predisposition allele for HNPCC had been previously discarded [6], its major role in hereditary CRC syndromes can be ruled out.

With the development of next-generation sequencing technologies and their integration in diagnosis laboratories, the screening of candidate high-predisposition genes that have been proposed, but not validated, is an attractive but very dangerous tool for the understanding of those unexplained familial cancer cases. Hence, the elucidation of cancer-risk candidate genes and variants becomes essential to avoid clinical misinterpretation of cancer risk estimations in carrier families. Here we show how an initially good high-risk candidate variant for polyposis predisposition is finally dismissed after complementary assays. Finally, the role of *GALNT12* as a major high-predisposition gene for inherited CRC is not confirmed, and the inclusion of *GALNT12* in the screening of high-penetrance alleles in unexplained familial CRC is discouraged.

Supporting information

S1 Table. *GALNT12* variants detected in the AAP population.

(PDF)

S2 Table. Rare variants in other CRC susceptibility genes detected in *GALNT12_c.907G>A, p.(D303N)* carriers.

(PDF)

S1 Fig. Unglycosylated and total MUC1 detection in the *GALNT12_c.907G>A, p.(D303N)* carrier adenomatous and normal matched tissues.

(PDF)

Acknowledgments

The authors thank participating families for their unconditional contribution. They also thank Isabel Díaz and Dr. Santiago Cabezas for their clinical support.

Author Contributions

Conceptualization: María Jesús Fernández-Aceñero, Trinidad Caldés, Pilar Garre.

Data curation: Víctor Lorca, Carmen Poves, María Jesús Fernández-Aceñero, Pedro Pérez-Segura, Pilar Garre.

Formal analysis: Víctor Lorca, Clara Ruiz-Ponte, Pilar Garre.

Funding acquisition: Clara Ruiz-Ponte, Trinidad Caldés, Pilar Garre.

Investigation: Víctor Lorca, Lorena Martín-Morales.

Methodology: Víctor Lorca, María Jesús Fernández-Aceñero, Patricia Llovet, Vanesa García-Barberán, Miguel de la Hoya, Pilar Garre.

Project administration: Pilar Garre.

Resources: Daniel Rueda, Carmen Poves, María Jesús Fernández-Aceñero, Clara Ruiz-Ponte, David Marrupe, Beatriz García-Paredes, Pedro Pérez-Segura.

Software: Víctor Lorca.

Supervision: Pilar Garre.

Validation: Daniel Rueda, Lorena Martín-Morales, Carmen Poves, Patricia Llovet.

Visualization: Pilar Garre.

Writing – original draft: Pilar Garre.

Writing – review & editing: Daniel Rueda, Lorena Martín-Morales, Miguel de la Hoya, Eduardo Díaz-Rubio, Trinidad Caldés.

References

1. Guo JM, Zhang Y, Cheng L, Iwasaki H, Wang H, Kubota T, et al. Molecular cloning and characterization of a novel member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, pp-GalNAc-T12. *FEBS Lett.* 2002; 524(1–3): 211–218. PMID: [12135769](#)
2. Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep.* 2006; 7(6): 599–604. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400705> PMID: [16741504](#)
3. Guo JM, Chen HL, Wang GM, Zhang YK, Narimatsu H. Expression of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-12 in gastric and colonic cancer cell lines and in human colorectal cancer. *Oncology.* 2004; 67(3–4): 271–276. <https://doi.org/10.1159/000081328> PMID: [15557789](#)
4. Guda K, Moinova H, He J, Jamison O, Ravi L, Natale L, et al. Inactivating germ-line and somatic mutations in polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 in human colon cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(31): 12921–12925. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901454106> PMID: [19617566](#)
5. Clarke E, Green RC, Green JS, Mahoney K, Parfrey PS, Younghusband HB, et al. Inherited deleterious variants in GALNT12 are associated with CRC susceptibility. *Hum Mutat.* 2012; 33(7): 1056–1058. <https://doi.org/10.1002/humu.22088> PMID: [22461326](#)
6. Segui N, Pineda M, Navarro M, Lazaro C, Brunet J, Infante M, et al. GALNT12 is not a major contributor of familial colorectal cancer type X. *Hum Mutat.* 2013; 35(1): 50–52. <https://doi.org/10.1002/humu.22454> PMID: [24115450](#)
7. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 2002; 30(2): 227–232. <https://doi.org/10.1038/ng828> PMID: [11818965](#)
8. Palles C, Cazier JB, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet.* 2013; 45(2): 136–144. <https://doi.org/10.1038/ng.2503> PMID: [23263490](#)
9. Weren RD, Ligtenberg MJ, Kets CM, de Voer RM, Verwiel ET, Spruijt L, et al. A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene NTHL1 causes adenomatous polyposis and colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015; 47(6): 668–671. <https://doi.org/10.1038/ng.3287> PMID: [25938944](#)
10. Adam R, Spier I, Zhao B, Kloth M, Marquez J, Hinrichsen I, et al. Exome Sequencing Identifies Biallelic MSH3 Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *Am J Hum Genet.* 2016; 99(2): 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.015> PMID: [27476653](#)
11. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(9): e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215> PMID: [19339519](#)
12. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009; 4(7): 1073–1081. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86> PMID: [19561590](#)
13. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010; 7(4): 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248> PMID: [20354512](#)

14. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014; 11(4): 361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890> PMID: [24681721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681721/)
15. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015; 526(7571): 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393> PMID: [26432245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26432245/)
16. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA.
17. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016; 536(7616): 285–291. <https://doi.org/10.1038/nature19057> PMID: [27535533](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27535533/)
18. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2006; 38(2): 209–213. <https://doi.org/10.1038/ng1706> PMID: [16415888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16415888/)
19. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *N Engl J Med*. 2002; 346(23): 1781–1785. <https://doi.org/10.1056/NEJM200206063462304> PMID: [12050337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12050337/)
20. Pendergrass CJ, Edelstein DL, Hylind LM, Phillips BT, Iacobuzio-Donahue C, Romans K, et al. Occurrence of colorectal adenomas in younger adults: an epidemiologic necropsy study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008; 6(9): 1011–1015. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.03.022> PMID: [18558514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18558514/)

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Contribution of New Adenomatous Polyposis Predisposition Genes in an Unexplained Attenuated Spanish Cohort by Multigene Panel Testing

Víctor Lorca¹, Daniel Rueda², Lorena Martín-Morales¹, María Jesús Fernández-Aceñero³, Judith Grolleman⁴, Carmen Poves⁵, Patricia Llovet¹, Sandra Tapial², Vanesa García-Barberán¹, Julián Sanz³, Pedro Pérez-Segura⁶, Richarda M. de Voer⁴, Eduardo Díaz-Rubio⁶, Miguel de la Hoya¹, Trinidad Caldés¹ & Pilar Garre¹

Attenuated adenomatous polyposis (AAP) is a heterogeneous syndrome in terms of clinical manifestations, heritability and etiology of the disease. Genetic heterogeneity and low penetrance alleles are probably the best explanation for this variability. Certainly, it is known that *APC* and *MUTYH* are high penetrance predisposition genes for adenomatous polyposis, but they only account for 5–10% of AAP. Other new predisposition genes, such as *POLE*, *POLD1*, *NTHL1*, *AXIN2* or *MSH3*, have been recently described and have been associated with AAP, but their relative contribution is still not well defined. In order to evaluate the genetic predisposition to AAP in a hospital based population, germline DNAs from 158 AAP subjects were screened for genetic variants in the coding regions and intron-exon boundaries of seven associated genes through a next-generation sequencing (NGS) custom gene panel. Splicing, segregation studies, somatic mutational screening and RNA quantitative expression assays were conducted for selected variants. In four of the probands the adenoma susceptibility could be explained by actionable mutations in *APC* or *MUTYH*, and one other patient was a double carrier of two truncating variants in both *POLE* and *NTHL1*. Furthermore, 16 additional patients harbored uncertain significance variants in the remaining tested genes. This report gives information about the contribution of the newly described adenomatous polyposis predisposition genes in a Spanish attenuated polyposis cohort. Our results highly support the convenience of NGS multigene panels for attenuated polyposis genetic screening and reveals *POLE* frameshift variants as a plausible susceptibility mechanism for AAP.

Attenuated adenomatous polyposis (AAP) is usually defined by the presence of more than 10 and less than 100 adenomas along the large intestine and/or rectum. It is a highly heterogeneous syndrome in terms of polyposis severity, family history, and lifetime risk of colorectal cancer (CRC)^{1–3}. Adenoma burden can be low or mild, it may be accompanied by hyperplastic or serrated polyps, the polyposis diagnosis age is variable and later than classical forms, and CRC risk can range from 40% to 80% depending on the adenoma burden. A positive family history is frequently absent, but horizontal or vertical inheritance patterns are also observed. The diffusion of early detection CRC screening programs, together with the improvement of colonoscopy techniques, has given rise to an increase in the detection of patients with multiple colorectal adenomas. These patients are referred to the onco-genetic counseling units for genetic testing in order to find an explanation to their adenoma susceptibility that

¹Laboratorio de Oncología Molecular, Hospital Clínico San Carlos, IdISSC, CIBERONC, Madrid, Spain. ²Laboratorio de Cáncer Hereditario, Servicio de Bioquímica, i + 12, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain. ³Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain. ⁴Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands. ⁵Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain. ⁶Servicio de Oncología Médica, Hospital Clínico San Carlos, CIBERONC, Madrid, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.G. (email: pilar_garre@hotmail.com)

	AAP COHORT
N	158
% males (n)	73.4 (116)
Dx Age; average (range)	62.9 (33–80)
N adenoma; average (range)	31.2 (10–100)
% hyperplastic polyp detection (n)	44.3 (70)
% dominant inheritance pattern (n)	22.2 (35)
% recessive inheritance pattern (n)	30.4 (48)
% isolated case (n)	47.5 (75)
% full-blown AAP [†] (n)	83.5 (132)

Table 1. Clinicopathological characteristics of the study cohort. [†]Full-blown AAP = subjects with more than 20 adenomas or 10 synchronous adenomas.

helps in the understanding of the disease and makes possible a satisfactory genetic counseling. Nowadays, *APC* (MIM *611731) and *MUTYH* (MIM *604933) are the two main clinical actionable predisposition genes for adenomatous polyposis³. That means prevalence and cancer risk estimations are well-defined, allowing an accurate genetic counseling and effective high risk monitoring programs for carriers. They both together explain the vast majority of classical adenomatous polyposis (>100 adenomas), but they are only able to explain a small fraction of AAP². In fact, in our hospital settings, we are not able to explain more than 5–10% of the patients referred to our laboratory after the routine genetic tests. Therefore, the identification of the underlying susceptibility causes of those unexplained AAP cases is a priority in our laboratory.

Recently, other adenomatous polyposis predisposition genes, such as *POLE*⁴, *POLD1*⁴, *NTHL1*⁵, *MSH3*⁶ and *AXIN2*⁷ (MIM *174762, *174761, *602656, *600887 and *604025, respectively), have been described. However, they are still not well characterized and only a few reports have attempted to estimate the extent to which some of these genes, individually, are involved in different CRC populations^{8–13}. Therefore, they are still poorly implemented in the daily clinical practice.

Under this scenario of high genetic heterogeneity, the use of next-generation sequencing (NGS) gene panels for the diagnosis of hereditary AAP seems to be the best choice. Aiming to delve into the genetic study of unexplained AAP, we have screened the whole coding sequences and intron-exon boundaries of *APC*, *MUTYH*, *POLE*, *POLD1*, *NTHL1*, *MSH3* and *AXIN2* in a cohort of AAP collected at our oncogenetic counseling unit. The main objective of this work is to determine the contribution of the AAP associated genes in an unexplained AAP cohort.

Results

Clinical features of the study cohort. A clinical description of the study cohort is summarized in Table 1. The study cohort consisted of 158 AAP patients, coming from the Oncogenetic Counseling Units of Hospital Clínico San Carlos and Hospital 12 de Octubre, in Madrid. The average polyposis diagnosis age was 62.9 (ranged from 33 to 80) and the average polyp burden 31.2 (from 10 to 100). Detailed clinical description of participants is given in Suppl. Table 1.

Germline DNA screening. After genetic panel screening, the average read depth per sample was 895 reads, with a minimum count of 326 and a maximum of 4616. However, two regions showed reiterative low coverage, so they were reanalyzed by high resolution melt (HRM) analysis, NM_000038.4: exon 13 (*APC*) and NM_00128425.1: exon 15 (*MUTYH*). Once the screening was completed, 28 variants located in six genes were validated in 24 patients (Table 2).

Eight patients harbored pathogenic variants (class-5): Two patients harbored class-5 variants in *APC*, one patient was a biallelic carrier of two class-5 variants, another was *MUTYH* biallelic carrier of a class-5 and a class-3 variants, and three patients were monoallelic *MUTYH* class-5 carriers. Finally, one patient was a double carrier of two deleterious variants, in *POLE* and *NTHL1*. The remaining sixteen patients harbored class-3 (Table 2).

Reclassification of variants. After the splicing, segregation and somatic analyses, it was possible to confirm two *MUTYH* variants (c.739C > G; p.(Arg247Gly) and c.1510_1517delinsCCAACAGCCA; p.Thr504Profs*68) as likely pathogenic (class-4) and pathogenic (class-5), respectively, and to reclassify the variant *POLD1*: c.2007-5C > T as benign (class-1) and *POLE*: c.6716C > T p.(Ala2239Val) as likely benign (class-2) (Table 2, Suppl. Table 3A,B). In the end, 11 out of 28 variants were classified as class-5 or -4, two variants were classified as class-1 or -2, discarding their involvement in the AAP predisposition, and 15 variants remained as uncertain significance (class-3) variants.

MUTYH:c.739C > G p.(Arg247Gly). *MUTYH* variant c.739C > G; p.(Arg247Gly) was detected in *trans* (Suppl. Fig. 1a) with c.1187G > A; p.(Gly396Asp) in a male with more than 20 adenomas at the age of 37. One of his brothers was also a carrier of both variants and presented more than 50 adenomas and CRC at the age of 41 (Fig. 1a). The variant is located in the hMSH6 binding domain, and missense mutations located in this domain have been shown to affect the A/8-oxoG binding and glycosylase activities¹⁴. Adenomatous tissue from the proband was screened for somatic mutations and G > T changes were found in *APC*, *KRAS*, *TP53* and *MAP2K* (Table 3, ID

GENE	ID	CHANGE (HGVS)	rs ID	gnomAD [†]	PD [‡]	CL [§]
APC	3	c.266C > G p.(Ser89*)		nd	NA	5
	9	c.147_150del p.(Lys49Asnfs*20)		nd	NA	5
	34	c.1966C > G p.(Leu656Val)	rs577466163	0	ARM	3
	133	c.7399C > A p.(Pro2467Thr)	rs372305287	1e-04	APC basic	3
	136	c.8501A > C p.(His2834Pro)		nd	EB1_hDLG	3
	139	c.1240C > G p.(Arg414Cys)	rs137854567	nd	—	3
AXIN2	55	c.2141G > A p.(Arg714Gln)	rs762872515	0	—	3
	79	c.203G > A p.(Arg68Gln)	rs138056036	2e-04	AXIN1_TNKS	3
MUTYH	35	c.1187G > A p.(Gly396Asp)	rs36053993	4.8e-03	NUDIX 4	5
	35	c.739C > G p.(Arg247Gly)		nd	ENDO3c	4
	37	c.1187G > A p.(Gly396Asp)	rs36053993	4.8e-03	NUDIX 4	5
	38	c.1187G > A p.(Gly396Asp)	rs36053993	4.8e-03	NUDIX 4	5
	61	c.667A > G p.(Ile223Val)	rs200872702	3.4e-04	ENDO3c	3
	89	c.1187G > A p.(Gly396Asp)	rs36053993	4.8e-03	NUDIX 4	5
	89	c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p.Thr504Profs*68		nd	NA	5
	99	c.1187G > A p.(Gly396Asp)	rs36053993	4.8e-03	NUDIX 4	5
NTHL1	16	c.527T > C p.(Ile176Thr)	rs1805378	2.2e-03	ENDO3c	3
	75	c.856G > A p.(Gly286Ser)	rs139309757	3.2e-05	ENDO3c	3
	82	c.527T > C p.(Ile176Thr)	rs1805378	2.2e-03	ENDO3c	3
	83	c.268C > T p.(Gln90*)	rs150766139	2.0e-03	NA	5
POLD1	116	c.2007-5C > T	rs199506387	2.5e-04	NA	1
	118	c.520C > T p.(Arg174Trp)	rs749334182	2.7e-05	POLBc-exo	3
	152	c.2052G > C p.(Gln684His)	rs144143245	6.3e-04	POLBc-pol	3
	157	c.1465G > A p.(Val489Met)	rs753244422	3.3e-05	POLBc-exo	3
POLE	16	c.3857G > A p.(Arg1286His)	rs771823596	5e-05	low complex	3
	21	c.6716C > T p.(Ala2239Val)	rs190813054	8e-06	—	2
	83	c.141delG p.(Phe48Leufs*6)	rs761329565	0	NA	4
	147	c.198G > A p.(Met66Ile)	rs764962999	0	—	3

Table 2. Validated variants and classification according to ACMG-SHERLOC criteria⁴². All variants were heterozygous. [†]GnomAD (08/06/2018): European (Non-Finish) population frequencies (Exome + Genome). [‡]PD = Protein domain from SMART protein database: NA = not applicable. [§]CL: variant classification: 1 = benign; 2 = likely benign; 3 = uncertain significance; 4 = likely pathogenic; 5 = pathogenic. Reference sequences: APC: NM_000038, NP_000029; AXIN2: NM_004655, NP_004646; MUTYH: NM_001128425, NP_036354; NTHL1: NM_002528, NP_002519; POLD1: NM_001256849, NP_001121897; POLE: NM_006231, NP_006222.

35). As it is well known, adenomas and tumors coming from *MUTYH* biallelic carriers show a deficiency in the 8-oxo-hydroxyguanine repair system, leading to an increase in the G > T mutation rate, frequently in *APC* and *KRAS*¹⁵. Thus, c.739C > G; p.(Arg247Gly) was reclassified as class-4 (Suppl. Table 3).

*MUTYH:c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p.Thr504Profs*68.* *MUTYH* variant c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p.(Thr504Profs) was detected in *trans* (Suppl. Fig. 1b) with c.1187G > A; p.(Gly396Asp) in a male with more than 40 adenomas at the age of 56. In this instance, the subject did not present a family history of polyposis or CRC (Fig. 1a). Blood derived cDNA sequencing revealed an extension corresponding to 22 amino acids after the stop codon (p.Thr504Profs*68). The novel frameshift variation was located at the 3'-end of the coding sequence, altering the amino acid sequence of the whole proliferating cell nuclear antigen (PCNA) binding domain, which is essential for *MUTYH*'s activity during DNA replication¹⁶. Indeed, point mutations at the PCNA-binding domain have been proven to decrease the activity of the enzyme¹⁷. Somatic analysis of DNA from affected adenomas showed G > T changes at *KRAS* locus (Table 3, ID 89). Therefore, c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p.Thr504Profs*68 was reclassified as class-5 (Suppl. Table 3).

POLD1:c.2007-5C > T. After cDNA analysis, no splicing alteration was detected in the c.2007-5 carrier. So it was reclassified as class-1.

POLE:c.6716C > T p.(Ala2239Val). *POLE* variant c.6716C > T p.(Ala2239Val) was detected in homozygosity in both an affected and a healthy member, and it was absent in another affected member. Therefore, it was reclassified as class-2 variants.

Co-occurrence of truncating variants at *POLE* and *NTHL1* loci. Two heterozygous truncating variants, *POLE:c.141delG*; p.Phe48Leufs*6 and *NTHL1:c.268C > T*; p.Gln90*, were detected in the same germline DNA (Fig. 2a). The patient was a woman with full-blown late AAP diagnosed at the age of 70 and without a

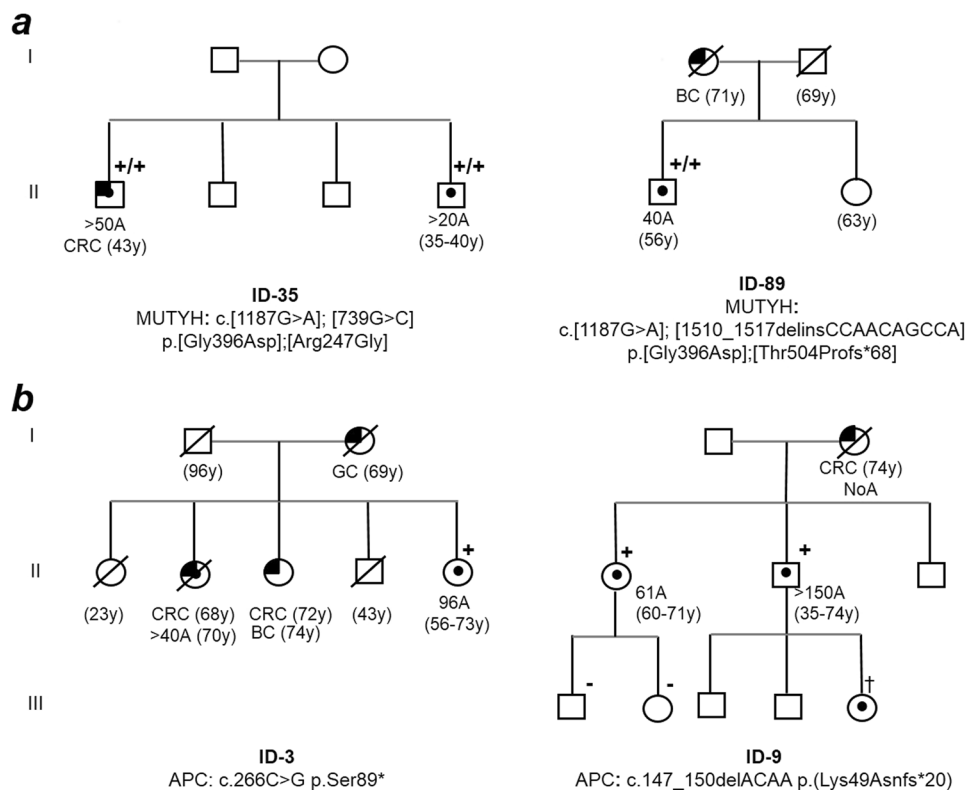


Figure 1. Pedigrees of the explained polyposis cases. **(a)** *MUTYH* biallelic mutations carrier families. **(b)** *APC* mutations carrier families. †polyposis diagnosis after family mutation identification. Black square = cancer; black circle = >10 adenomas; + = variant carrier; - = non carrier; ++ = biallelic carrier; GC = gastric cancer; CRC = colorectal cancer; BC = breast cancer; y = years; A = adenomas.

previous family history of polyposis or CRC. Segregation analyses could only be achieved in two of her daughters, detecting *POLE*:c.141delG; p.Phe48Leufs*6 in one of them, who had been diagnosed of a low grade dysplastic tubular adenoma at the age of 46 (Fig. 2b).

In order to investigate the involvement of these variants in the adenoma and CRC formation, four adenomas (83AD1, 83AD3, 83AD4, 83AD5) and one adenocarcinoma (Haggitt-0) (83AC1) from the proband were analyzed for somatic mutations (Table 3, ID 83). A total of 13 driver mutations was detected, two of which were indels, four C > A changes and seven were C > T changes. Eleven somatic mutations were located in genes involved in the early adenoma formation (*APC*, *RNF43* and *CTNNB1*), whereas two mutations were detected in genes involved in later stages (*ARID1A*, *NRAS*).

In addition, *NTHL1* and *POLE* specific wild type allele expression was checked at tissue level. Quantification analyses were performed in three adenomas (83AD1, 83AD3, 83AD4), one adenocarcinoma (83AC1) and healthy colon tissue from the proband (83COLON). *POLE* wild type allele expression in the carrier's colon tissue (83COLON) did not show a significant change compared to the colon control pool (fold difference (FD) = 0.94 ± 0.27 , $\rho = 0.82$), whereas *NTHL1* wild type allele expression in 83COLON did (FD = 0.30 ± 0.08 , $\rho = 0.004$).

Both *POLE* and *NTHL1* transcripts were over-expressed in the CRC control pool (FD_{POLE} = 2.06 ± 0.08 , $\rho = 0.003$; FD_{NTHL1} = 1.87 ± 0.28 , $\rho = 0.018$). However, all adenomas and the adenocarcinoma tested from the carrier showed a decrease in the expression of *POLE* wild type allele (FD average = 0.46 ± 0.20 , $\rho < 0.001$), whereas *NTHL1* wild type allele showed significant over-expression in one adenoma and one adenocarcinoma from the proband when compared to its healthy tissue ($\rho = 0.0156$ and $\rho < 0.001$, respectively) (Fig. 2c,d).

Discussion

AAP is becoming one of the largest groups of patients attending our Genetic Counselling Unit. Genetic screening of *MUTYH* and *APC* is recommended in those cases with more than 10 adenomas¹⁸. The diagnostic approach in our hospital consists in the screening of the four most prevalent *MUTYH* mutations in Spanish population¹⁹, c.536A > G; p.(Tyr179Cys), c.1187G > A; p.(Gly396Asp), c.1227_1228dup; p.(Glu410Glyfs*43) and c.1437_1439delGGA; p.(Glu480del), and the subsequent screening of point mutations and copy number variations (CNVs) in the whole coding sequence of the *APC* gene in those cases with a higher polyp burden and high suspicion of inheritance pattern. However, by this approach we are only able to explain around 5% of the cases with more than 10 adenomas, or 7% when restricting the criteria to full-blown polyposis (more than 20 adenomas or 10 synchronous adenomas). In order to improve the diagnostic sensitivity and investigate the contribution of currently known high-penetrance adenomatous polyposis genes in our AAP population, we have conducted a

IDP [†]	IDS [‡]	HIST [§]	GENE	CHANGE	TRIPLET	CHANGE (HGVS)	% ALT [¶]	MET ^{**}
83	AD5	LDTA	<i>APC</i>	C > C/T	GCG > GTG	c.4348C > T p.(Arg1450*)	5.7	TST
			<i>APC</i>	C > C/A	TCA > TAA	c.4381G > T p.(Glu1461*)	6.6	TST
			<i>CTNNB1</i>	C > C/T	TCT > TTT	c.134C > T p.(Ser45Phe)	12.9	TST
	AD4	LDTA	<i>ARID1A</i>	C > C/T	ACA > ATA	c.514C > T p.(Gln172*)	26	MIP
			<i>APC</i>	C > C/T	GCG > GTG	c.2626C > T p.(Arg876*)	8	MIP/TST
			<i>APC</i>	AAG > AAG/A		c.3924_3925delAG p.(Glu1309Lysfs*5)	8.8	MIP/TST
	AC1	ACH0	<i>APC</i>	C > C/A	TCT > TAT	c.3916G > T p.(Glu1306*)	32	MIP/TST
			<i>RNF43</i>	C > C/T	CCA > CTA	c.745C > T p.(Gln249*)	12	MIP
			<i>NRAS</i>	C > C/T	ACC > ATC	c.38G > A p.(Gly13Asp)	4.5	TST
	AD1	LDTA	<i>APC</i>	C > C/T	GCG > GTG	c.1660C > T p.(Arg554*)	15	MIP
			<i>APC</i>	C > C/A	TCA > TAA	c.4189G > T p.(Glu1397*)	13	MIP
	AD3	LDTA	<i>APC</i>	C > C/A	TCT > TAT	c.3916G > T p.(Glu1306*)	34.8	TST
35	AD1	LDTA	<i>APC</i>	CC > CC/TA		c.4479_4480delGGinsAT p.(Glu1494*)	18.3	TST
		LDTA	<i>MAP2K1</i>	C > C/A	GCT > GAT	c.171G > T p.(Lys57Asn)	16.8	TST
		LDTA	<i>TP53</i>	C > C/A	TCT > TAT	c.859G > T p.(Glu287*)	19.1	TST
	AD2	LDTA	<i>APC</i>	C > C/A	GCA > GAA	c.4230C > A p.(Cys1410*)	7.6	TST
		LDTA	<i>APC</i>	C > C/T	GCG > GTG	c.2626C > T p.(Arg876*)	6.8	TST
		LDTA	<i>KRAS</i>	C > C/A	CCA > CAA	c.37G > T p.(Gly13Cys)	6.7	TST
37	AD1	LDTA	<i>APC</i>	C > C/-		c.3955delC p.(Pro1319Leufs*2)	15.7	TST
		LDTA	<i>TP53</i>	C > C/T	GCG > GTG	c.524G > A p.(Arg175His)	11.5	TST
38	AD1	TA LDTA LD	<i>MAP2K1</i>	C > C/A	GCT > GAT	c.171G > T p.(Lys57Asn)	4.6	TST
		AD2	HDTVA	<i>APC</i>	T > T/-		c.4233delT p.(Ser1411Argfs*4)	37.1
61	AD1	LDTA	<i>CDH1</i>	- > -/A		c.1885_1886insA p.(Leu630Thrfs*33)	7.2	TST
		LDTA	<i>CTNNB1</i>	T > T/C	GTA > GCA	c.121A > G p.(Thr41Ala)	12.1	TST
		LDTA	<i>NRAS</i>	C > C/T	GCA > GTA	c.360G > A p.(Leu120=)	50.6	TST
99	AD1	LDTA	<i>APC</i>	C > C/T	GCG > GGG	c.4348C > T p.(Arg1450*)	35.7	TST
		LDTA	<i>FBXW7</i>	C > C/T	TCG > TTG	c.1436G > A p.(Arg479Gln)	35.5	TST
		LDTA	<i>KRAS</i>	C > C/T	CCA > CTA	c.34G > A p.(Gly12Ser)	45.6	TST
89	AD1	LDTA	<i>KRAS</i>	C > C/A	CCA > ACA	c.34C > A p.(Gly12Cis)	>1.5	TH-K
		AD2	LDTA	<i>KRAS</i>	C > C/A	CCA > ACA	c.34C > A p.(Gly12Cis)	>1.5

Table 3. Somatic mutations. Somatic mutations detected in adenomas analyzed. [†]IDP = Patient ID; [‡]IDS = Sample ID; AD = adenoma AC = adenocarcinoma; [§]HIST = Histology: LDTA = Low grade dysplastic tubular adenoma, ACH0 = Adenocarcinoma arising from adenoma Haggitt 0, HDTVA = High grade dysplastic tubulovillous adenoma; [¶]% ALT = percentage of altered allele; ^{**}MET = Method: TST = TruSight Tumor 26 panel (Illumina); MIP = single molecule Molecular Inversion Probe; TH-K = Therascreen[®]KRAS. Reference sequences: *APC*: NM_000038, NP_000029; *CTNNB1*: NM_001098210, NP_001091680; *ARID1A*: NM_006015, NP_006006; *RNF43*: NM_017763, NP_060233; *NRAS*: NM_002524, NP_002515; *MAP2K1*: NM_002755, NP_002746; *TP53*: NM_000546, NP_000537; *KRAS*: NM_033360, NP_203524; *CDH1*: NM_004360, NP_004351; *FBXW7*: NM_033632, NP_361014.

genetic screening in an unexplained AAP cohort through a custom gene panel, including *APC*, *MUTYH*, *POLE*, *POLD1*, *NTHL1*, *AXIN2* and *MSH3* coding regions.

Our study cohort was made up of 158 subjects, 132 (83.5%) of which fulfilled the clinical criteria for full-blown polyposis (Table 1). There is only a very recent cross-sectional study analyzing the prevalence of pathogenic variants in genes associated with colorectal polyposis and/or CRC in a cohort of 3789 polyposis patients, of which 2979 presented between 10 and 100 adenomas. All patients underwent panel testing of at least 14 CRC predisposition genes, including *APC* and *MUTYH*. However, only *POLD1* and *POLE* were tested on a subset of the adenoma cohort, and the remaining adenomatous polyposis predisposition genes (*NTHL1*, *AXIN2* and *MSH3*) were not tested²⁰. Therefore, this is the largest multiple polyposis cohort in which joint genetic screening for the full coding sequences of all AAP predisposition genes has been done so far.

Two *APC* truncating mutations were detected in two subjects diagnosed with late-onset full-blown polyposis and a family history initially suspicious of recessive inheritance (Fig. 1b). Both had been previously tested for *MUTYH* but not for *APC*, probably due to the lack of family information at the time of diagnosis, the late polyposis onset of the probands, and also the stricter clinical criteria for the recommendation of full *APC* mutational screening for AAP in our hospital.

In addition, the screening of the whole coding sequence of *MUTYH*, allowed the detection of two *MUTYH* non-recurrent mutations, c.739C > G p.(Arg247Gly) and c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p.Thr504Profs*68,

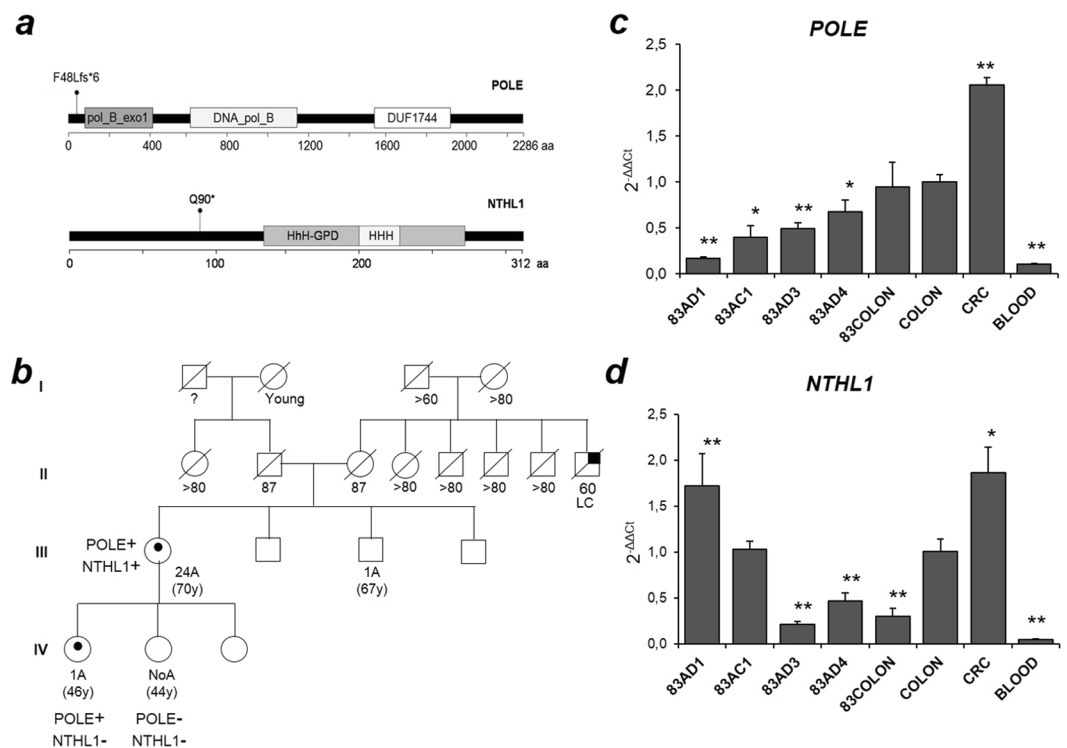


Figure 2. Identification of *POLE* and *NTHL1* double heterozygote. **(a)** *POLE* and *NTHL1* protein domains and location of truncating variants detected in patient 83. **(b)** Pedigree chart; *POLE*+ = *POLE* variant carrier; *POLE*- = *POLE* wild type genotype; *NTHL1*+ = *NTHL1* variant carrier; *NTHL1*- = *NTHL1* wild type genotype; LC = lung cancer; A = adenoma. **(c)** *POLE* wild type expression in blood and tissue cDNA samples. **(d)** *NTHL1* wild type allele expression in blood and tissue cDNA samples. COLON pool sample has been used as a reference sample in both *NTHL1* and *POLE* assays. Significant ρ -values are indicated with * ($\rho < 0.05$) and ** ($\rho < 0.01$). Each sample was analyzed in triplicates. AC = adenocarcinoma; AD = adenoma; CRC = colorectal cancer.

both in co-occurrence with the recurrent mutation c.1187G > A; p.(Gly396Asp), being able to explain the polyposis susceptibility in two more subjects (Fig. 1a).

APC/MUTYH mutational rates are low in AAP population². Conventional genetic screening technologies imply the sequential analysis of each gene amplicon by amplicon, which makes these protocols costly in both time and money. Therefore, those laboratories without high sample volumes are forced to restrict their clinical criteria for AAP diagnosis in order to make the analysis cost-effective. NGS multigene panels reduce the time and cost of these genetic studies, increasing the cost-effectiveness and making the complete screening of samples feasible for small laboratories. The identification of pathogenic mutations in *APC* and *MUTYH* with an NGS panel in our study cohort is a clear example of underdiagnoses, supporting the necessity of parallel sequencing for *APC* and *MUTYH* routine genetic screening in AAP patients.

None of the patients showed actionable mutations (class-4 and -5) in any of the genes associated with new polyposis syndromes (*MSH3*, *NTHL1*, *POLD1*, *POLE* or *AXIN2*). However, 10 uncertain significance (class-3) variants were detected in *AXIN2*, *NTHL1*, *POLD1* and *POLE* (Table 2). Three of these variants were located outside the proofreading domain of *POLE/POLD1*. Although there is no evidence of association between missense variants outside these regions and cancer susceptibility, there is a recent report that describes somatic driver mutations located outside the exonuclease domains, and suggesting that other domains may be responsible for proofreading²¹. Therefore, we decided to include these variants as class-3 variants for AAP predisposition.

Considering other previous studies that included multiple polyposis cohorts, the frequency of actionable mutations in all of these genes seems to be very low in tested populations, but not insignificant (around 1–2%). Just like it is not irrelevant the number of variants of uncertain significance that have been described in this and other works^{9,10,12} (1–2% per gene), and whose probable pathogenicity might be proven during the coming years. For this reason it is important to include all these genes in the routine analysis of AAP through NGS panels.

A remarkable finding of this work is the detection of a double heterozygous for two truncating variants, at exon two of *NTHL1* and exon two of *POLE* (Fig. 2a). The carrier was a woman with late full-blown polyposis, who was also diagnosed with endometrial hyperplasia and hypothyroidism (Fig. 2b).

POLE encodes the catalytic subunit of DNA polymerase epsilon, which is responsible for the replication of the leading DNA strand during the S phase; it is an essential protein and biallelic truncating mutations are not viable. *POLE*, together with *POLD1*, is the only nuclear polymerase with an intrinsic 3′–5′ exonuclease proofreading activity capable of correcting mistakes made during DNA synthesis²². A few years ago, germline mutations

located in the proofreading domain of *POLE* and *POLD1* were associated with adenomatous polyposis predisposition⁴, showing tumors with a very high mutational burden due to the lack of exonuclease but not polymerase activity. According to this, truncating variants at *POLE* would not be supposed to confer this genetic instability because they would lead to a complete inactivation of the enzyme without any polymerase-exonuclease imbalance. However, it is not clear to what extent the lack of one *POLE* allele can lead to cancer predisposition in some other way.

On the other hand, *NTHL1* encodes the DNA glycosylase NTHL1, which is involved in removing oxidative pyrimidine lesions through the base excision repair (BER) pathway. Resembling to *MUTYH*-associated polyposis, germline biallelic mutations at *NTHL1* have been recently associated with adenomatous polyposis predisposition⁵, leading to a deficiency in the repair of 5-hydroxycytosine and a consequent increase in the C > T somatic mutation rate. Like other glycosylases involved in the BER pathway, NTHL1's repair activity can be completed by a short or long BER patch, mainly depending on the proliferative activity of the cell²³. Thus, in high division rate tissues NTHL1 is coupled to the DNA synthesis and follows the long-patch BER pathway, dependent of PCNA and where *POLE* and *POLD1* are the polymerases responsible for filling the gap after NTHL1's action and strand cleavage²³.

Therefore, it is plausible that *POLE* and *NTHL1* co-occurring truncating variants may have a synergistic effect leading to a polyposis predisposition in high division tissues such as the colon epithelium. To check this hypothesis, somatic mutation screening and RNA expression analyses were performed in adenomas and CRC from the carrier. The analysis of somatic mutations showed a tendency to C > T changes (Table 3), although no clear definition of the mutational signature could be done due to the low number of mutations. Furthermore, a quantitative analysis of *POLE* wild type allele showed a significant decrease of *POLE* expression in all tested carrier's adenomas and adenocarcinoma (Fig. 2c), which is consistent with a replicative stress due to *POLE* haploinsufficiency. However and unlike *POLE*, *NTHL1* expression was increased in two of the carrier's adenomas and adenocarcinoma tissues (Fig. 2d). This over-expression was probably triggered by a greater oxidative DNA damage in tissues with a high division rate, which has been shown to up-regulate BER glycosylases²⁴. Wild type *NTHL1* transcript levels in the carrier's affected tissues reached similar levels than non-carrier's affected pool, which is not consistent with an *NTHL1* haploinsufficiency. Therefore, we discarded the involvement of the *NTHL1* monoallelic mutation c.268C > T p.(Gln90*) in the polyposis predisposition of this patient and we considered the possibility that *POLE*:c.141delG p.Phe48Leufs*6 could confer the adenoma predisposition by itself. Only 0.005% of *POLE* coding variants described in gnomAD are truncating (frameshift or nonsense); non homozygous have been described and all truncating variants show allelic frequencies lower than 1/10000. Moreover, there are two studies in the literature describing germline frameshift variants at *POLE*; c.5621_5622delGT was detected in a sporadic CRC patient with a diagnosis age of 26²⁵, and c.1370_1371delAT p.Tyr457fs*9 was later detected in an AAP patient¹⁰. In addition, as it has been mentioned above, somatic driver mutations have been recently described in *POLE* and *POLD1* polymerase domains²¹.

Furthermore, the presence of both variants was checked in two of the proband's daughters; one harbored the *POLE* variant, but not the *NTHL1* one, and the other did not harbor any of the variants (Fig. 2b). The *POLE* carrier showed a dysplastic tubular adenoma at the age of 46. Despite the large size of the family, no other relatives had been diagnosed of cancer or polyposis, which would support the hypothesis of a digenic or oligogenic inheritance with other undetected variants or, a *de novo* *POLE* mutation in the proband with a dominant effect that is not yet possible to observe due to the young age of the daughter harboring the variant (Fig. 2b).

To our knowledge, this is the first report describing the probable association of a truncating germline *POLE* variant with the predisposition of AAP by a haploinsufficiency mechanism in adenomatous and colorectal tumor tissues of the carrier. This result highlights not only the genetic heterogeneity and complexity of the syndrome, but also the potential of NGS gene panels for the detection and diagnosis of new inheritance forms of complex diseases. Further efforts should be done for the study and characterization of germline *POLE* truncating variants in other AAP populations, as well as their co-occurrence with variants in other associated genes.

In accordance with other AAP studies, our results showed a major number of subjects without detection of variants in any of the genes tested. It can be thought the involvement of other unknown predisposition genes in the susceptibility of AAP and the convenience of wider genetic analysis, such as exome sequencing, for the elucidation of new AAP predisposition genes in this unexplained group. However, despite most of the new AAP associated genes have been discovered by exome sequencing approaches, there are other works without such successful results^{26,27}. The failure of detecting new predisposition genes in AAP is probably due to the high clinical and genetic heterogeneity of the condition, as well as the low prevalence of pathogenic mutations in the already associated genes. Probably, polygenic inheritance models in which the susceptibility is explained by the accumulation of multiple low penetrance alleles²⁸, and lifestyle risk factors such as smoking, alcohol, body mass index, diet and physical activity²⁹ play a major role in the unexplained AAP.

In our cohort, all patients with pathogenic mutation detection presented full blown AAP (more than 20 adenomas) and an average diagnosis age lower than the general study cohort (57.2). Other works analyzing AAP cohorts, such as Grover³⁰ who analyzed *MUTYH* and *APC* in 4223 patients with 10 to 100 adenomas, or Stanich²⁰ who also analyze *POLD1* and *POLE* and other CRC genes in 2979 patients with 10 to 100 adenomas, showed similar clinical results. These results suggest that the low mutation detection rate in AAP is partially because of the lack of strict clinical criteria for the selection of patients with high probability to detect pathogenic mutation in any known predisposition gene. Therefore, redefinition of stronger clinical criteria and the use of panel gene testing are necessary for the improvement of genetic testing in AAP.

This work is a translational study aiming to analyze the contribution of known and new described adenomatous polyposis predisposition genes and the suitability of their genetic testing in a hospital based cohort that have been referred to the genetic counseling unit. The results shown above lead to the following conclusions:

1. The contribution of new predisposition genes is much smaller than that of the known genes *APC* and *MUTYH*. Related pathogenic mutations have not been detected in any gene. However, uncertain significance variants have been detected in all genes but *MSH3*. Since they are recently described genes, the identification of potential pathogenic variants and further clarification of their pathogenicity is important for the definition of the syndrome.
2. Somatic genetic screening of affected tissues allows the detection of certain mutational signatures associated with DNA repair deficiency, helping the classification of the variants.
3. The expected low mutation detection rate in AAP study cohort point to the necessity of stronger clinical criteria for the improvement of the diagnostic sensitivity in AAP genetic testing.
4. Although the number of *POLE/POLD1* truncating mutations detected in AAP cases is very limited, due to the genetic heterogeneity of the disease, the relevance of these genes and the decreased levels of carrier's tumor and adenoma samples shown in this work, special attention should be paid to those *POLE/POLD1* truncating variants in order to determine their pathogenicity.
5. Summarizing, this work highlights the need of multigene panel testing in highly genetic heterogeneous syndromes such as AAP, not only to increase the cost-effectiveness and the diagnostic sensitivity of the analysis, but also to better detect other potentially pathogenic variants or other inherited forms of the disease that would not be detected by other gene directed approaches.

Patients and Methods

Patients. The inclusion criterion was the detection of between 10 and 100 adenomas in the colon and/or rectum. All the samples had been screened, at least, for the most frequent *MUTYH* (NM_0012222.2) mutations in the Spanish population¹⁹: c.536A > G; p.(Tyr179Cys), c.1187G > A; p.(Gly396Asp), c.1227_1228dup; p.(Glu410Glyfs*43) and c.1437_1439delGGA; p.(Glu480del), by HRM and/or Sanger sequencing. The presence of biallelic *MUTYH* mutations was considered as an exclusion criterion, but not the presence of monoallelic *MUTYH* mutations. *APC* screening was not an inclusion criterion, but the previous detection of a pathogenic *APC* mutation was considered as an exclusion criterion.

A total of 158 unrelated AAP cases was included in the study (Suppl. Table 1), comprising 123 subjects from Hospital Clínico San Carlos (Madrid) and 35 from Hospital 12 de Octubre (Madrid).

Ethical approval was obtained from Hospital Clínico San Carlos' Ethical Research Committee (approval number: C.I.-14/241-E_BS). A written informed consent was obtained from each participant. Methods were compliant with the relevant guidelines and regulations.

Sample extraction. Peripheral-blood DNA/RNA extraction was performed with the MagNA Pure Compact extractor (Roche), according to the manufacturer's protocol. Tissue DNA/RNA (from normal epithelium, adenoma or tumor sections) was obtained from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues with a purity greater than 80% as determined by an experienced pathologist. DNA extractions were performed with the QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen N.V.) and RNA extractions with the RNeasy FFPE kit (Qiagen N.V.). SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) was used to synthesize cDNA, either from blood or tissue RNA, using random hexamers and oligo-dT, according to the manufacturer's instructions.

Germline DNA screening. Germline DNAs were screened for *APC*, *MUTYH*, *POLE*, *POLD1*, *NTHL1*, *MSH3* and *AXIN2* variants in the coding regions and intron-exon boundaries through an NGS Haloplex custom panel (Agilent Technologies). Enriched libraries were obtained according to the manufacturer's protocol, and subsequently sequenced on a MiSeq System (Illumina, Inc.). Data analysis and variant calling were achieved with the SureCall software (Agilent Technologies) following the recommended pipeline for Haloplex libraries. Low covered regions (read depth <50) were analyzed by HRM. CNVs analyses at *APC* and *MUTYH* loci were performed by multiplex ligation and probe amplification (MLPA) (SALSA[®] MLPA[®] probemix P043 and P378, MRC-Holland).

All rare (novel or minor allele frequency (MAF) <0.01 according to the gnomAD³¹ and 1000 genomes project³² databases), deleterious or possible deleterious variants (according to protein and/or splicing alteration prediction tools) were selected for validation by Sanger sequencing. MaxEnt, and human splicing finder (HSF)³³ were used to predict splicing alterations, while SIFT³⁴, Polyphen2³⁵ and MutationTaster³⁶ predicted protein damage.

Classification of variants. Variants were classified in five different pathogenicity classes (class-5 or pathogenic, class-4 of likely pathogenic, class-3 or uncertain significance, class-2 or likely benign and class-1 or benign) according to the public mutational databases (InSight³⁷ LOVD³⁸, UMD³⁹, ClinVar⁴⁰) and supporting pathogenic and/or benign evidences, in accordance to the ACMG-SHERLOC criteria^{41,42}.

Characterization of variants. *Segregation analyses.* Whenever possible, segregation analyses of candidate variants were performed on DNA from available family members by Sanger sequencing (oligonucleotides shown in Suppl. Table 2).

Splicing analyses. Blood derived cDNAs from patients harboring variants either with a positive splicing alteration prediction or located between five nucleotides from the intron-exon boundaries, were subjected to transcript analyses by Sanger sequencing (oligonucleotides shown in Suppl. Table 2).

Adenoma/tumor DNA screening. Adenoma and tumor DNAs were screened for somatic mutations using the commercial amplicon-based TruSight Tumor 26 panel (TST26) (Illumina, Inc.), which includes 174 relevant

regions located in 26 genes involved in solid tumors. Sequencing was performed on a MiSeq System (Illumina, Inc.). Data analysis and variant calling were performed through the plug-in specific Amplicon DS workflow for the MiSeq Reporter Software tool (Illumina, Inc.). PASS filter variants, according to the default settings, were first selected. Variants that failed to pass default filters, but that were detected in both pools (i.e. showing a low coverage depth or strand bias) were manually inspected using the Integrative Genome Viewer (IGV) browser⁴³. Known germline polymorphisms, variants detected in the majority of samples tested, variants previously detected in the patient's germline DNA or present in all tested samples from the same subject were discarded.

By single-molecule molecular inversion probe (smMIP) sequencing, two adenomas (83AD1 and 83AD4) and one adenocarcinoma (83AC1) were also investigated for the occurrence of somatic mutations in the open reading frames and hotspot regions of 57 genes involved in CRC development, as described previously⁴⁴.

In order to characterize the variant *MUTYH*:c.1510_1517delinsCCAACAGCCA p.(Thr504Profs*68), three adenomas of patient 89 were analyzed for *KRAS* somatic mutations at codons 12 and 13 by the Therascreen *KRAS* RGQ PCR Kit (Qiagen N.V.), according to the manufacturer's protocol.

cDNA expression analyses. *NTHL1* and *POLE* wild type allele expression levels were evaluated in three adenomas (83AD1, 83AD3 and 83AD4), one adenocarcinoma (83AC1) and one healthy colon tissue (83COLON) from patient 83 and compared to healthy colon and colorectal cancer control pools (COLON and CRC). The healthy colon pool was made up of eight FFPE colon tissue-derived RNA samples from unrelated healthy subjects, while the colon cancer pool was made up of eight FFPE CRC tissue-derived RNA samples from unrelated patients. All samples were previously treated with RNase-free recombinant DNase I (Roche) and the lack of germline DNA traces was checked by specific germline and cDNA amplification (Suppl. Fig. 2, primer sequences on Suppl. Table 2).

For each of the genes to be tested, primer pairs were designed for the specific detection of the wild type allele, and *PSMB4* was used as an endogenous gene (Suppl. Table 2). For each sample, 5 ng/μL of RNA was amplified in triplicates with the KAPA SYBR® FAST Universal Kit (Roche) in a Light Cycler® 96 (Roche), according to the manufacturer's instructions.

Reclassification of variants. Reclassification of variants was achieved according to the supporting pathogenic and/or benign evidences, in accordance to the ACMG-SHERLOC criteria^{41,42}

Data Availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Lucci-Cordisco, E., Risio, M., Venesio, T. & Genuardi, M. The growing complexity of the intestinal polyposis syndromes. *Am J Med Genet A* **161A**, 2777–87 (2013).
- Mongin, C. *et al.* Unexplained polyposis: a challenge for geneticists, pathologists and gastroenterologists. *Clin Genet* **81**, 38–46 (2012).
- Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* **138**, 2044–58 (2010).
- Palles, C. *et al.* Germline mutations affecting the proofreading domains of *POLE* and *POLD1* predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet* **45**, 136–44 (2013).
- Weren, R. D. *et al.* A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene *NTHL1* causes adenomatous polyposis and colorectal cancer. *Nat Genet* **47**, 668–71 (2015).
- Adam, R. *et al.* Exome Sequencing Identifies Biallelic *MSH3* Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *Am J Hum Genet* **99**, 337–51 (2016).
- Rivera, B. *et al.* A novel *AXIN2* germline variant associated with attenuated FAP without signs of oligodontia or ectodermal dysplasia. *Eur J Hum Genet* **22**, 423–6 (2014).
- Elsayed, F. A. *et al.* Germline variants in *POLE* are associated with early onset mismatch repair deficient colorectal cancer. *Eur J Hum Genet* **23**, 1080–4 (2015).
- Bellido, F. *et al.* *POLE* and *POLD1* mutations in 529 kindred with familial colorectal cancer and/or polyposis: review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance. *Genet Med* **18**, 325–32 (2016).
- Spier, I. *et al.* Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in *POLE* and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* **137**, 320–31 (2015).
- Belhadj, S. *et al.* Delineating the Phenotypic Spectrum of the *NTHL1*-Associated Polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **15**, 461–462 (2017).
- Esteban-Jurado, C. *et al.* *POLE* and *POLD1* screening in 155 patients with multiple polyps and early-onset colorectal cancer. *Oncotarget* **8**, 26732–26743 (2017).
- Grolleman, J. E. *et al.* Mutational Signature Analysis Reveals *NTHL1* Deficiency to Cause a Multi-tumor Phenotype. *Cancer Cell* **35**, 256–266.e5 (2019).
- Bai, H. *et al.* Functional characterization of two human MutY homolog (hMYH) missense mutations (R227W and V232F) that lie within the putative hMSH6 binding domain and are associated with hMYH polyposis. *Nucleic Acids Res.* **33**, 597–604 (2005).
- Al-Tassan, N. *et al.* Inherited variants of MYH associated with somatic G:C->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* **30**, 227–32 (2002).
- van Loon, B. & Hubscher, U. An 8-oxo-guanine repair pathway coordinated by *MUTYH* glycosylase and DNA polymerase lambda. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 18201–6 (2009).
- Brinkmeyer, M. K. & David, S. S. Distinct functional consequences of *MUTYH* variants associated with colorectal cancer: Damaged DNA affinity, glycosylase activity and interaction with PCNA and Hus1. *DNA Repair (Amst)* **34**, 39–51 (2015).
- Syngal, S. *et al.* ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* **110**, 223–62; quiz 263 (2015).
- Gomez-Fernandez, N. *et al.* Molecular analysis of the APC and *MUTYH* genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med Genet* **10**, 57–68 (2009).
- Stanich, P. P. *et al.* Prevalence of Germline Mutations in Polyposis and Colorectal Cancer-Associated Genes in Patients With Multiple Colorectal Polyps. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*, <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.12.008> (2018).

21. Campbell, B. B. *et al.* Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human. *Cancer. Cell* **171**, 1042–1056 e10 (2017).
22. Henninger, E. E. & Pursell, Z. F. DNA polymerase epsilon and its roles in genome stability. *IUBMB Life* **66**, 339–51 (2014).
23. Akbari, M. *et al.* Extracts of proliferating and non-proliferating human cells display different base excision pathways and repair fidelity. *DNA Repair (Amst)* **8**, 834–43 (2009).
24. Fleming, A. M., Ding, Y. & Burrows, C. J. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, 2604–2609 (2017).
25. Smith, C. G. *et al.* Exome resequencing identifies potential tumor-suppressor genes that predispose to colorectal cancer. *Hum Mutat* **34**, 1026–34 (2013).
26. Spier, I. *et al.* Exome sequencing identifies potential novel candidate genes in patients with unexplained colorectal adenomatous polyposis. *Fam. Cancer* **15**, 281–288 (2016).
27. Broderick, P. *et al.* Validation of Recently Proposed Colorectal Cancer Susceptibility Gene Variants in an Analysis of Families and Patients—a Systematic Review. *Gastroenterology* **152**, 75–77.e4 (2017).
28. Cheng, T. H. T. *et al.* Common colorectal cancer risk alleles contribute to the multiple colorectal adenoma phenotype, but do not influence colonic polyposis in FAP. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**, 260–263 (2015).
29. Øines, M., Helsing, L. M., Bretthauer, M. & Emilsson, L. Epidemiology and risk factors of colorectal polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **31**, 419–424 (2017).
30. Grover, S. *et al.* Prevalence and phenotypes of APC and MUTYH mutations in patients with multiple colorectal adenomas. *JAMA* **308**, 485–492 (2012).
31. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–91 (2016).
32. Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68–74 (2015).
33. Desmet, F. O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* **37**, e67 (2009).
34. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* **4**, 1073–81 (2009).
35. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**, 248–9 (2010).
36. Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M. & Seelow, D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* **11**, 361–2 (2014).
37. Thompson, B. A. *et al.* Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat Genet* **46**, 107–115 (2014).
38. Fokkema, I. F. *et al.* LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat* **32**, 557–63 (2011).
39. Beroud, C., Collod-Beroud, G., Boileau, C., Soussi, T. & Junien, C. UMD (Universal mutation database): a generic software to build and analyze locus-specific databases. *Hum Mutat* **15**, 86–94 (2000).
40. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res* **46**, D1062–D1067 (2018).
41. Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* **17**, 405–24 (2015).
42. Nykamp, K. *et al.* Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med* **19**, 1105–1117 (2017).
43. Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**, 24–6 (2011).
44. Eijkelenboom, A. *et al.* Reliable Next-Generation Sequencing of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Using Single Molecule Tags. *J Mol Diagn* **18**, 851–863 (2016).

Acknowledgements

The authors wish to thank the polyposis patients and relatives for their participation. They also thank the donors and the Biobank of the “Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos” for the human specimens used in this study. The present study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Spain (www.isciii.es) and European Regional Development FEDER funds (PI14/00929, PI16/01292 and CIBERONC (Centro de Investigación Biomédica en Red en Oncología) network CB16/12/00301).

Author Contributions

V.L. performed the most of experiments and analyses of the results. D.R. and S.T. contributed to the selection of patients from Hospital 12 de Octubre and validation cohort. L.M.M. contributed to the germline DNA gene panel sequencing and data analysis. M.J.F.-A. and J.S. collected and assessed FFPE tissue for DNA and RNA extraction. C.P. and P.P.S. participated in the selection of Hospital Clínico San Carlos’s participants and clinical data curation. J.G. and R.M.V. performed somatic mutational screening by smMIP, P.L. and V.G.B. helped in the analysis of results. M.H., E.D.R. and T.C. gave advice throughout the project, P.G. and T.C. designed the study, P.G. supervised all the study, V.L. and P.G. wrote the manuscript, M.H., E.D.R., T.C., V.G.B. and R.M.V. reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46403-5>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Current status of the genetic susceptibility in attenuated adenomatous polyposis

Víctor Lorca, Pilar Garre

ORCID number: Víctor Lorca (0000-0002-3681-4319); Pilar Garre (0000-0001-8285-4138).

Author contributions: Lorca V generated the figures and wrote the manuscript; Garre P designed the aim of the review and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest statement: Authors declare no potential conflicts of interest.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

Received: April 17, 2019

Peer-review started: April 18, 2019

First decision: July 31, 2019

Revised: August 18, 2019

Accepted: October 14, 2019

Article in press: October 14, 2019

Published online: December 15, 2019

P-Reviewer: Kadiyska T, Jiang L

S-Editor: Ma YJ

Víctor Lorca, Laboratorio de Oncología Molecular, Grupo de Investigación Clínica y Traslacional en Oncología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid 28040, Spain

Pilar Garre, Laboratorio de Oncología Molecular, Servicio de Oncología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid 28040, Spain

Corresponding author: Pilar Garre, PhD, Research Scientist, Laboratorio de Oncología Molecular, Servicio de Oncología, Hospital Clínico San Carlos, c/Profesor Martín Lagos s/n, Madrid 28040, Spain. pilar_garre@hotmail.com

Telephone: +34-913-303348

Fax: +34-913-302494

Abstract

Adenomatous polyposis (AP) is classified according to cumulative adenoma number in classical AP (CAP) and attenuated AP (AAP). Genetic susceptibility is the major risk factor in CAP due to mutations in the known high predisposition genes *APC* and *MUTYH*. However, the contribution of genetic susceptibility to AAP is lower and less understood. New predisposition genes have been recently proposed, and some of them have been validated, but their scarcity hinders accurate risk estimations and prevalence calculations. AAP is a heterogeneous condition in terms of severity, clinical features and heritability. Therefore, clinicians do not have strong discriminating criteria for the recommendation of the genetic study of known predisposition genes, and the detection rate is low. Elucidation and knowledge of new AAP high predisposition genes are of great importance to offer accurate genetic counseling to the patient and family members. This review aims to update the genetic knowledge of AAP, and to expound the difficulties involved in the genetic analysis of a highly heterogeneous condition such as AAP.

Key words: Attenuated adenomatous polyposis; Genetic susceptibility; High predisposition gene; Genetic heterogeneity; Colorectal cancer

©The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: Attenuated adenomatous polyposis (AAP) is a highly genetically and clinically heterogeneous condition in terms of severity, clinical features, heritability, and genetics. The major high predisposition genes *APC* and *MUTYH* explain a small fraction of AAP (10%-20%). Several predisposition genes have been recently proposed, and some of

L-Editor: Filipodia

E-Editor: Ma YJ



them have been validated, but studies addressing their global contribution to AAP genetic predisposition is scarce. Clinicians do not have strong discriminating criteria for the recommendation of genetic testing, and the detection rate is low. Therefore, multigene panel testing and a redefinition of strong clinical criteria could improve the outcome of AAP genetic testing.

Citation: Lorca V, Garre P. Current status of the genetic susceptibility in attenuated adenomatous polyposis. *World J Gastrointest Oncol* 2019; 11(12): 1101-1114

URL: <https://www.wjgnet.com/1948-5204/full/v11/i12/1101.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.4251/wjgo.v11.i12.1101>

INTRODUCTION

Adenomatous polyposis (AP) can be defined as the tendency to develop adenomatous polyps (adenomas) along the large intestine and/or rectum. Although adenomas are benign growths, they are considered the precursor lesions of colorectal carcinoma (CRC)^[1]; thus, AP is classified as a cancer risk syndrome with cumulative risks ranging from 40% to 100% depending on the severity of the polyposis (adenoma burden).

AP is usually classified according to the adenoma burden in two major groups: classical AP (CAP) and attenuated AP (AAP). Classical forms are characterized by the detection of hundreds or thousands of adenomas, and have a very low prevalence in the population (1/10000^[2]), whereas attenuated forms are defined by the detection of between 10-100 adenomas, and are more prevalent in the adult population. CAP shows aggressive phenotypes, usually triggered during the second decade of life, and with a cumulative absolute cancer risk if adenomas are not removed. Extracolonic manifestations are frequent, and most of the cases show a dominant inheritance pattern^[3]. By contrast, AAP is a much more heterogeneous group in terms of polyposis severity and family history^[4-6]. Clinical features are distinctive from classical forms; adenoma detection is low or mild, ranging from ten synchronous or 20 cumulative to 100 adenomas, and the polyposis diagnosis age is significantly later than CAP. Cancer risk is also lower and later, ranging from 40% to 80% depending on the adenoma burden. Extracolonic manifestations are uncommon, and a family history of polyposis is frequently absent. AAP is sometimes accompanied by other types of polyps, such as hyperplastic or serrated polyps^[5,7].

There are currently two clearly clinically-actionable genes that can lead to AP: *APC* (MIM#611731) and *MUTYH* (MIM#604933). Thus, prevalence and cancer risk estimations are well-defined, allowing accurate genetic counseling and effective high-risk monitoring programs for carriers. Heterozygous germline truncating mutations in the tumor suppressor gene *APC* mainly give rise to CAP, and sometimes to AAP, with dominant inheritance patterns. In contrast, germline biallelic mutations in the DNA repair gene *MUTYH* mainly lead to AAP and less frequently to CAP, with recessive inheritance patterns. In these cases, identification of *APC* or *MUTYH* carriers is important, not only to define the risks and follow-up strategies for the patient, but also to discriminate between high- and low-risk individuals among the family members who could benefit from high-risk follow-up or, on the contrary, avoid unnecessary and invasive monitoring. Ambiguously, even though both genes explain the vast majority of CAP, together they are only able to explain between 10%-20% of AAP.

AAP incidence is significantly increasing in hospital settings, mainly due to the improvement of imaging techniques and the implementation of CRC population screening programs. This increase translates into a problem in the Genetic Counseling Units due to the high heterogeneity of the disease. On the one hand, it is difficult to discriminate not only between sporadic multiple polyposis and real AP in patients with low adenoma burden, but also between attenuated and classical forms in patients with adenoma counts close to 100. On the other hand, family history is not a discriminant criterion for genetic studies due to the high rate of *de novo* mutations described in *APC* (10%-25%)^[8,9] and the recessive inheritance pattern of *MUTYH*^[10]. Furthermore, only a minority of AAP cases (< 20%) is explained by germline mutations in *APC* or *MUTYH*^[11,12], leaving a substantial fraction of AAP cases unexplained. This means that indiscriminating and invasive follow-up programs will be recommended to all first-degree relatives of these patients.

Under this scenario, the elucidation of genetic susceptibility, which could explain the etiology of the disease and improve the accuracy of genetic counseling, has become a priority for scientists and clinicians. Thanks to the advance of sequencing technologies, new genes have been recently associated with primary predisposition to the development of adenomas by genome/exome sequencing studies in unexplained AP cohorts^[13-16]. In the same way, other genetic alterations not detected by conventional coding germline DNA sequencing screening strategies have also been described in the *APC* gene, such as mutations in the promoter^[17] or introns^[18], large inversions^[19] or mosaicism phenomes^[20]. In addition, the use of wide gene panels for the genetic diagnosis of AP has incidentally revealed an overlap between different polyposis syndromes^[21]. However, all these studies together are only able to explain the etiology of a very small fraction of AAP cases, and the unexplained cases are still a major group that needs to be clarified. Most likely, polygenic inheritance models in which the accumulation of multiple low penetrance alleles^[22] and lifestyle risk factors such as smoking, alcohol, body mass index, diet and physical activity^[23] play a major role in unexplained AAP cases.

Despite the low frequency of high predisposition genes in AAP, their knowledge is important for the detection of carriers, allowing the discrimination of high- and normal-risk individuals among family members, and leading to accurate and cost-effective monitoring programs.

The aim of this review is to describe the current knowledge of the genetic susceptibility of AAP, with emphasis on genes with a primary predisposition to AP that have been described so far, which are either already implemented in clinical practice, in process, or have recently been proposed.

AP PRIMARY PREDISPOSITION ASSOCIATED GENES

Until recently, *APC* and *MUTYH* were the only known AP syndrome predisposition genes. With the advent of next-generation sequencing (NGS) technologies, new AP predisposition genes have emerged. There are currently three new validated genes [*POLE* (MIM#174762), *POLD1* (MIM#174761), *NTHL1* (MIM#602656)], and two more genes that have been described but not validated [*MSH3* (MIM#600887), *MLH3* (MIM#604395)]. The discovery of new AP predisposition genes has allowed for considerable advancement in the biology of AP development and, therefore, in colorectal carcinogenesis. However, the newly described genes are still poorly implemented in clinical practice, mainly because of their low frequency and the lack of accurate risk estimations. Thus, time is needed to increase the number of described cases that allow better prevalence and risk estimations to be obtained.

APC

APC is a tumor suppressor gene closely involved in colorectal carcinogenesis; *APC* somatic mutations are the first event in the canonical CRC carcinogenesis model, which is followed by more than 80% of all CRCs^[24]. The *APC* gene encodes a multifunctional protein that is mainly involved in signal transduction, cell adhesion and migration, microtubule assembly and chromosome segregation^[25]. Its tumor-suppressing ability relies on its capacity to negatively regulate intracellular β -catenin levels, the main effector of the Wnt pathway. Therefore, inactivation of *APC* leads to increased β -catenin levels and overexpression of its different target genes involved in cell proliferation, differentiation, migration and apoptosis^[26], which histologically correlates with adenoma formation.

APC is located on the long arm of chromosome 5 (5q21), has 15 exons, and encodes a 2,843 amino acid protein^[27]. Most of the somatic mutations lie in the mutation cluster region (MCR), which is located between amino acids 1286 and 1513 and overlaps with the β -catenin binding region^[28]. Heterozygous *APC* germline mutations have been associated with AP predisposition in a gene location-dependent manner^[29]. Most of the germline *APC* mutations are truncating variants lying between codons 178 and 1580, and give rise to stable mutant peptides that exert a dominant-negative effect on the wild-type protein^[30,31]. These mutations lead to classical forms of the disease called familial AP (FAP), whereas germline mutations located at both the 5' and 3' ends of the transcript, as well as splicing mutations that lead to exon 9 skipping, give rise to attenuated forms of the disease called attenuated familial AP (AFAP) (Figure 1A). Germline mutations at the 3' end give rise to stable proteins with a certain capability to regulate β -catenin levels^[30], and 5' end mutations upstream of codon 177 produce functional proteins by initiation of translation at codon 184^[31,32]. This internal initiation of translation is relatively inefficient, leading to a haploinsufficient phenotype rather than a dominant-negative phenotype. Mutations at the splice donor site in intron 9

lead to inefficient exon skipping with some expression of normal transcript, and therefore with an attenuated form of the disease^[33].

Both FAP and AFAP show autosomal dominant inheritance patterns. However, there are some exceptions without any family history. *De novo* mutations have been described in 10%-25% of APC carriers^[8,9], and recent studies report APC mosaicism rates of 20%-50% in unexplained AP cases^[20,34]. Whereas *de novo* mutations have been observed in both FAP and AFAP, it is noteworthy that mosaicism carriers present an attenuated form of the disease^[20], likely due to the nonubiquitous distribution of the mutant allele.

MUTYH

MUTYH is a DNA repair gene involved in the base excision repair (BER) pathway^[35]. It encodes a monofunctional DNA glycosylase responsible for the recognition and excision of the deoxyadenosine misincorporated with 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in the DNA molecule. 8-OHdG arises as a consequence of the oxidation of deoxyguanosine, which is a mutagenic base because it has the ability to pair indiscriminately with deoxycytosine or deoxyadenosine, leading to an increase in somatic G>T transversions^[36]. Therefore, inactivation of *MUTYH* leads to an increase in the G>T mutation rate, which especially affects known cancer driver genes such as *KRAS* or *APC*^[37], both of which are involved in adenoma formation.

MUTYH is located on the short arm of chromosome 1 (1p34.1) and is formed by 6 exons, encoding two major transcripts, which leads to 546 and 535 amino acid isoforms^[35]. Biallelic *MUTYH* germline mutations have been associated with AP predisposition, leading to an autosomal recessive syndrome^[10]. Because it is a recessive condition, there is no vertical transmission of the disease, and family history is often absent or is presented horizontally (siblings)^[38]. *MUTYH*-associated polyposis (MAP) is characterized by the presence of 10-100 adenomatous polyps in the colon rectum resembling AFAP, but in some cases it may be accompanied by hyperplastic or serrated polyps^[39]. A minor fraction of MAP presents classical forms of the disease with the detection of more than 100 adenomas. In contrast to *APC*, no relationship has been observed between the location of the mutation and the phenotype of the disease. Mutations located throughout the entire *MUTYH* have been described in MAP, but only two missense mutations, NM_001128425: c.1187G>A p.(Gly396Asp) and c.536A>G p.(Tyr179Cys), are the most prevalent in Caucasians. Other recurrent mutations have been described in more specific populations^[40] (Figure 1B).

POLE and POLD1

POLE and *POLD1* encode the catalytic subunits of the polymerase enzyme complexes ϵ (Pol ϵ) and δ (Pol δ), respectively, which are the principal leading- and lagging-strand DNA polymerases during S phase^[41]. In addition, they also catalyze DNA synthesis in several DNA repair pathways, such as nucleotide excision repair (NER) or mismatch repair (MMR). Both *POLE* and *POLD1* encompass not only a binding DNA region and polymerase domain, but also an exonuclease domain, which confers proofreading capability by the recognition and removal of misincorporated nucleotides during DNA replication^[42]. Polymerase proofreading activity, together with high base selectivity and the MMR pathway, are the main cellular mechanisms responsible for minimizing errors during DNA replication^[43]. Inactivating point mutations within the exonuclease domains lead to proteins with an active polymerase domain that lack proofreading activity, which causes high genetic instability during DNA replication. Indeed, somatic mutations within the exonuclease domains have been described in human cancer, leading to a high increase in mutational rates^[44]. Tumor mutations in the *POLE* exonuclease domain have been identified in 1%-2% of sporadic CRC and in 7%-12% of endometrial cancers, as well as in tumors of the brain, pancreas, ovary, breast and stomach, showing ultramutated and microsatellite-stable tumors^[45].

POLE is located on the long arm of chromosome 12 (12q24.33), consists of 49 exons, and encodes a 2,286 amino acid protein. Its exonuclease domain lies between codons 268 and 471^[46]. *POLD1* is located on the long arm of chromosome 19 (19q13.33) and consists of 27 exons, encoding an 1,133 amino acid protein. Its exonuclease domain is located between codons 304 and 517^[47]. Heterozygous germline mutations within the exonuclease (proofreading) domains of both *POLE* and *POLD1* were recently associated with AAP^[13], leading to an autosomal dominant inheritance condition that is characterized by high-penetrance predisposition to multiple colorectal adenomas, large adenomas, early-onset CRC, or multiple CRCs, as well as other extracolonic tumors such as endometrial tumors^[48].

Since the first association of *POLE* and *POLD1* with AAP, several studies have validated the results and found new germline mutations in the exonuclease domains^[49-55] (Figures 1C and 1D). However, due to the small number of families described so far, accurate risk estimations and the contribution of polymerases to AP

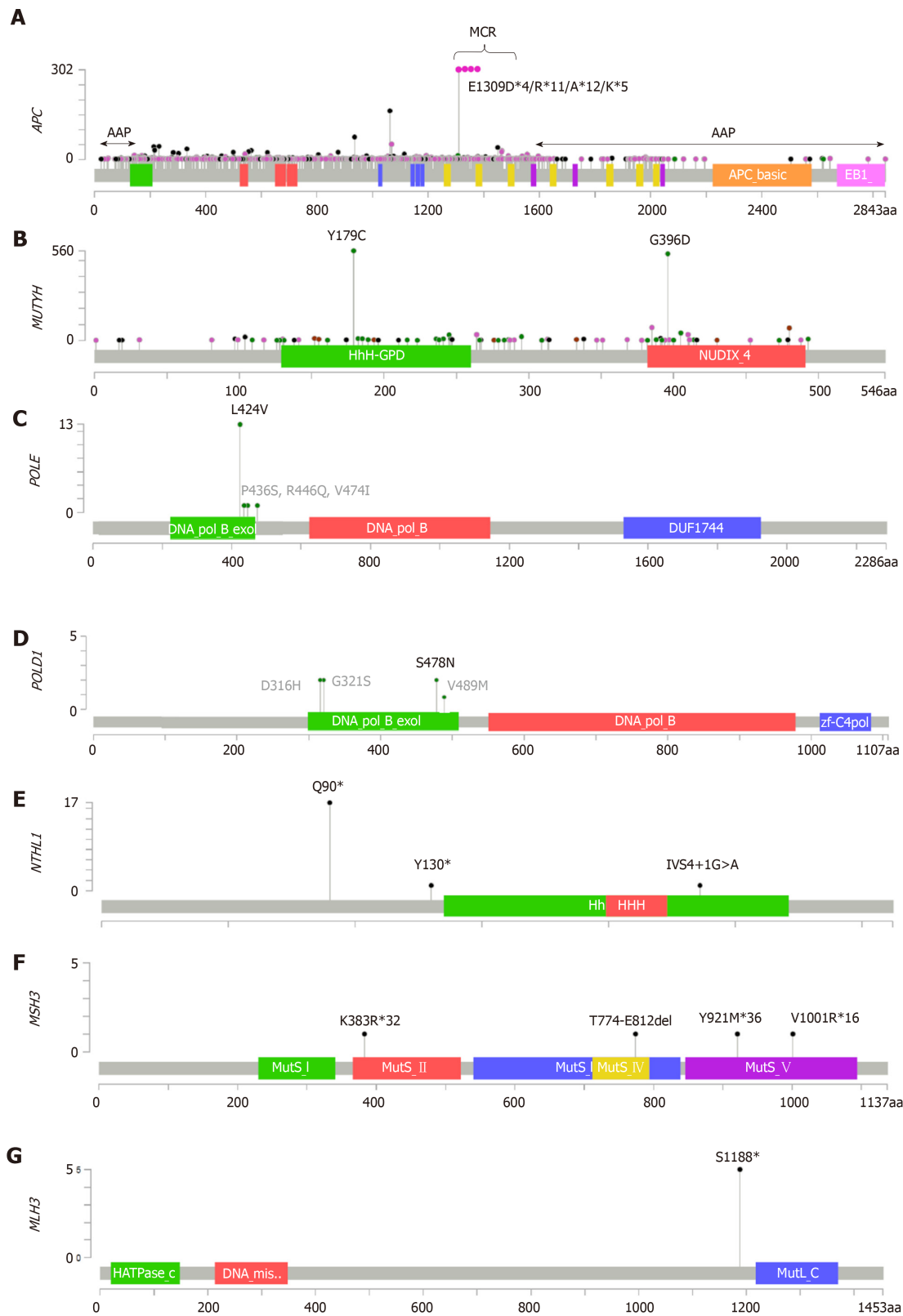


Figure 1 Distribution of germline mutations in attenuated adenomatous polyposis predisposition genes across protein domains. A: *APC* likely pathogenic and pathogenic variants described in the LOVD database^[115]. Most of the mutations are truncating variants. Mutations associated with AAP are located at both the 3'-end and 5'-end of the gene (indicated with arrows); B: *MUTYH* likely pathogenic and pathogenic mutations described in the LOVD database^[115]. The two most prevalent mutations in Caucasians are shown; C-G: *POLE*, *POLD1*, *NTHL1*, *MSH3* and *MLH3* likely pathogenic and pathogenic mutations described in the literature and associated with AAP. Unclassified variants in the polymerase proofreading *POLE* and *POLD1* domains are in gray. All lolliplots were designed with The cBio Cancer Genomics Portal^[116,117]. Mutation types are coded as follows: black dots for nonsense variants; pink dots for frameshift and splicing variants; green dots for missense mutations; brown dots for in-frame indels. Reference sequences: *APC*: NM_000038, NP_000029; *MUTYH*: NM_001128425, NP_036354; *POLE*: NM_006231, NP_006222; *POLD1*: NM_001256849, NP_001121897; *NTHL1*: NM_002528, NP_002519; *MSH3*: NM_002439, NP_002430; *MLH3*: NM_001040108, NP_001035197.

are still not well-defined.

NTHL1

Similar to *MUTYH*, *NTHL1* is a DNA repair gene involved in the BER pathway. It encodes a bifunctional N-glycosylase protein that recognizes and removes oxidized pyrimidines, such as 2'-deoxy-5-hydroxycytidine (5-OHdC) and ring-opened purines^[56]. 5-OHdC arises as a consequence of the oxidation of deoxycytosine, and it has the ability to pair both deoxyguanosine and deoxyadenine, leading to an accumulation of somatic C>T transitions, which can affect important CRC driver genes such as *APC*, *TP53* or *KRAS*, among others.

NTHL1 is located on the short arm of chromosome 16 (16p13.3), consists of 6 exons, and encodes a 312 amino acid protein^[57]. *NTHL1* homozygous or compound heterozygous germline mutations have been recently detected in AAP, delineating an autosomal recessive polyposis syndrome called *NTHL1*-associated polyposis (NAP)^[14]. All *NTHL1* biallelic carriers described so far showed AAP, and also frequently showed other extracolonic tumors such as endometrial or breast^[58]. One nonsense mutation at codon 90 seems to be involved in nearly all the biallelic carriers described; however, novel pathogenic mutations are arising as new studies emerge^[58-62] (Figure 1E).

Theoretical estimations of NAP suggest a prevalence of at least five times lower than that of MAP^[62]. Due to the limited number of NAP families described until now, the phenotypic spectrum and cancer risk estimates have not been properly established.

MSH3

MSH3 is one of the six MMR genes identified to date in eukaryotic cells^[63]. It is involved in the detection of replication errors in microsatellite sequences together with *MSH2* and *MSH6*. *MSH3* encodes an alternative binding partner for *MSH2*, which is required for the specific detection of insertion or deletion loops of two or more nucleotides^[64], as well as for double strand break repair^[65]. *MSH2* requires the binding of *MSH6* or *MSH3* to exercise its function. The *MSH2-MSH6* dimer recognizes single substitutions and small indel mispairs, whereas *MSH2-MSH3* recognizes errors in di- and larger nucleotide repeats^[66]. Inactivation of *MSH3* leads to a high microsatellite instability of di- and tetranucleotides (EMAST), which has been associated with a characteristic somatic *APC* mutation spectrum in colorectal adenoma from AAP patients^[15].

The *MSH3* gene is located in the long arm of chromosome 5 (5q14.1) and consists of 24 exons, encoding an 1,137 amino acid protein^[67]. Biallelic truncating variants in *MSH3* have been recently reported in two patients with AAP, suggesting an additional recessive subtype of colorectal AP^[15] (Figure 1F).

Until now, no more studies have validated these results, so its association with AAP and phenotype estimations remain to be defined.

MLH3

MLH3 is a member of the MutL homolog family of MMR proteins^[63]. *MLH3* dimerizes with *MLH1*, resulting in the MutLY complex, which is primarily involved in meiotic recombination rather than in mitotic genetic stability^[68].

The *MLH3* gene is located in the long arm of chromosome 14 (14q24.3), consists of 13 exons, and encodes a 1,453 amino acid protein. The homozygous truncating germline variant S1188* was first detected in an unexplained Swedish AAP case^[21], and more recently in one more AAP and two CAP subjects from Finland, suggesting a founder effect^[16] (Figure 1G). Authors hypothesize the involvement of a defective DNA damage response and/or recombination-related processes in the pathogenesis of these cases^[16].

Once again, research on additional cohorts is needed to reinforce the significance of *MLH3* as an AP predisposition gene.

OTHER CANDIDATE GENES SUGGESTED FOR AP PREDISPOSITION

Other candidate genes, including *AXIN2* (MIM#604025), *FOCAD* (MIM#614606), *GALNT12* (MIM#610290) and *BUB1* (MIM#602452) /*BUB3* (MIM#603719), are involved in the AP predisposition. However, evidence for these genes is not as thorough as those previously discussed.

AXIN2

AXIN2 encodes the Wnt pathway component conductin; it is the scaffold protein of the β -catenin destruction complex and main negative regulator of the pathway^[69]. Mutations in this gene have been described in CRC, and similar to *APC*, they increase β -catenin levels and activate β -catenin/T-cell factor signaling, thus promoting CRC development^[70]. *AXIN2* is located on the long arm of chromosome 17 (17q24.1), consists of 11 exons, and encodes two major transcripts, which leads to 843 and 778 amino acid isoforms^[69]. Deleterious germline mutations have been reported in four families, showing a strong association with oligodontia as well as gastrointestinal neoplasias^[71-73]. More recently, a novel missense variant has been described in an AAP family without signs of oligodontia or ectodermal dysplasia, suggesting the possibility of different phenotypes depending on the protein domain affected^[74]. Two other works have screened mutations for *AXIN2* in different CRC populations, both in polyposis and nonpolyposis, without any success^[75,76]. Therefore, although there is a clear association between *AXIN2* and oligodontia, further studies are needed to clarify its role in CRC syndromes, particularly with AAP.

FOCAD

FOCAD encodes a focal adhesion protein with a potential tumor suppressor function in gliomas^[77]. The *FOCAD* gene is located on the short arm of chromosome 9 (9p21.3) and is formed by 46 exons encoding an 1,801 amino acid protein^[77]. Two studies identified large deletions and truncating point mutations in a total of five CRC cases: 2/221 cases of unexplained AP^[78] and 3/1232 early-onset and familial CRC cases^[79]. Altogether, four cases had a diagnosis of AAP. Since *FOCAD* shows high expression levels in colonic epithelial cells and has been involved in cell survival and proliferation, the authors suggest a potential role of this gene in polyposis/CRC susceptibility^[79]. Regardless, this association and its contribution to AAP predisposition requires further clarification.

GALNT12

GALNT12 encodes a hexosyltransferase involved in the initial steps of the mucin-type O-glycosylation process^[80]. Alterations in this process lead to aberrant glycosylation, which has been associated with alterations in cell growth, differentiation, transformation, adhesion, metastasis and immune surveillance in cancers^[81]. *GALNT12* is highly expressed in the digestive tract, and is frequently downregulated in CRC^[82]. The *GALNT12* gene is located on the long arm of chromosome 9 (9q22.33), has 10 exons, and encodes a 581 amino acid protein^[80]. Evidence for the association between *GALNT12* and CRC has been reported^[83], but its association with familial CRC, particularly AP, remains a controversial issue. Partially inactivating variants have been detected in familial CRC along with a mild polyp burden, suggesting the involvement of this gene in CRC predisposition^[84]. However, later studies do not support its involvement in nonpolyposis and polyposis CRC predisposition^[85,86].

BUB1 and BUB3 (mitotic checkpoint serine/threonine kinases)

BUB1 and *BUB3* encode components of the spindle assembly checkpoint complex, which controls chromosome biorientation on the mitotic spindle, delaying the anaphase transition until all kinetochores are properly attached^[87]. Alterations in the activity of this complex lead to alterations in chromosome copy number, *i.e.* aneuploidies^[88]. The *BUB1* gene is located on the long arm of chromosome 2 (2q13), consists of 25 exons, and encodes a 1,085 amino acid protein, whereas *BUB3* is located on the long arm of chromosome 10 (10q26.13), has 8 exons, and encodes a 328 amino acid protein^[89]. Deleterious germline mutations in both genes have been associated not only with increased levels of constitutive aneuploidy, but also with gastrointestinal neoplasms, including adenocarcinomas and adenomas^[90,91]. Furthermore, aneuploidy caused by *Bub1* insufficiency has been proven to drive colorectal adenoma formation in mice through *APC* loss of heterozygosity (LOH)^[92]. Screening of the *BUB1* and *BUB3* genes in familial and AP CRC cohorts has shown functionally relevant germline mutations in a low fraction of patients with CRC who also presented increased levels of constitutive aneuploidy^[93,94]. However, the causality of these mutations in CRC/adenoma susceptibility remains unproven.

AAP INCIDENTAL TO OTHER CANCER RISK SYNDROMES

Although phenotypes for related CRC risk syndromes are generally well-defined, there are some overlapping features that can lead to confusion in the clinical suspicion and subsequent misdirection of the genetic testing approach. The cancer risk syndromes prone to phenotypically overlap with AAP are described below.

Lynch syndrome is the main hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome

caused by heterozygous deleterious mutations in MMR genes (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6* and *PMS2*) that can be accompanied by early-onset adenomas^[95]. Usually, the adenoma burden does not exceed 10, but it can sometimes mimic AAP.

Constitutional MMR deficiency is due to loss-of-function biallelic germline mutations in the main MMR genes. It is an aggressive recessive cancer predisposition syndrome with a wide tumor spectrum, very early age of onset and poor outcome^[96]. In addition, nearly 36% of affected subjects develop colorectal AP ranging from a few up to 100 adenomas^[97].

Hereditary mixed polyposis syndrome is characterized by multiple colon polyps of mixed pathologic subtypes and an increased risk for CRC^[98]. It is caused by large duplications in the 5' regulatory region of *GREM1* (MIM 603054), leading to an excess of coding protein expression^[99]. *GREM1* is an antagonist of bone morphogenic protein (BMP), so its overexpression can lead to inactivation of the BMP pathway and subsequent hyperproliferation of colonic epithelium^[100].

The pathogenesis of polyps in hereditary mixed polyposis syndrome likely overlaps with that of juvenile polyposis syndrome (JPS), which is caused by inactivating mutations in other genes of the BMP pathway, including *BMPRIA* (MIM 601299), *SMAD4* (MIM 600993), *ENG* (MIM 131195) and *BMP4* (MIM 112262)^[101-104]. JPS is a hamartomatous polyposis syndrome with an increased risk of CRC as well as other digestive cancers. Cancer risk arises from adenomatous components present in the juvenile polyps, which can sometimes lead to misinterpretations^[105].

Germline alterations in genes involved in the PTEN/PI3K/AKT pathway are also associated with hamartomatous polyposis syndromes. Cowden syndrome is caused by heterozygous *PTEN* (MIM 601728) germline mutations, and is characterized by the development of hamartomatous and neoplastic lesions of the skin, mucous membranes, thyroid, breast, endometrium, and brain^[106]. Although hamartomatous polyps are the most characteristic gastrointestinal lesions in Cowden syndrome, adenomatous polyps in the colon have been detected in 30% of affected individuals^[107].

In contrast, germline heterozygous mutations in *STK11* (MIM 602216) lead to Peutz-Jeghers syndrome (PJS), which is characterized by mucocutaneous pigmentation and diffuse gastrointestinal hamartomas^[108]. Similar to other hamartomatous syndromes, polyps with large adenomatous transformation areas and adenomatous polyps have been described in PJS^[109].

Currently, thanks to NGS technology and the widespread use of multigene panels for hereditary cancer testing, the detection of overlapping phenotypes between different CRC syndromes is greatly increasing, improving the diagnosis and follow-up of these patients^[12,21,110].

CONCLUSION

AAP is a highly heterogeneous disease, covering both moderate and mild forms of AP, as well as hereditary and sporadic forms, recessive and dominant conditions, and the presence or absence of other gastrointestinal or extracolonic manifestations. Thus, the genetic heterogeneity of the syndrome, where several high predisposition genes are involved in the polyposis predisposition of a minor subset of AAP, is not surprising. Two previous studies have investigated the prevalence of pathogenic mutations in large cohorts of AP, detecting approximately 6%-15% of pathogenic mutations in either the *APC* or *MUTYH* genes when analyzing patients with an adenoma burden between 10 and 99^[11,12]. These detection rates were decreased (2%-9%, respectively) when only patients between 10 and 19 adenomas were considered, showing that adenoma burden and the likelihood of detecting pathogenic mutations in *APC* and *MUTYH* are directly proportional in AAP. Regarding the prevalence of the new AP predisposition genes, Stanich and collaborators included the analysis of *POLE* and *POLD1* in their cohorts, but the contribution of these genes was scarce (one detection in 2,979 AAP cases), and it did not alter the overall mutation detection rate^[12]. The *NTHL1* contribution to AAP has been recently estimated to be five times less prevalent than that of *MUTYH*^[62]. Therefore, it seems that the heritability of AAP lies in different predisposition genes, each of which explains a small fraction of the total. Recently, other newly associated genes have been described, but the contribution of genetics to the etiology of the disease, as well as its heritability, are difficult to estimate. The high clinical and genetic heterogeneity, as well as the low prevalence of pathogenic mutations in the described genes, reflects the necessity of multigene panel testing for the effective genetic diagnosis of AAP.

To increase diagnostic sensitivity in such a heterogeneous syndrome, clinical guidelines have been developed with broad criteria, recommending genetic testing in

patients with more than 10 adenomas, even in those patients with oligopolyposis (< 10 adenomas) or early CRC^[111-113]. These criteria increase the genetic testing requests in diagnostic laboratories, thus decreasing the mutation detection rate, which makes genetic studies not cost-effective, even if they are performed by multigene panel testing. Furthermore, most of the genetic testing results are not informative, and the probability of unclassified variant detection with multigene panel testing is high, which leads to a major group of patients with anxiety and confusion. Therefore, more stringent clinical criteria, especially in the cumulative number of adenomas, should be redefined to ascertain those patients who are most likely to harbor a hereditary polyposis syndrome. The stricter the recommendation criteria for the genetic study is, the greater the mutation detection rate and lower the ambiguous results. We are in agreement with the last guideline of the American Society of Colon and Rectal Surgeons (ASCRS) that a cutoff of 20 cumulative adenomas should be used to prompt genetic counseling and testing^[114].

In conclusion, the contribution of genetics to the etiology of the disease and its heritability are difficult to estimate. The high clinical and genetic heterogeneity, as well as the low prevalence of each AP predisposing gene, reflects the necessity of multigene panel testing for an effective diagnosis of AAP. Nevertheless, the decline in diagnosis rates that comes with the decrease in adenoma burden shows the necessity of stricter clinical criteria when genetic testing is recommended for AAP predisposition genes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dra. Trinidad Caldés and Dra. Vanesa Barberán for their critical revision.

REFERENCES

- 1 Shinya H, Wolff WJ. Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. *Ann Surg* 1979; **190**: 679-683 [PMID: 518167 DOI: 10.1097/0000658-197912000-00001]
- 2 Vasen HF, Möslein G, Alonso A, Aretz S, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Bülow S, Burn J, Capella G, Colas C, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Järvinen H, Mecklin JP, Möller P, Myrthøi T, Nagengast FM, Parc Y, Phillips R, Clark SK, de Leon MP, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Tejpar S, Thomas HJ, Wijnen J. Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut* 2008; **57**: 704-713 [PMID: 18194984 DOI: 10.1136/gut.2007.136127]
- 3 Lucci-Cordisco E, Risio M, Venesio T, Genuardi M. The growing complexity of the intestinal polyposis syndromes. *Am J Med Genet A* 2013; **161A**: 2777-2787 [PMID: 24124059 DOI: 10.1002/ajmg.a.36253]
- 4 Knudsen AL, Bisgaard ML, Bülow S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* 2003; **2**: 43-55 [PMID: 14574166 DOI: 10.1023/a:1023286520725]
- 5 Mongin C, Coulet F, Lefevre JH, Colas C, Svrcek M, Eyries M, Lahely Y, Fléjou JF, Soubrier F, Parc Y. Unexplained polyposis: a challenge for geneticists, pathologists and gastroenterologists. *Clin Genet* 2012; **81**: 38-46 [PMID: 21476993 DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01676.x]
- 6 de Leon MP, Pedroni M, Roncucci L, Domati F, Rossi G, Magnani G, Pezzi A, Fante R, Bonetti LR. Attenuated polyposis of the large bowel: a morphologic and molecular approach. *Fam Cancer* 2017; **16**: 211-220 [PMID: 27783336 DOI: 10.1007/s10689-016-9938-9]
- 7 Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010; **138**: 2044-2058 [PMID: 20420945 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.054]
- 8 Aretz S, Uhlhaas S, Caspari R, Mangold E, Pagenstecher C, Propping P, Friedl W. Frequency and parental origin of de novo APC mutations in familial adenomatous polyposis. *Eur J Hum Genet* 2004; **12**: 52-58 [PMID: 14523376 DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201088]
- 9 Rustin RB, Jagelman DG, McGannon E, Fazio VW, Lavery IC, Weakley FL. Spontaneous mutation in familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1990; **33**: 52-55 [PMID: 2153067 DOI: 10.1007/bf02053203]
- 10 Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002; **30**: 227-232 [PMID: 11818965 DOI: 10.1038/ng828]
- 11 Grover S, Kastrinos F, Steyerberg EW, Cook EF, Dewanwala A, Burbidge LA, Wenstrup RJ, Syngal S. Prevalence and phenotypes of APC and MUTYH mutations in patients with multiple colorectal adenomas. *JAMA* 2012; **308**: 485-492 [PMID: 22851115 DOI: 10.1001/jama.2012.8780]
- 12 Stanich PP, Pearlman R, Hinton A, Gutierrez S, LaDuca H, Hampel H, Jasperson K. Prevalence of Germline Mutations in Polyposis and Colorectal Cancer-Associated Genes in Patients With Multiple Colorectal Polyps. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019; **17**: 2008-2015.e3 [PMID: 30557735 DOI: 10.1016/j.cgh.2018.12.008]
- 13 Palles C, Cazier JB, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, Kemp Z, Spain SL, Guarino E, Salguero I, Sherborne A, Chubb D, Carvajal-Carmona LG, Ma Y, Kaur K, Dobbins S, Barclay E, Gorman M, Martin L, Kovac MB, Humphray S; CORGI Consortium; WGS500 Consortium, Lucassen A, Holmes CC, Bentley D, Donnelly P, Taylor J, Petridis C, Roylance R, Sawyer EJ, Kerr DJ, Clark S, Grimes J, Kearsley SE, Thomas HJ, McVean G, Houlston RS, Tomlinson I. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet* 2013; **45**: 136-144 [PMID: 23263490 DOI: 10.1038/ng.2503]
- 14 Weren RD, Ligtenberg MJ, Kets CM, de Voer RM, Verwiel ET, Spruijt L, van Zelst-Stams WA,

- Jongmans MC, Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Hoischen A, Shendure J, Boyle EA, Kamping EJ, Nagtegaal ID, Tops BB, Nagengast FM, Geurts van Kessel A, van Krieken JH, Kuiper RP, Hoogerbrugge N. A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene NTHL1 causes adenomatous polyposis and colorectal cancer. *Nat Genet* 2015; **47**: 668-671 [PMID: 25938944 DOI: 10.1038/ng.3287]
- 15 **Adam R**, Spier I, Zhao B, Kloth M, Marquez J, Hinrichsen I, Kirfel J, Tafazzoli A, Horpaopan S, Uhlhaas S, Stienen D, Friedrichs N, Altmüller J, Laner A, Holzapfel S, Peters S, Kayser K, Thiele H, Holinski-Feder E, Marra G, Kristiansen G, Nöthen MM, Büttner R, Mölslein G, Betz RC, Brieger A, Lifton RP, Aretz S. Exome Sequencing Identifies Biallelic MSH3 Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *Am J Hum Genet* 2016; **99**: 337-351 [PMID: 27476653 DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.06.015]
- 16 **Olkinuora A**, Nieminen TT, Mårtensson E, Rohlin A, Ristimäki A, Koskenvuo L, Lepistö A; Swedish Extended Genetic Analysis of Colorectal Neoplasia (SWEN) Study Group, Gebre-Medhin S, Nordling M, Peltomäki P. Biallelic germline nonsense variant of MLH3 underlies polyposis predisposition. *Genet Med* 2019; **21**: 1868-1873 [PMID: 30573798 DOI: 10.1038/s41436-018-0405-x]
- 17 **Rohlin A**, Engwall Y, Fritzell K, Göransson K, Bergsten A, Einbeigi Z, Nilbert M, Karlsson P, Björk J, Nordling M. Inactivation of promoter 1B of APC causes partial gene silencing: evidence for a significant role of the promoter in regulation and causative of familial adenomatous polyposis. *Oncogene* 2011; **30**: 4977-4989 [PMID: 21643010 DOI: 10.1038/onc.2011.201]
- 18 **Nieminen TT**, Pavicic W, Porkka N, Kankainen M, Järvinen HJ, Lepistö A, Peltomäki P. Pseudoexons provide a mechanism for allele-specific expression of APC in familial adenomatous polyposis. *Oncotarget* 2016; **7**: 70685-70698 [PMID: 27683109 DOI: 10.18632/oncotarget.12206]
- 19 **Shirts BH**, Salipante SJ, Casadei S, Ryan S, Martin J, Jacobson A, Vlasnik T, Koehler K, Livingston RJ, King MC, Walsh T, Pritchard CC. Deep sequencing with intronic capture enables identification of an APC exon 10 inversion in a patient with polyposis. *Genet Med* 2014; **16**: 783-786 [PMID: 24675673 DOI: 10.1038/gim.2014.30]
- 20 **Spier I**, Drichel D, Kerick M, Kirfel J, Horpaopan S, Laner A, Holzapfel S, Peters S, Adam R, Zhao B, Becker T, Lifton RP, Perner S, Hoffmann P, Kristiansen G, Timmermann B, Nöthen MM, Holinski-Feder E, Schweiger MR, Aretz S. Low-level APC mutational mosaicism is the underlying cause in a substantial fraction of unexplained colorectal adenomatous polyposis cases. *J Med Genet* 2016; **53**: 172-179 [PMID: 26613750 DOI: 10.1136/jmedgenet-2015-103468]
- 21 **Rohlin A**, Rambech E, Kvist A, Törngren T, Eiengård F, Lundstam U, Zagoras T, Gebre-Medhin S, Borg Å, Björk J, Nilbert M, Nordling M. Expanding the genotype-phenotype spectrum in hereditary colorectal cancer by gene panel testing. *Fam Cancer* 2017; **16**: 195-203 [PMID: 27696107 DOI: 10.1007/s10689-016-9934-0]
- 22 **Cheng TH**, Gorman M, Martin L, Barclay E, Casey G, Colon Cancer Family Registry, CGEMS, Saunders B, Thomas H, Clark S, Tomlinson I. Common colorectal cancer risk alleles contribute to the multiple colorectal adenoma phenotype, but do not influence colonic polyposis in FAP. *Eur J Hum Genet* 2015; **23**: 260-263 [PMID: 24801760 DOI: 10.1038/ejhg.2014.74]
- 23 **Öines M**, Helsing LM, Bretthauer M, Emilsson L. Epidemiology and risk factors of colorectal polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2017; **31**: 419-424 [PMID: 28842051 DOI: 10.1016/j.bpg.2017.06.004]
- 24 **Fearon ER**, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**: 759-767 [PMID: 2188735 DOI: 10.1016/0092-8674(90)90186-i]
- 25 **Hankey W**, Frankel WL, Groden J. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev* 2018; **37**: 159-172 [PMID: 29318445 DOI: 10.1007/s10555-017-9725-6]
- 26 **Fodde R**. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2002; **38**: 867-871 [PMID: 11978510 DOI: 10.1016/s0959-8049(02)00040-0]
- 27 **Groden J**, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; **66**: 589-600 [PMID: 1651174 DOI: 10.1016/0092-8674(81)90021-0]
- 28 **Miyoshi Y**, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 229-233 [PMID: 1338904 DOI: 10.1093/hmg/1.4.229]
- 29 **Nagase H**, Miyoshi Y, Horii A, Aoki T, Ogawa M, Utsunomiya J, Baba S, Sasazuki T, Nakamura Y. Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992; **52**: 4055-4057 [PMID: 1319838 DOI: 10.1016/0165-4608(92)90094-0]
- 30 **Dihlmann S**, Gebert J, Siermann A, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M. Dominant negative effect of the APC1309 mutation: a possible explanation for genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1999; **59**: 1857-1860 [PMID: 10213492]
- 31 **Sieber OM**, Segditsas S, Knudsen AL, Zhang J, Luz J, Rowan AJ, Spain SL, Thirlwell C, Howarth KM, Jaeger EE, Robinson J, Volikos E, Silver A, Kelly G, Aretz S, Frayling I, Hutter P, Dunlop M, Guenther T, Neale K, Phillips R, Heinimann K, Tomlinson IP. Disease severity and genetic pathways in attenuated familial adenomatous polyposis vary greatly but depend on the site of the germline mutation. *Gut* 2006; **55**: 1440-1448 [PMID: 16461775 DOI: 10.1136/gut.2005.087106]
- 32 **Heppner Goss K**, Trzepacz C, Tuohy TM, Groden J. Attenuated APC alleles produce functional protein from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 8161-8166 [PMID: 12034871 DOI: 10.1073/pnas.112072199]
- 33 **Varesco L**, Gismondi V, Presciuttini S, Groden J, Spirio L, Sala P, Rossetti C, De Benedetti L, Bafico A, Heouaine A. Mutation in a splice-donor site of the APC gene in a family with polyposis and late age of colonic cancer death. *Hum Genet* 1994; **93**: 281-286 [PMID: 8125478 DOI: 10.1007/bf00212023]
- 34 **Jansen AM**, Crobach S, Geurts-Giele WR, van den Akker BE, Garcia MV, Ruano D, Nielsen M, Tops CM, Wijnen JT, Hes FJ, van Wezel T, Dinjens WN, Morreau H. Distinct Patterns of Somatic Mosaicism in the APC Gene in Neoplasms From Patients With Unexplained Adenomatous Polyposis. *Gastroenterology* 2017; **152**: 546-549.e3 [PMID: 27816598 DOI: 10.1053/j.gastro.2016.10.040]
- 35 **Slupska MM**, Baikalov C, Luther WM, Chiang JH, Wei YF, Miller JH. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 1996; **178**: 3885-3892 [PMID: 8682794 DOI: 10.1128/jb.178.13.3885-3892.1996]
- 36 **Shibutani S**, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 1991; **349**: 431-434 [PMID: 1992344 DOI: 10.1038/349431a0]

- 37 **Lipton L**, Halford SE, Johnson V, Novelli MR, Jones A, Cummings C, Barclay E, Sieber O, Sadat A, Bisgaard ML, Hodgson SV, Aaltonen LA, Thomas HJ, Tomlinson IP. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res* 2003; **63**: 7595-7599 [PMID: 14633673]
- 38 **Sampson JR**, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, Frayling I, Jordan S, Maher ER, Mak T, Maynard J, Pigatto F, Shaw J, Cheadle JP. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003; **362**: 39-41 [PMID: 12853198 DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13805-6]
- 39 **Boparai KS**, Dekker E, Van Eeden S, Polak MM, Bartelsman JF, Mathus-Vliegen EM, Keller JJ, van Noesel CJ. Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis. *Gastroenterology* 2008; **135**: 2014-2018 [PMID: 19013464 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.09.020]
- 40 **Poulsen ML**, Bisgaard ML. MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Curr Genomics* 2008; **9**: 420-435 [PMID: 19506731 DOI: 10.2174/138920208785699562]
- 41 **Preston BD**, Albertson TM, Herr AJ. DNA replication fidelity and cancer. *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 281-293 [PMID: 20951805 DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.10.009]
- 42 **Reha-Krantz LJ**. DNA polymerase proofreading: Multiple roles maintain genome stability. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1804**: 1049-1063 [PMID: 19545649 DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.06.012]
- 43 **Henninger EE**, Pursell ZF. DNA polymerase ϵ and its roles in genome stability. *IUBMB Life* 2014; **66**: 339-351 [PMID: 24861832 DOI: 10.1002/iub.1276]
- 44 **Cancer Genome Atlas Network**. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; **487**: 330-337 [PMID: 22810696 DOI: 10.1038/nature11252]
- 45 **Church DN**, Stelloo E, Nout RA, Valtcheva N, Depreuw J, ter Haar N, Noske A, Amant F, Tomlinson IP, Wild PJ, Lambrechts D, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Smit VT, Creutzberg CL, Bosse T. Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014; **107**: 402 [PMID: 25505230 DOI: 10.1093/jnci/dju402]
- 46 **Kesti T**, Frantti H, Syväoja JE. Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of human DNA polymerase epsilon. *J Biol Chem* 1993; **268**: 10238-10245 [PMID: 8486689 DOI: 10.1093/nar/20.4.735]
- 47 **Yang CL**, Chang LS, Zhang P, Hao H, Zhu L, Toomey NL, Lee MY. Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of human DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 735-745 [PMID: 1542570 DOI: 10.1093/nar/20.4.735]
- 48 **Briggs S**, Tomlinson I. Germline and somatic polymerase ϵ and δ mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. *J Pathol* 2013; **230**: 148-153 [PMID: 23447401 DOI: 10.1002/path.4185]
- 49 **Spier I**, Holzapfel S, Altmüller J, Zhao B, Horpaapan S, Vogt S, Chen S, Morak M, Raeder S, Kayser K, Stienen D, Adam R, Nürnberg P, Plotz G, Holinski-Feder E, Lifton RP, Thiele H, Hoffmann P, Steinke V, Aretz S. Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 2015; **137**: 320-331 [PMID: 25529843 DOI: 10.1002/ijc.29396]
- 50 **Bellido F**, Pineda M, Aiza G, Valdés-Mas R, Navarro M, Puente DA, Pons T, González S, Iglesias S, Darder E, Piñol V, Soto JL, Valencia A, Blanco I, Urioste M, Brunet J, Lázaro C, Capellá G, Puente XS, Valle L. POLE and POLD1 mutations in 529 kindred with familial colorectal cancer and/or polyposis: review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance. *Genet Med* 2016; **18**: 325-332 [PMID: 26133394 DOI: 10.1038/gim.2015.75]
- 51 **Esteban-Jurado C**, Giménez-Zaragoza D, Muñoz J, Franch-Expósito S, Álvarez-Barona M, Ocaña T, Cuatrecasas M, Carballal S, López-Cerón M, Martí-Solano M, Díaz-Gay M, van Wezel T, Castells A, Bujanda L, Balmaña J, Gonzalo V, Llort G, Ruiz-Ponte C, Cubiella J, Balaguer R, Aligué R, Castellví-Bel S. POLE and POLD1 screening in 155 patients with multiple polyps and early-onset colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; **8**: 26732-26743 [PMID: 28423643 DOI: 10.18632/oncotarget.15810]
- 52 **Rohlin A**, Eiengård F, Lundstam U, Zagoras T, Nilsson S, Edsjö A, Pedersen J, Svensson J, Skullman S, Karlsson BG, Björk J, Nordling M. GREM1 and POLE variants in hereditary colorectal cancer syndromes. *Genes Chromosomes Cancer* 2016; **55**: 95-106 [PMID: 26493165 DOI: 10.1002/gcc.22314]
- 53 **Wimmer K**, Beilken A, Nustede R, Ripperger T, Lamottke B, Ure B, Steinmann D, Reineke-Plaass T, Lehmann U, Zschocke J, Valle L, Fauth C, Kratz CP. A novel germline POLE mutation causes an early onset cancer prone syndrome mimicking constitutional mismatch repair deficiency. *Fam Cancer* 2017; **16**: 67-71 [PMID: 27573199 DOI: 10.1007/s10689-016-9925-1]
- 54 **Hansen MF**, Johansen J, Bjørnevoll I, Sylvander AE, Steinsbekk KS, Sætrum P, Sandvik AK, Drablos F, Sjørusen W. A novel POLE mutation associated with cancers of colon, pancreas, ovaries and small intestine. *Fam Cancer* 2015; **14**: 437-448 [PMID: 25860647 DOI: 10.1007/s10689-015-9803-2]
- 55 **Lorca V**, Rueda D, Martín-Morales L, Fernández-Aceñero MJ, Grolleman J, Poves C, Llovet P, Tapial S, García-Barberán V, Sanz J, Pérez-Segura P, de Voer RM, Díaz-Rubio E, de la Hoya M, Caldés T, Garre P. Contribution of New Adenomatous Polyposis Predisposition Genes in an Unexplained Attenuated Spanish Cohort by Multigene Panel Testing. *Sci Rep* 2019; **9**: 9814 [PMID: 31285513 DOI: 10.1038/s41598-019-46403-5]
- 56 **Chan MK**, Ocampo-Hafalla MT, Vartanian V, Jaruga P, Kirkali G, Koenig KL, Brown S, Lloyd RS, Dizdaroglu M, Teebor GW. Targeted deletion of the genes encoding NTH1 and NEIL1 DNA N-glycosylases reveals the existence of novel carcinogenic oxidative damage to DNA. *DNA Repair (Amst)* 2009; **8**: 786-794 [PMID: 19346169 DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.03.001]
- 57 **Imai K**, Sarker AH, Akiyama K, Ikeda S, Yao M, Tsutsui K, Shohmori T, Seki S. Genomic structure and sequence of a human homologue (NTHL1/NTH1) of Escherichia coli endonuclease III with those of the adjacent parts of TSC2 and SLC9A3R2 genes. *Gene* 1998; **222**: 287-295 [PMID: 9831664 DOI: 10.1016/S0378-1119(98)00485-5]
- 58 **Grolleman JE**, de Voer RM, Elsayed FA, Nielsen M, Weren RDA, Palles C, Ligtenberg MJL, Vos JR, Ten Broeke SW, de Miranda NFCC, Kuiper RA, Kamping EJ, Jansen EAM, Vink-Börger ME, Popp I, Lang A, Spier I, Hüneburg R, James PA, Li N, Staninova M, Lindsay H, Cockburn D, Spasic-Boskovic O, Clendenning M, Sweet K, Capellá G, Sjørusen W, Høberg-Vetti H, Jongmans MC, Neveling K, Geurts van Kessel A, Morreau H, Hes FJ, Sijmons RH, Schackert HK, Ruiz-Ponte C, Dymerska D, Lubinski J, Rivera B, Foulkes WD, Tomlinson IP, Valle L, Buchanan DD, Kenwick S, Adlard J, Dimovski AJ, Campbell IG, Aretz S, Schindler D, van Wezel T, Hoogerbrugge N, Kuiper RP. Mutational Signature Analysis Reveals NTHL1 Deficiency to Cause a Multi-tumor Phenotype. *Cancer Cell* 2019; **35**: 256-266.e5 [PMID: 30753826 DOI: 10.1016/j.ccell.2018.12.011]
- 59 **Belhadj S**, Mur P, Navarro M, González S, Moreno V, Capellá G, Valle L. Delineating the Phenotypic

- Spectrum of the NTHL1-Associated Polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017; **15**: 461-462 [PMID: 27720914 DOI: 10.1016/j.cgh.2016.09.153]
- 60 **Chubb D**, Broderick P, Dobbins SE, Frampton M, Kinnersley B, Penegar S, Price A, Ma YP, Sherborne AL, Palles C, Timofeeva MN, Bishop DT, Dunlop MG, Tomlinson I, Houlston RS. Rare disruptive mutations and their contribution to the heritable risk of colorectal cancer. *Nat Commun* 2016; **7**: 11883 [PMID: 27329137 DOI: 10.1038/ncomms11883]
- 61 **Rivera B**, Castellsagué E, Bah I, van Kempen LC, Foulkes WD. Biallelic NTHL1 Mutations in a Woman with Multiple Primary Tumors. *N Engl J Med* 2015; **373**: 1985-1986 [PMID: 26559593 DOI: 10.1056/NEJMc1506878]
- 62 **Weren RD**, Ligtenberg MJ, Geurts van Kessel A, De Voer RM, Hoogerbrugge N, Kuiper RP. NTHL1 and MUTYH polyposis syndromes: two sides of the same coin? *J Pathol* 2018; **244**: 135-142 [PMID: 29105096 DOI: 10.1002/path.5002]
- 63 **Kolodner RD**, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999; **9**: 89-96 [PMID: 10072354 DOI: 10.1016/S0959-437X(99)80013-6]
- 64 **Acharya S**, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R. hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 13629-13634 [PMID: 8942985 DOI: 10.1073/pnas.93.24.13629]
- 65 **Burdova K**, Mihaljevic B, Sturzenegger A, Chappidi N, Janscak P. The Mismatch-Binding Factor MutSβ Can Mediate ATR Activation in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Mol Cell* 2015; **59**: 603-614 [PMID: 26212458 DOI: 10.1016/j.molcel.2015.06.026]
- 66 **Haugen AC**, Goel A, Yamada K, Marra G, Nguyen TP, Nagasaka T, Kanazawa S, Koike J, Kikuchi Y, Zhong X, Arita M, Shibuya K, Oshimura M, Hemmi H, Boland CR, Koi M. Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 8465-8472 [PMID: 18922920 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0002]
- 67 **Fujii H**, Shimada T. Isolation and characterization of cDNA clones derived from the divergently transcribed gene in the region upstream from the human dihydrofolate reductase gene. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10057-10064 [PMID: 2722860 DOI: 10.1016/j.micromeso.2004.05.003]
- 68 **Wang TF**, Kleckner N, Hunter N. Functional specificity of MutL homologs in yeast: evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 13914-13919 [PMID: 10570173 DOI: 10.1073/pnas.96.24.13914]
- 69 **Dong X**, Seelan RS, Qian C, Mai M, Liu W. Genomic structure, chromosome mapping and expression analysis of the human AXIN2 gene. *Cytogenet Cell Genet* 2001; **93**: 26-28 [PMID: 11474173 DOI: 10.1159/000056942]
- 70 **Liu W**, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Qian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, Thibodeau SN. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 2000; **26**: 146-147 [PMID: 11017067 DOI: 10.1038/79859]
- 71 **Lammi L**, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, Nieminen P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 2004; **74**: 1043-1050 [PMID: 15042511 DOI: 10.1086/386293]
- 72 **Marvin ML**, Mazzoni SM, Herron CM, Edwards S, Gruber SB, Petty EM. AXIN2-associated autosomal dominant ectodermal dysplasia and neoplastic syndrome. *Am J Med Genet A* 2011; **155A**: 898-902 [PMID: 21416598 DOI: 10.1002/ajmg.a.33927]
- 73 **Renkonen ET**, Nieminen P, Abdel-Rahman WM, Moisiso AL, Järvelä I, Arte S, Jarvinen HJ, Peltomäki P. Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 5651-5659 [PMID: 16110024 DOI: 10.1200/JCO.2005.14.712]
- 74 **Rivera B**, Perea J, Sánchez E, Villapún M, Sánchez-Tomé E, Mercadillo F, Robledo M, Benítez J, Urioste M. A novel AXIN2 germline variant associated with attenuated FAP without signs of oligodontia or ectodermal dysplasia. *Eur J Hum Genet* 2014; **22**: 423-426 [PMID: 23838596 DOI: 10.1038/ejhg.2013.146]
- 75 **Peterlongo P**, Howe LR, Radice P, Sala P, Hong YJ, Hong SI, Mitra N, Offit K, Ellis NA. Germline mutations of AXIN2 are not associated with nonsyndromic colorectal cancer. *Hum Mutat* 2005; **25**: 498-500 [PMID: 15841489 DOI: 10.1002/humu.20189]
- 76 **Lipton L**, Sieber OM, Thomas HJ, Hodgson SV, Tomlinson IP, Woodford-Richens K. Germline mutations in the TGF-beta and Wnt signalling pathways are a rare cause of the "multiple" adenoma phenotype. *J Med Genet* 2003; **40**: e35 [PMID: 12676908 DOI: 10.1136/jmg.40.4.e35]
- 77 **Brockschmidt A**, Trost D, Peterziel H, Zimmermann K, Ehrler M, Grassmann H, Pfennig PN, Waha A, Wohlleber D, Brockschmidt FF, Jugold M, Hoischen A, Kalla C, Waha A, Seifert G, Knolle PA, Latz E, Hans VH, Wick W, Pfeifer A, Angel P, Weber RG. KIAA1797/FOCAD encodes a novel focal adhesion protein with tumour suppressor function in gliomas. *Brain* 2012; **135**: 1027-1041 [PMID: 22427331 DOI: 10.1093/brain/aws045]
- 78 **Horpaopan S**, Spier I, Zink AM, Altmüller J, Holzapfel S, Laner A, Vogt S, Uhlhaas S, Heilmann S, Stienen D, Pasternack SM, Keppler K, Adam R, Kayser K, Moebus S, Draaken M, Degenhardt F, Engels H, Hofmann A, Nöthen MM, Steinke V, Perez-Bouza A, Herms S, Holinski-Feder E, Fröhlich H, Thiele H, Hoffmann P, Aretz S. Genome-wide CNV analysis in 221 unrelated patients and targeted high-throughput sequencing reveal novel causative candidate genes for colorectal adenomatous polyposis. *Int J Cancer* 2015; **136**: E578-E589 [PMID: 25219767 DOI: 10.1002/ijc.29215]
- 79 **Weren RD**, Venkatchalam R, Cazier JB, Farin HF, Kets CM, de Voer RM, Vreede L, Verwiel ET, van Asseldonk M, Kamping EJ, Kiemeny LA, Neveling K, Aben KK, Carvajal-Carmona L, Nagtegaal ID, Schackert HK, Clevers H, van de Wetering M, Tomlinson IP, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N, Geurts van Kessel A, Kuiper RP. Germline deletions in the tumour suppressor gene FOCAD are associated with polyposis and colorectal cancer development. *J Pathol* 2015; **236**: 155-164 [PMID: 25712196 DOI: 10.1002/path.4520]
- 80 **Guo JM**, Zhang Y, Cheng L, Iwasaki H, Wang H, Kubota T, Tachibana K, Narimatsu H. Molecular cloning and characterization of a novel member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, pp-GalNAc-T12. *FEBS Lett* 2002; **524**: 211-218 [PMID: 12135769 DOI: 10.1016/S0014-5793(02)03007-7]
- 81 **Brockhausen I**. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep* 2006; **7**: 599-604 [PMID: 16741504 DOI: 10.1038/sj.embor.7400705]
- 82 **Guo JM**, Chen HL, Wang GM, Zhang YK, Narimatsu H. Expression of UDP-GalNAc:polypeptide N-

- acetylgalactosaminyltransferase-12 in gastric and colonic cancer cell lines and in human colorectal cancer. *Oncology* 2004; **67**: 271-276 [PMID: 15557789 DOI: 10.1159/000081328]
- 83 **Guda K**, Moinova H, He J, Jamison O, Ravi L, Natale L, Lutterbaugh J, Lawrence E, Lewis S, Willson JK, Lowe JB, Wiesner GL, Parmigiani G, Barnholtz-Sloan J, Dawson DW, Velculescu VE, Kinzler KW, Papadopoulos N, Vogelstein B, Willis J, Gerken TA, Markowitz SD. Inactivating germ-line and somatic mutations in polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 in human colon cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 12921-12925 [PMID: 19617566 DOI: 10.1073/pnas.0901454106]
- 84 **Clarke E**, Green RC, Green JS, Mahoney K, Parfrey PS, Younghusband HB, Woods MO. Inherited deleterious variants in GALNT12 are associated with CRC susceptibility. *Hum Mutat* 2012; **33**: 1056-1058 [PMID: 22461326 DOI: 10.1002/humu.22088]
- 85 **Seguí N**, Pineda M, Navarro M, Lázaro C, Brunet J, Infante M, Durán M, Soto JL, Blanco I, Capellá G, Valle L. GALNT12 is not a major contributor of familial colorectal cancer type X. *Hum Mutat* 2014; **35**: 50-52 [PMID: 24115450 DOI: 10.1002/humu.22454]
- 86 **Lorca V**, Rueda D, Martín-Morales L, Poves C, Fernández-Aceñero MJ, Ruiz-Ponte C, Llovet P, Marrupe D, García-Barberán V, García-Paredes B, Pérez-Segura P, de la Hoya M, Díaz-Rubio E, Caldés T, Garre P. Role of GALNT12 in the genetic predisposition to attenuated adenomatous polyposis syndrome. *PLoS One* 2017; **12**: e0187312 [PMID: 29095867 DOI: 10.1371/journal.pone.0187312]
- 87 **Musacchio A**. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr Biol* 2015; **25**: R1002-R1018 [PMID: 26485365 DOI: 10.1016/j.cub.2015.08.051]
- 88 **Santaguida S**, Amon A. Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; **16**: 473-485 [PMID: 26204159 DOI: 10.1038/nrm4025]
- 89 **Cahill DP**, da Costa LT, Carson-Walter EB, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Characterization of MAD2B and other mitotic spindle checkpoint genes. *Genomics* 1999; **58**: 181-187 [PMID: 10366450 DOI: 10.1006/geno.1999.5831]
- 90 **Rio Frio T**, Lavoie J, Hamel N, Geyer FC, Kushner YB, Novak DJ, Wark L, Capelli C, Reis-Filho JS, Mai S, Pastinen T, Tischkowitz MD, Marcus VA, Foulkes WD. Homozygous BUB1B mutation and susceptibility to gastrointestinal neoplasia. *N Engl J Med* 2010; **363**: 2628-2637 [PMID: 21190457 DOI: 10.1056/NEJMoa1006565]
- 91 **de Voer RM**, Hoogerbrugge N, Kuiper RP. Spindle-assembly checkpoint and gastrointestinal cancer. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1279-1280 [PMID: 21449797 DOI: 10.1056/NEJMc1101053]
- 92 **Baker DJ**, Jin F, Jegathanan KB, van Deursen JM. Whole chromosome instability caused by Bub1 insufficiency drives tumorigenesis through tumor suppressor gene loss of heterozygosity. *Cancer Cell* 2009; **16**: 475-486 [PMID: 19962666 DOI: 10.1016/j.ccr.2009.10.023]
- 93 **de Voer RM**, Geurts van Kessel A, Weren RD, Ligtenberg MJ, Smeets D, Fu L, Vreede L, Kamping EJ, Verwiel ET, Hahn MM, Ariaans M, Spruijt L, van Essen T, Houge G, Schackert HK, Sheng JQ, Venselaar H, van Ravenswaaij-Arts CM, van Krieken JH, Hoogerbrugge N, Kuiper RP. Germline mutations in the spindle assembly checkpoint genes BUB1 and BUB3 are risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterology* 2013; **145**: 544-547 [PMID: 23747338 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.06.001]
- 94 **Mur P**, De Voer RM, Olivera-Salguero R, Rodríguez-Perales S, Pons T, Setiñ F, Aiza G, Valdés-Mas R, Bertini A, Pineda M, Vreede L, Navarro M, Iglesias S, González S, Brunet J, Valencia A, Esteller M, Lázaro C, Kops GJPL, Urioste M, Puente XS, Capellá G, Valle L. Germline mutations in the spindle assembly checkpoint genes BUB1 and BUB3 are infrequent in familial colorectal cancer and polyposis. *Mol Cancer* 2018; **17**: 23 [PMID: 29448935 DOI: 10.1186/s12943-018-0762-8]
- 95 **Jass JR**, Smyrk TC, Stewart SM, Lane MR, Lanspa SJ, Lynch HT. Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 1994; **14**: 1631-1634 [PMID: 7979198 DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06701.x]
- 96 **Abedalthagafi M**. Constitutional mismatch repair-deficiency: current problems and emerging therapeutic strategies. *Oncotarget* 2018; **9**: 35458-35469 [PMID: 30459937 DOI: 10.18632/oncotarget.26249]
- 97 **Wimmer K**, Kratz CP, Vasen HF, Caron O, Colas C, Entz-Werle N, Gerdes AM, Goldberg Y, Ilencikova D, Muleris M, Duval A, Lavoine N, Ruiz-Ponte C, Slavc I, Burkhardt B, Brugieres L; EU-Consortium Care for CMMRD (C4CMMRD). Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'care for CMMRD' (C4CMMRD). *J Med Genet* 2014; **51**: 355-365 [PMID: 24737826 DOI: 10.1136/jmedgenet-2014-102284]
- 98 **Whitelaw SC**, Munday VA, Tomlinson IP, Thomas HJ, Cottrell S, Ginsberg A, Bukofzer S, Hodgson SV, Skudowitz RB, Jass JR, Talbot IC, Northover JM, Bodmer WF, Solomon E. Clinical and molecular features of the hereditary mixed polyposis syndrome. *Gastroenterology* 1997; **112**: 327-334 [PMID: 9024286 DOI: 10.1053/gast.1997.v112.pm9024286]
- 99 **Jaeger E**, Leedham S, Lewis A, Segditsas S, Becker M, Cuadrado PR, Davis H, Kaur K, Heinimann K, Howarth K; HMPS Collaboration, East J, Taylor J, Thomas H, Tomlinson I. Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nat Genet* 2012; **44**: 699-703 [PMID: 22561515 DOI: 10.1038/ng.2263]
- 100 **Jaeger E**, Webb E, Howarth K, Carvajal-Carmona L, Rowan A, Broderick P, Walthers A, Spain S, Pittman A, Kemp Z, Sullivan K, Heinimann K, Lubbe S, Domingo E, Barclay E, Martin L, Gorman M, Chandler I, Vijaykrishnan J, Wood W, Papaemmanuil E, Penegar S, Qureshi M; CORGI Consortium, Farrington S, Tenesa A, Cazier JB, Kerr D, Gray R, Peto J, Dunlop M, Campbell H, Thomas H, Houlston R, Tomlinson I. Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* 2008; **40**: 26-28 [PMID: 18084292 DOI: 10.1038/ng.2007.41]
- 101 **Howe JR**, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, Velculescu VE, Traverso G, Vogelstein B. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet* 2001; **28**: 184-187 [PMID: 11381269 DOI: 10.1038/88919]
- 102 **Howe JR**, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Järvinen HJ, Sistonen P, Tomlinson IP, Houlston RS, Bevan S, Mitros FA, Stone EM, Aaltonen LA. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 1998; **280**: 1086-1088 [PMID: 9582123 DOI: 10.1126/science.280.5366.1086]
- 103 **Howe JR**, Haidle JL, Lal G, Bair J, Song C, Pechman B, Chinnathambi S, Lynch HT. ENG mutations in MADH4/BMPRIA mutation negative patients with juvenile polyposis. *Clin Genet* 2007; **71**: 91-92 [PMID: 17204053 DOI: 10.1111/j.1399-0004.2007.00734.x]
- 104 **Lubbe SJ**, Pittman AM, Matijssen C, Twiss P, Olver B, Lloyd A, Qureshi M, Brown N, Nye E, Stamp G, Blagg J, Houlston RS. Evaluation of germline BMP4 mutation as a cause of colorectal cancer. *Hum Mutat* 2011; **32**: E1928-E1938 [PMID: 20949628 DOI: 10.1002/humu.21376]
- 105 **Schreibman IR**, Baker M, Amos C, McGarrity TJ. The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**: 476-490 [PMID: 15667510 DOI: 10.1111/j.1399-0004.2007.00734.x]

- 10.1111/j.1572-0241.2005.40237.x]
- 106 **Starink TM**, van der Veen JP, Arwert F, de Waal LP, de Lange GG, Gille JJ, Eriksson AW. The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin Genet* 1986; **29**: 222-233 [PMID: [3698331](#) DOI: [10.1111/j.1399-0004.1986.tb00816.x](#)]
- 107 **Levi Z**, Baris HN, Kedar I, Niv Y, Geller A, Gal E, Gingold R, Morgenstern S, Baruch Y, Leach BH, Bronner MP, Eng C. Upper and Lower Gastrointestinal Findings in PTEN Mutation-Positive Cowden Syndrome Patients Participating in an Active Surveillance Program. *Clin Transl Gastroenterol* 2011; **2**: e5 [PMID: [23238744](#) DOI: [10.1038/ctg.2011.4](#)]
- 108 **Hemminki A**, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Höglund P, Järvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpää M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998; **391**: 184-187 [PMID: [9428765](#) DOI: [10.1038/34432](#)]
- 109 **McGarrity TJ**, Kulin HE, Zaino RJ. Peutz-Jeghers syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000; **95**: 596-604 [PMID: [10710046](#) DOI: [10.1111/j.1572-0241.2000.01831.x](#)]
- 110 **Stoffel EM**, Koeppe E, Everett J, Ulintz P, Kiel M, Osborne J, Williams L, Hanson K, Gruber SB, Rozek LS. Germline Genetic Features of Young Individuals With Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2018; **154**: 897-905.e1 [PMID: [29146522](#) DOI: [10.1053/j.gastro.2017.11.004](#)]
- 111 **Hampel H**, Bennett RL, Buchanan A, Pearlman R, Wiesner GL; Guideline Development Group, American College of Medical Genetics and Genomics Professional Practice and Guidelines Committee and National Society of Genetic Counselors Practice Guidelines Committee. A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: referral indications for cancer predisposition assessment. *Genet Med* 2015; **17**: 70-87 [PMID: [25394175](#) DOI: [10.1038/gim.2014.147](#)]
- 112 **Hegde M**, Ferber M, Mao R, Samowitz W, Ganguly A; Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet Med* 2014; **16**: 101-116 [PMID: [24310308](#) DOI: [10.1038/gim.2013.166](#)]
- 113 **Syngal S**, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW; American College of Gastroenterology. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* 2015; **110**: 223-62; quiz 263 [PMID: [25645574](#) DOI: [10.1038/ajg.2014.435](#)]
- 114 **Herzig D**, Hardiman K, Weiser M, You N, Paquette I, Feingold DL, Steele SR. The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Management of Inherited Polyposis Syndromes. *Dis Colon Rectum* 2017; **60**: 881-894 [PMID: [28796726](#) DOI: [10.1097/DCR.0000000000000912](#)]