

*Máster de Investigación en Ciencias de la Salud 2015-2016*

UPNA



**TRABAJO  
FIN DE  
MÁSTER**

*SCREENING MOLECULAR PARA EL  
SÍNDROME DE LYNCH EN NAVARRA:  
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y  
DEMOGRÁFICAS DE LAS NUEVAS  
MUTACIONES IDENTIFICADAS.*

**Autora: María del Mar Arias Alonso**

**DIRECTORA:** Ana M<sup>a</sup> Insausti Serrano

**CODIRECTORA:** Paula Camelia Trandafir

# ÍNDICE

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	4
GLOSARIO .....	5
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	11
Resumen .....	12
Abstract.....	12
Introducción.....	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	20
Hipótesis y objetivos .....	21
METODOLOGÍA.....	22
Diseño del estudio .....	23
Población del estudio.....	23
Periodo de ejecución.....	23
Procedimiento.....	23
Metodología técnica aplicada .....	24
Análisis estadístico .....	25
RESULTADOS .....	27
1. Resultados del análisis tumoral.....	28
2. Incidencia del Síndrome de Lynch en los tumores colorrectales.....	29
3. Mutaciones identificadas.....	30
4. Comparación de las series.....	31
4.1 Número de portadores por familia.....	31
4.2 Sexo de los portadores.....	32
4.3 Distribución génica de las mutaciones .....	33

4.4 Criterios clínicos de diagnóstico.....	34
4.4.1 Criterios de Amsterdam II.....	34
3.4.2 Criterios de Bethesda.....	36
4.7 Prevalencia tumoral .....	37
4.8 Edad del primer diagnóstico tumoral.....	38
4.8 Distribución tumoral por órganos.....	39
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	53

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las cuales debo mi agradecimiento, nombraros a todas es tarea imposible:

A todas las personas que habéis pasado por el servicio de Genética de Virgen del Camino, por vuestras enseñanzas y compañía. A los técnicos de laboratorio, que tanto me habéis sufrido y me seguís sufriendo, haciéndome un hueco a pesar del poco espacio disponible. A mi maestra Isabel, de la cual he aprendido todo y más, grandísima profesional. A Yolanda, Servita y Cristina, por tener siempre una sonrisa para mí. A Edurne, compañera de fatigas... a mis compis biólogos, enfermeras y facultativas, por compartir día a día mi vida en esos ratillos del almuerzo y por integrarme desde el primer día como una más del Servicio. A los administrativos, que seguirán esperando conmigo las nuevas temporadas de nuestra serie favorita. Pero sobre todo, quiero dar las gracias de manera muy especial, a esa pareja de “ángeles” que trabaja allí, sin cuya genialidad, capacidad de trabajo y voluntad, este proyecto no hubiera sido realizado jamás. A vosotros, por abrirme las puertas de vuestra profesión, por enseñarme, guiarme y tratarme como a una hermana. Doy gracias por haberos conocido.

A Ana y Paula Camelia, por leer mis trabajos a contrarreloj, por vuestra paciencia.

A Miguel, por compartir mi vida y seguir ahí.

Al Gobierno de Navarra y a las personas de Navarrabiomed, por la financiación del proyecto.

A los pacientes, mejorar vuestra calidad de vida, es el fin último de todo esto.

A vosotros, Mario y Violeta, por la paciencia que habéis tenido con mamá, cuando no he podido dedicaros tiempo para dárselo al Máster.

A Luna, por acompañarme en mis paseos cuando necesito pensar.

## GLOSARIO

### **ADN:**

Abreviación de Ácido Desoxirribonucleico. Es la forma de almacenamiento de nuestro material genético. Todas las instrucciones para la producción de nuestras proteínas están codificadas en nuestro ADN.

### **Alelo:**

Una de las diversas formas de un gen en un locus o de un marcador particular en un cromosoma. Diferentes alelos de un gen producen variaciones en las características hereditarias.

### **Autosómico dominante:**

Un gen en uno de los autosomas, que si está presente producirá casi siempre una enfermedad o rasgo específico. La probabilidad de pasar el gen (y por lo tanto la enfermedad) a los hijos, es de 50:50 en cada embarazo

### **BRAF:**

Codifica una serina/treonina quinasa que, inducida por factores de crecimiento y mediada por RAS, activa la cascada RAS/RAF/MEK/ERK implicada en la proliferación celular.

### **Dominante:**

Una alteración en la que solo se necesita un alelo en un locus para un efecto fenotípico.

### **Esporádico:**

Por ejemplo, un cáncer que aparece en una persona que no es portadora de una mutación germinal.

**Fenotipo:**

Rasgos o características visibles de un organismo. Los rasgos fenotípicos no son necesariamente genéticos.

**Gen:**

La unidad física y funcional de la herencia, que se pasa de padres a hijos. Los genes están compuestos por ADN y la mayoría de ellos contiene la información para elaborar una proteína específica.

**Gen supresor:**

Gen cuya pérdida de función induce un fenotipo tumoral.

**Genoma:**

Componente genético de una célula.

**Genómica:**

Estudio de grupos de genes y sus interacciones funcionales.

**Genotipo:**

La información hereditaria codificada por el ADN. La identidad genética de un individuo que no se muestra como características externas.

**Germinal (mutación):**

En el ADN de cada célula y heredado de los padres.

**Heterocigoto:**

Que posee dos formas diferentes de un gen en particular; cada una heredada de cada uno de los progenitores.

**Hereditario:**

Transmitido a través de los genes, de padres a hijos.

**Homocigoto:**

Que posee dos formas idénticas de un gen específico heredadas de cada uno de los progenitores.

**Inmunohistoquímica:**

Es un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a una sustancia que se quiere identificar (anticuerpo primario).

**Línea germinal:**

Son las células que descienden de células precursoras, las cuales se desarrollan para formar óvulos y espermatozoides.

**Locus (Loci):**

Posición específica de un gen en un cromosoma.

**Microsatélite:**

Secuencias de ADN de longitud variable formada por repeticiones de una secuencia corta de nucleótidos.

**MLH1:**

Gen implicado en cánceres colorrectales, endometriales y ováricos. Se localiza en el cromosoma 3p21.3.

**MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*):**

Consiste en el cribado de determinadas regiones del ADN mediante el estudio de sondas que hibridarán en diferentes puntos de la región de interés, se ligarán 2 a 2 y posteriormente se amplificarán utilizando el mismo par de primers. Mediante un análisis de fragmentos y aprovechando la diferencia de tamaño de cada una de las sondas debido a un fragmento cebador de tamaño, se podrán identificar pérdidas o ganancias de material genético, atendiendo a la normalización de las áreas de cada pico con respecto a un control sano.

**MMR (*Mismatch Repair System*)**

Sistema de reparación del ADN que identifica los errores de apareamiento de bases que se producen tras la replicación.

**MSH2:**

Gen implicado en los cánceres colorrectal, endometriales, y ováricos. Se localiza en el cromosoma 2p22-p21.

**MSH6:**

Gen implicado en los cánceres colorrectal, endometriales, y ováricos. Se localiza en el cromosoma 2p16.

**Mutación:**

El cambio de un gen de una forma normal a otra alterada.

**Nucleótido:**

Uno de los componentes estructurales o unidades constituyentes del ADN o del ARN. Un nucleótido consta de una base (adenina, timina, guanina, uracilo o citosina), más una molécula de azúcar y una de ácido fosfórico.

**PCR (*polymerase chain reaction*):**

Proceso de amplificación de secuencias específicas de adn mediante una técnica específica.

**“Pedigree”:**

Árbol familiar.

**Penetrancia:**

La probabilidad (alta o baja) de que una enfermedad pueda ocurrir como resultado de la presencia de una mutación predisponente.



**PMS2:**

Gen implicado en los cánceres colorrectal, endometriales, y ováricos. Se localiza en el cromosoma 7p22.1.

**Proteína:**

Una molécula compuesta por una o más cadenas de aminoácidos. Las proteínas desempeñan una amplia gama de actividades vitales en la célula.

**Replicación:**

Proceso de duplicación del material genético, llevado a cabo por el ADN polimerasa.

**Síndrome de Lynch:**

Condición autosómica dominante, causada por un defecto en los genes que forman el *mismatch repair system*. Se caracteriza por el desarrollo de cáncer colorrectal y otros cánceres asociados a edades de aparición tempranas.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.

**CCR:** Cáncer colorrectal

**CCHNP:** Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis.

**MSI:** Inestabilidad de microsatélites, “*microsatellite instability*”

**MSI-H:** Alta inestabilidad de microsatélites, “*high microsatellite instability*”

**IHQ:** Inmunohistoquímica.

**MMR:** Sistema de reparación de emparejamientos incorrectos,” Mismatch *repair system*”

**SL:** Síndrome de Lynch

# RESUMEN

## RESUMEN

El Síndrome de Lynch (SL) es una patología hereditaria que predispone a sufrir cáncer colorrectal. En la Comunidad Foral de Navarra se ha desarrollado un *screening* molecular para el SL en tumores colorrectales que permita evaluar su eficacia. Para ello han sido estudiados 971 tumores de colon de manera prospectiva sin ningún criterio de selección. A cada uno de ellos se le han realizado pruebas de inestabilidad de microsatélites e inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras. En los tumores con alta inestabilidad se han realizado pruebas de metilación del promotor del gen *MLH1* y mutación V660E del gen *BRAF*. Aquellos casos que indicaban cáncer esporádico fueron descartados para el posterior estudio de los genes de SL en sangre periférica. Los resultados obtenidos se han comparado con la serie de pacientes diagnosticados por criterios clínicos a lo largo de 13 años de actividad en el Servicio de Genética del Complejo Hospitalario de Navarra. Encontramos diferencias entre ambos grupos, la sensibilidad de los criterios Ámsterdam II y Bethesda es menor en el grupo del *screening* molecular.

**Palabras clave:** Síndrome de Lynch, sistema de reparación MMR, inestabilidad de microsatélites.

## ABSTRACT

Lynch syndrome is a hereditary pathology that predisposes to colorectal cancer. A universal screening strategy for Lynch syndrome in colorectal cancer has been performed in Navarra for three years to evaluate its effectiveness. We prospectively studied a set of 971 colorectal tumors without any selection criteria. Tumors were tested

for microsatellite instability and mismatch repair proteins immunohistochemistry. V600E *BRAF* mutation and *MLH1* promoter methylation were assessed in all MSI-H tumors. *BRAF* V600E or methylated tumors were discarding for MMR genes germ line studies. Sensitivity of Amsterdam II and Bethesda criteria is lower in molecular screening group.

**Key words:** Lynch Syndrome, Mismatch repair system, microsatellite instability.

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal es un problema de primera magnitud para la salud pública, en los países occidentales. Ocupa el segundo lugar en incidencia: 1000.000 habitantes/año y con una alta tasa de mortalidad. El riesgo a padecer este tipo de tumor viene determinado por varios factores, como la alimentación, la edad, el sexo o la existencia de enfermedades intestinales inflamatorias. Además de éstos, existe una predisposición aumentada en función de las características familiares del individuo. Se ha estimado que, si bien el riesgo de desarrollar tumores colorrectales de la población general a lo largo de la vida es inferior al 5%, en el caso de tener antecedentes personales o familiares, este riesgo se ve incrementado. Un familiar de primer grado de cáncer colorrectal tiene de dos a tres veces más riesgo que la población general y aumenta en 4 veces más cuando el número de familiares son dos<sup>1</sup>. Se estima que entre el 10% y el 30% de los tumores colorrectales tienen una predisposición genética familiar aún sin identificar. Existen varias alteraciones de genes concretos que dan lugar a síndromes conocidos que incrementan este riesgo, como la Poliposis Adenomatosa Familiar y los síndromes hamartomatosos, que son causa de entre el 1 y el 2% de todos los tumores colorrectales que se diagnostican cada año. El Síndrome de Lynch es la entidad más frecuente, siendo su incidencia alrededor de 3% de todos los tumores colorrectales y se hereda de forma autosómica dominante con penetrancia incompleta<sup>2</sup>. Se caracteriza por un incremento del riesgo de cáncer de colon y de otros cánceres como endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, tracto hepatobiliar, vías urinarias, cerebro y piel. El riesgo de cáncer a lo largo de la vida para los individuos con síndrome de Lynch es: 52-82% para CCR, 25-65% para cáncer de endometrio en mujeres, 6-13% para cáncer gástrico y 4-12% para cáncer de ovario. El riesgo para otros cánceres relacionados es menor, aunque aumenta el riesgo respecto a la población general<sup>3-4</sup>.

El síndrome de Lynch está causado por alteraciones genéticas de la maquinaria de reparación del ADN conocida como *mismatch repair system* (MMR). Esta maquinaria corrige los apareamientos incorrectos que se producen como consecuencia de los errores acumulados durante la replicación. Éstos son reconocidos por un dímero llamado formado por los genes *MSH2-MSH6*, al que se une otro dímero formado por *MLH1-PMS2*. Juntos activan el sistema de reparación formado por endonucleasas,

helicadas, polimerasas y ligasas, que corrigen el error generado. Existen más genes implicados en este sistema, pero en lo que afecta al Síndrome de Lynch las mutaciones asociadas se distribuyen principalmente en estos genes <sup>5</sup>. Entre ellos la mayoría de mutaciones se producen en los genes *MLH1* y *MSH2*, mientras que en *MSH6* Y *PMS2* las mutaciones son menos frecuentes <sup>6</sup>.

La importancia de identificar estos pacientes es muy alta, debido a que con un correcto seguimiento se pueden tomar medidas preventivas encaminadas a reducir su mortalidad.

El diagnóstico de estas familias se puede iniciar basándose en la historia familiar. Para ello existen diversos criterios clínicos elaborados en este sentido, el primero de ellos se estableció en los años 90 por el *International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*. En el cual se establecieron las condiciones que tiene que cumplir una familia para hacer el estudio de las mutaciones en los genes asociados al SL. El fruto de esta colaboración se conoce como Criterios de Ámsterdam <sup>7</sup>.

#### ■ Criterios de Ámsterdam I

- Tres o más familiares con CCR:
  - Uno familiar de primer grado de los otros dos.
- Al menos dos generaciones sucesivas afectadas.
- Un CCR diagnosticado antes de los 50 años.
- Ausencia de Poliposis Adenomatosa Familiar.

Si bien estos criterios son adecuados para la selección de familias susceptibles de ser portadores de SL, se basan exclusivamente en el cáncer colorrectal. En un principio se elaboraron con la intención de poner en común una terminología clara sobre lo que se consideraba el SL y si bien fue un avance en esta patología, también fueron ampliamente criticados por no incluir los tumores extracolónicos, al ser usados en muchos casos, para excluir del estudio genético a muchas familias con una historia familiar sugestiva de cáncer hereditario. En 1999, se decidieron modificar estos criterios para incluir más tumores asociados<sup>8</sup>.



## ■ Criterios de Ámsterdam II

- Tres o más familiares con cánceres asociados a CCHNP (CCR, cáncer de endometrio, intestino delgado, uréter, o pelvis renal):
  - Cualquier combinación de histologías en 3 miembros diferentes de la familia.
  - Uno familiar de primer grado de los otros dos.
- Al menos dos generaciones sucesivas afectadas.
- Uno o más casos de cáncer antes de los 50 años.
- Ausencia de Poliposis Adenomatosa Familiar.

Estos criterios clínicos han ido variando con el tiempo para incluir prácticamente todas las características de este síndrome, con el objetivo de seleccionar más adecuadamente aquellos pacientes que deben someterse a un estudio molecular. Los criterios vigentes en la actualidad son los de Bethesda modificados<sup>9</sup>, recogidos en 2002 en un workshop realizado por el *National Cancer Institute en Bethesda, Meryland, USA*.

## ■ Guías de Bethesda revisadas

- CCR diagnosticado antes de los 50 años.
- CCR u otro cáncer asociado al síndrome de Lynch, sincrónico o metacrónico, sin tener en cuenta la edad.
- CCR con morfología de IMS (presencia de linfocitos infiltrantes de tumor, carcinoma con diferenciación mucinosa o en anillo de sello, reacción linfocitaria peritumoral de tipo Crohn-like, patrón de crecimiento medular) antes de los 60 años.
- CCR con uno o más familiares de primer grado con CCR u otro cáncer relacionado con el síndrome de Lynch, uno de los cánceres diagnosticado antes de los 50 años.
- CCR con dos o más familiares con CCR o cánceres relacionados con el síndrome de Lynch, sin tener en cuenta la edad.

Una vez definidos los pacientes que deben ser remitidos para el estudio de mutaciones surge el problema de cómo se aborda dicho estudio. Los estudios genéticos son costosos en tiempo y dinero y la tasa de detección para los Criterios de Ámsterdam es del 50% <sup>10</sup> y para los de Bethesda es inferior al 15%. Una de las características fundamentales de los tumores que tienen una pérdida de función de las principales proteínas del complejo MMR, es la pérdida de expresión en su tinción inmunohistoquímica (IHQ). Éste es un método relativamente rápido y barato, fácil de implementar y orienta el estudio hacia el gen concreto que puede estar alterado, ahorrando de este modo tiempo y dinero. Otra aproximación es el estudio de los microsatélites en tejido tumoral <sup>11</sup>. Los microsatélites son regiones de secuencias cortas, entre 1 y 9 pares de bases que se encuentran repartidas por todo el genoma. Son regiones más susceptibles de sufrir errores durante la replicación y en ellas los genes de reparación deben actuar eficientemente. Cuando existe un fallo en este mecanismo, la consecuencia lógica es una alteración en estas regiones, esto se conoce como inestabilidad microsatelital (MSI) <sup>12</sup>. Cuando el tejido tumoral muestra distintas longitudes en varios *loci* del genoma bien definidos por su estabilidad, se dice que el tumor muestra alta inestabilidad (MSI-H) <sup>13-14</sup>. Se deben analizar 5 regiones de microsatélites y el tumor debe mostrar inestabilidad al menos en dos de ellas para ser considerado (MSI-H). Se ha debatido bastante sobre la conveniencia de usar la IHQ o los microsatélites para el cribaje de los tumores y en la actualidad suele hacerse en función de la experiencia con cada una de las técnicas del laboratorio en cuestión. La Sociedad Española de Cáncer Hereditario, recomienda realizar la IHQ en pacientes que cumplen criterios de Ámsterdam II, en los cuales la probabilidad de encontrar una mutación es del 50%, sin embargo, en el caso de cumplirse los criterios de Bethesda se prefiere el estudio de los microsatélites mientras que no se haya esclarecido el papel de otros supuestos genes de reparación de bases desapareadas en el Síndrome de Lynch.

Otro de los marcadores biológicos que debe ser implementado en el cribaje de los tumores inestables con pérdida de expresión de la proteína MLH1, es el estudio de la metilación de su promotor <sup>15</sup>. La metilación es un proceso por el cual un grupo metilo se une a una base concreta del genoma. Este mecanismo suele producirse en las llamadas islas GpC, que son regiones ricas en citosina y guanina situadas en las zonas que

regulan la expresión de los genes en cada momento del ciclo celular. Cuando los promotores están metilados estos genes no están accesibles para la transcripción y por lo tanto no se produce la proteína que codifican. Por tanto, un patrón de metilación alterado en el promotor de un gen determina el mismo efecto en muchos casos que una mutación. La metilación del *MLH1* en el cáncer colorrectal es un proceso que se produce en tumores esporádicos y excepcionalmente es el resultado de un defecto en la línea germinal. Cuando esto es así, el fenotipo del paciente tiene unas características clínicas más agresivas que pueden guiarnos para testar dicha condición en sangre periférica además de en el tumor. Lo mismo ocurre con la mutación de otro gen relacionado con el ciclo celular, la mutación V600E en *BRAF*<sup>16</sup> está ligada con la pérdida de función de *MLH1* en el cáncer esporádico, aunque el mecanismo de actuación aún está sin dilucidar. En este caso no se ha encontrado esta mutación ligada a ningún portador de Síndrome de Lynch<sup>17</sup>.

En los últimos años, diferentes grupos de investigación han propuesto la conveniencia de implementar un algoritmo de análisis molecular a todos los tumores colorrectales como *screening* para la detección del SL. Tal análisis permitiría identificar tanto los casos clásicos como aquellos que no cumplan los criterios clínicos habituales. En el año 2010, el grupo de Investigación en Oncología y Cáncer Hereditario de la Fundación Miguel Servet, formado principalmente por profesionales del Complejo Hospitalario de Navarra, inició un estudio de investigación con esta propuesta, financiado dentro del marco de las ayudas a la investigación biomédica del Gobierno de Navarra. Proyecto GN 88/2010. El presente trabajo es un análisis parcial de los resultados obtenidos.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

**Hipótesis:** El *screening* molecular de todos los tumores colorrectales diagnosticados en Navarra permitirá detectar familias de Síndrome de Lynch que, por sus características clínicas y demográficas, no son identificadas mediante el esquema clásico de diagnóstico.

### **Objetivo principal:**

El presente trabajo, tiene como objetivo principal detectar si existen diferencias clínicas y demográficas entre dos series de pacientes: aquella formada por los portadores de las nuevas mutaciones identificadas y los pacientes cuyas mutaciones familiares habían sido diagnosticadas con anterioridad al inicio del *screening* molecular.

### **Objetivos secundarios:**

Como objetivos secundarios el presente trabajo pretende:

- Determinar la incidencia del SL en los casos de tumores colorrectales en la Comunidad Foral de Navarra.
- Realizar un análisis descriptivo de las familias con mutaciones nuevas identificadas en base a las siguientes variables clínicas y demográficas:
  - Distribución génica
  - Número de portadores por familia
  - Sexo de los portadores

- Criterios de Ámsterdam II
- Criterios de Bethesda
- Prevalencia tumoral
- Edad del primer diagnóstico tumoral
- Distribución tumoral por órganos

## METODOLOGÍA

## DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente estudio se ha llevado a cabo en la Comunidad Foral de Navarra y es prospectivo de base poblacional.

## POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Población de la Comunidad de Navarra en base a los siguientes criterios de inclusión:

Casos de cáncer colorrectal diagnosticados en la red pública sanitaria de la Comunidad Foral de Navarra cuyos pacientes hayan firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión: Casos de cáncer colorrectal diagnosticados en la red pública sanitaria de la Comunidad Foral de Navarra cuyos pacientes no hayan firmado el consentimiento informado.

## PERIODO DE EJECUCIÓN

Se recogieron los tumores diagnosticados desde el 15-11-2010 hasta 15-11-2013.

Durante los años 2014 y 2015 se terminaron los análisis moleculares de las muestras recogidas y se analizaron los resultados.

## PROCEDIMIENTO

Todos los pacientes con criterios de inclusión fueron invitados a participar y serán enrolados mediante la firma del consentimiento informado. Desde el momento del reclutamiento se envió desde los servicios de Anatomía Patológica de los distintos hospitales, una muestra incluida en parafina de tejido tumoral al Servicio de Genética para extracción de ADN y se procedió con la batería de pruebas moleculares y

anatomopatológicas. El paciente fue nuevamente requerido en caso de selección para estudio de mutaciones germinales, mediante la extracción de ADN en sangre periférica, en el contexto de una consulta de consejo genético en cáncer hereditario convencional. En caso resultar portador de una mutación patogénica, se ofertó a sus familiares consulta y análisis genético referente a dicha mutación.

## METODOLOGÍA TÉCNICA APLICADA

- Extracción de ADN tumoral: selección de los cortes de la biopsia, desparafinización, extracción y purificación y posterior medida espectrofotométrica de la concentración de ADN (Proteinasa K, QIAamp DNA Mini Kit, Nanodrop-ND1000).
- Estudio de Inestabilidad de microsatélites: análisis de los tamaños alélicos del panel de microsatélites BAT25, BAT26, MONO-27, NR-21, NR-24, Penta-C y Penta-D (*MSI Analysis System*), mediante amplificación (PCR) y electroforesis capilar en secuenciador automático.
- Estudio de Inmunohistoquímica de genes reparadores: Estudio de MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 con anticuerpos MLH1 a 1:10 (Becton Dickinson) MSH2 a 1:100 (Oncogene), MSH6. A 1:120 (Becton Dickinson), PMS2 a 1:100 (Becton Dickinson). Equipo A. Menarini.
- Estudio de la mutación V600E del gen *B-RAF*: Análisis de la secuencia del exón 15 donde se localiza la mutación V600E del gen *B-RAF* mediante amplificación (PCR) y secuenciación y electroforesis capilar en secuenciador automático.
- Estudio de la metilación de los promotores de los genes de reparación *MLH* y *MSH2* mediante la técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)* con la SALSA ME043.



- Extracción de ADN de sangre periférica: Extracción automática de ADN (Quick Gene 610LFujifilm, Kit QIA- AmpBlood Mini) y medida espectrofotométrica de la concentración de ADN(Nanodrop-ND1000).
- Estudio de mutaciones puntuales de los genes reparadores: Análisis de las secuencias correspondientes a los 19 exones del gen MLH1, 17 de MSH2 y los 10 exones de MSH6 mediante amplificación (PCR) y electroforesis capilar en secuenciador automático.
- Estudio de grandes reordenamientos de genes reparadores: amplificación génica mediante la técnica de *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification* (MLPA) con la SALSA P003 y P072B1, (*MLH1*, *MSH2* y *MSH6*, respectivamente). Análisis de los fragmentos por electroforesis capilar en secuenciador automático. Confirmación diagnóstica con salsas P248 y P008.
- Estudio de familiares en riesgo: Una vez identificada una mutación causal, estudio de la mutación familiar a sujetos en riesgo mediante la técnica idónea (secuenciación, MLPA).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados con el programa estadístico SPSS v22 de Windows.

Se calcularon estadísticos descriptivos (media, mínimo, máximo) para la variable cuantitativa edad y se llevó a cabo un análisis de frecuencias (Nº, %) para las variables cualitativas.

Se contrastaron las diferencias entre ambos grupos mediante el test de Chi-cuadrado de Pearson, siempre que se cumpliesen las exigencias para la utilización de esta prueba: menos de un 20% de celdas con frecuencia esperada menor que 5, y ninguna celda con frecuencia esperada menor que 1. En caso contrario se realizó el

estadístico exacto de Fisher. La variable edad fue contrastada con la prueba t para igualdad de varianzas.

# RESULTADOS

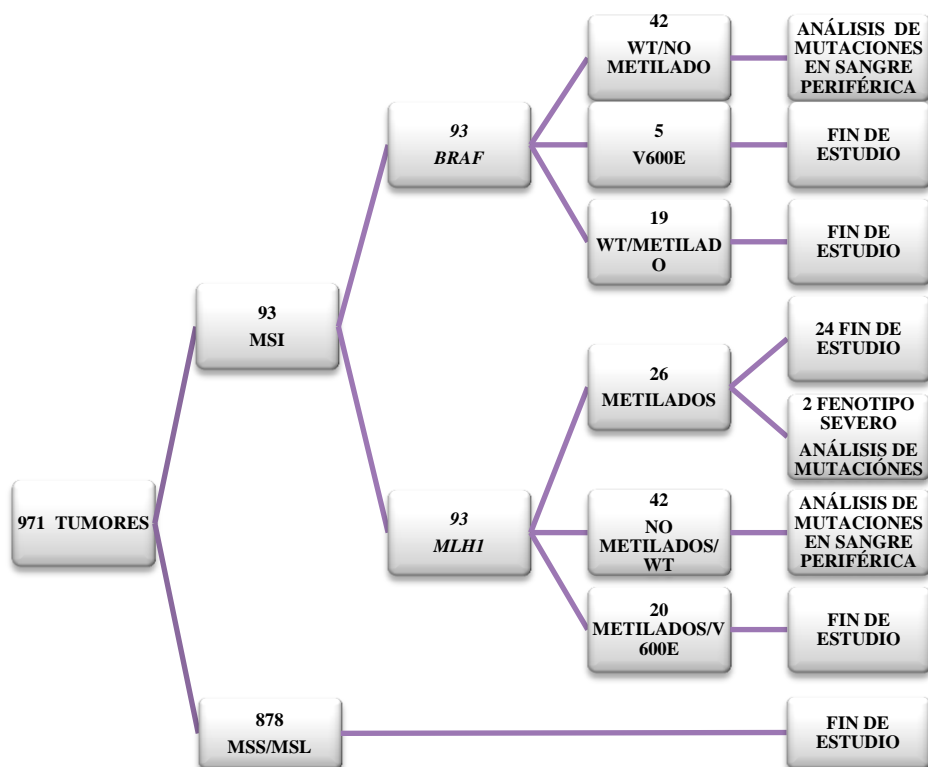
## 1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS TUMORAL

A lo largo de tres años se analizaron 971 tumores de colon, procedentes de los Servicios de Anatomía Patológica de la red sanitaria pública de la Comunidad Foral de Navarra. La incidencia del cáncer colorrectal en nuestra comunidad fue de 323,66 casos/año. Se extrajo ADN de todos ellos y se les realizó el estudio de Análisis de Inestabilidad Microsatelital, según la técnica descrita en el apartado de métodos. De todos ellos, 93 de estos tumores (9,57%) resultaron ser altamente inestables. Todos fueron analizados para la mutación V600E y la metilación del promotor del gen *MLH1*.

La incidencia de la metilación fue de 46 tumores (49,46%), de los cuales 19 también mostraron la mutación V600E (20,43%) del total. En 5 casos encontramos la mutación en el gen *BRAF* sin que existiera hipermetilación asociada.

En dos casos se encontró metilación del promotor de *MLH1* y aun así fueron citados para estudio de mutaciones en sangre periférica. El primer paciente mostraba un fenotipo personal severo asociado a cánceres metacrónicos a edades menores de 50 años y el segundo paciente tenía un diagnóstico de cáncer colorrectal a los 38 años de edad. Por tanto, el resultado del *screening* molecular arrojó una cifra de 44 tumores (4,53%) con sospecha de Síndrome de Lynch.

El siguiente gráfico, muestra los resultados del cribado molecular correspondiente a los tumores analizados a lo largo del proyecto.



**Figura 1.** Resultados del *screening* molecular de los tumores colorrectales. (Elaboración propia).

## 2. INCIDENCIA DEL SÍNDROME DE LYNCH EN LOS TUMORES COLORRECTALES

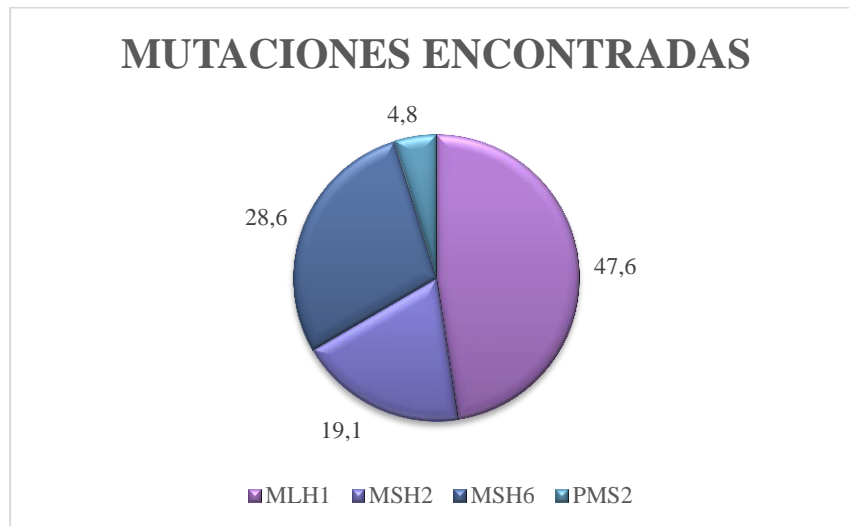
Se citaron para consulta de consejo genético a los pacientes seleccionados para el estudio molecular de mutaciones en sangre periférica. Se recogieron los datos clínicos y el pedigrí de cada uno de ellos. De los 44 acudieron a consulta 41, los otros 3 fallecieron durante el periodo de tiempo que llevó el análisis tumoral. No se encontró ninguna mutación descrita como patogénica en 18 de ellos (41,46%). Los otros 23 (58.53%) pacientes eran portadores de alguna mutación patogénica asociada al síndrome de Lynch, 8 de los cuales habían sido diagnosticados con anterioridad al inicio del estudio en el Servicio de Genética Clínica. La incidencia por tanto del SL en los tumores colorrectales se sitúa en 2,5 %

### 3. MUTACIONES IDENTIFICADAS

El número de familias identificadas con SL fue 21, debido a que existen dos familias con dos portadores cada una de ellas.

**Tabla 1.** Mutaciones identificadas

GEN	PACIENTES			FAMILIAS		
	NUEVOS	CONOCIDOS	TOTAL	NUEVOS	CONOCIDOS	TOTAL
<i>MLH1</i>	7	4	11(47,8%)	7	3	10(47,6%)
<i>MSH2</i>	2	3	5 (21,7%)	2	2	4(19,1%)
<i>MSH6</i>	5	1	6(26,1%)	5	1	6(28,6%)
<i>PMS2</i>	1	0	1(4,4%)	1	0	1(4,8%)
<b>TOTAL</b>	15	8	23(100%)	15	6	21(100%)



**Figura 2.** Distribución por genes de los portadores encontrados en el proyecto. (Elaboración propia).

## 4. COMPARACIÓN DE LAS SERIES

A continuación, se muestran los resultados de dos series:

- “**serie nuevas mutaciones**”: formada por el conjunto de las familias diagnosticadas como resultado del *screening* molecular.
- “**serie mutaciones conocidas**”: formada por el conjunto de las familias cuyo diagnóstico se hizo como resultado de las consultas de asesoramiento genético propias del Servicio Navarro de Salud.

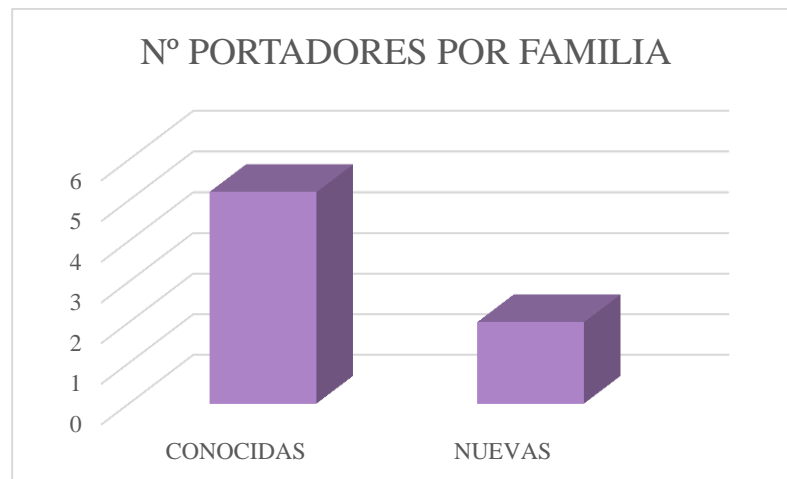
### 4.1 NÚMERO DE PORTADORES POR FAMILIA

A lo largo de 13 años de trabajo en el ámbito sanitario, el Servicio de Genética Médica identificó 44 familias con mutaciones patogénicas y 228 portadores, con un promedio de 5,4 portadores por familia.

Como producto de tres años de *screening* molecular se identificaron 21 familias, 15 de ellas nuevas, 30 portadores y un promedio de 2 portadores por familia.

**Tabla 2.** Número de portadores por familia

	FAMILIA	PORTADORES	Nº PORTADORES POR FAMILIA	P- VALOR
<b>Nuevas</b>	15	30	2	<b>p &lt; 0.01</b>
<b>Conocidas</b>	44	228	5,2	
<b>Total</b>	59	258	4,7	



**Figura 3.** Número medio de portadores por familia. (Elaboración propia).

#### 4.2 SEXO DE LOS PORTADORES

Existe mayor proporción de hombres dentro del grupo de nuevas mutaciones (63,3%), frente a la serie de conocidos (46,5%), pero estas diferencias no resultan significativas.

**Tabla 3.** Sexo de los portadores

	HOMBRE	MUJER	TOTAL	P-VALOR
<b>Conocidas</b>	106(46,5%)	122(53,5%)	228(100%)	
<b>Nuevas</b>	19(63,3%)	11(36,7%)	30(100%)	<b>p&gt;0,05</b>
<b>Total</b>	125(48,4%)	133(51,6%)	258(100%)	





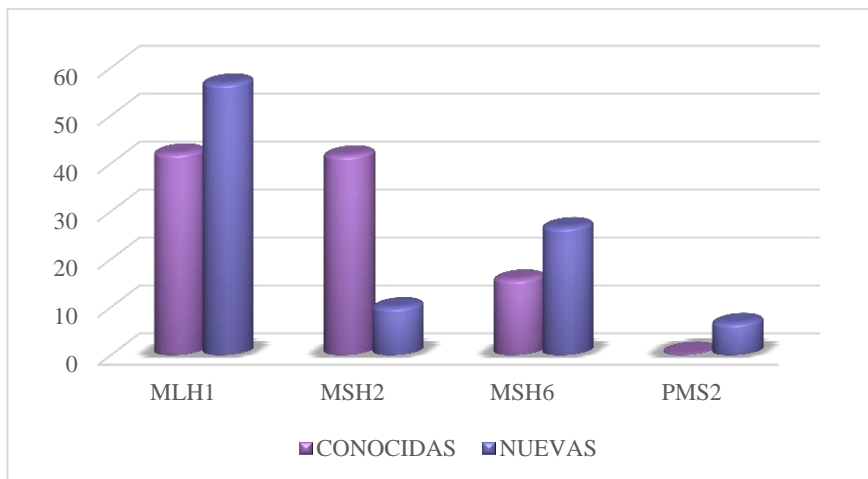
**Figura 4.** Sexo de los portadores. (Elaboración propia).

### 4.3 DISTRIBUCIÓN GÉNICA DE LAS MUTACIONES

La distribución génica de las nuevas mutaciones difiere de las anteriormente identificadas. Para los portadores de mutaciones situadas en el gen *MLH1* las frecuencias son similares en ambos grupos (56,7%) y (42,1%) respectivamente. Sin embargo, si nos fijamos en los genes *MSH2* y *MSH6*, encontramos que la distribución es totalmente opuesta. En aquellas familias ya conocidas, la distribución por genes muestra una frecuencia muy similar entre *MLH1* (42%) y *MSH2* (41,7%), seguida de *MSH6* (15,8%) y *PMS2* (0,4%). En las nuevas familias los valores de *MSH2* y *MSH6* se invierten (10%) y (26,7%) respectivamente. El análisis de ambas poblaciones muestra diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 4.** Distribución de mutaciones por genes

	HOMBRE	MUJER	TOTAL	P-VALOR
<b>Conocidas</b>	106(46,5%)	122(53,5%)	228(100%)	
<b>Nuevas</b>	19(63,3%)	11(36,7%)	30(100%)	<b>p&gt;0,05</b>
<b>Total</b>	125(48,4%)	133(51,6%)	258(100%)	



**Figura 5.** Distribución de mutaciones por genes. (Elaboración propia).

#### 4.4 CRITERIOS CLÍNICOS DE DIAGNÓSTICO

Los siguientes resultados son fruto de las entrevistas clínicas que se han realizado con los pacientes para la elaboración del pedigrí. A lo largo de la consulta de genética se pregunta al paciente por los antecedentes familiares de neoplasias y se establece si cumplen criterios clínicos para someterse a la búsqueda de mutaciones en vía germinal de los genes de reparación que están relacionados con el Síndrome de Lynch.

##### 4.4.1 CRITERIOS DE AMTERDAM II

La proporción de familias que cumplen los criterios clínicos de Ámsterdam es mayor en el grupo cuyas mutaciones han sido diagnosticadas con independencia del cribado molecular. El 66.7% de estas familias cumplen criterios de Ámsterdam II, frente al 31,8% de las familias que se han identificado fruto del *screening* molecular. Los resultados de la comparación entre ambas poblaciones son estadísticamente significativos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla adjunta.

**Tabla 5.** Familias que cumplen criterios de Ámsterdam II

AMSTERDAM II				
	NO	SI	TOTAL	p-valor
<b>Nuevas</b>	10(66,7%)	5(33,3%)	15	<b>P&lt;0.01</b>
<b>Conocidas</b>	14(31,8%)	30(68,2%)	44	
<b>Total</b>	24(40,7%)	35(59,3)	59	

El gráfico muestra el porcentaje de familias en relación a los criterios clínicos de diagnóstico anteriormente mencionados.



**Figura 6.** Familias que cumplen criterios clínicos de Ámsterdam II. (Elaboración propia).

Como se puede observar ambas poblaciones tienen una distribución de frecuencias muy similar en cuanto a datos numéricos, pero totalmente inversas en los criterios clínicos.

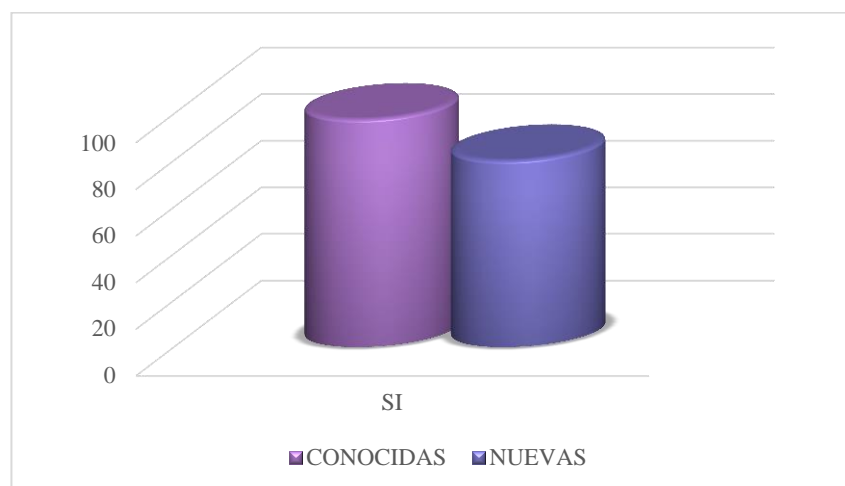
### 3.4.2 CRITERIOS DE BETHESDA

Como en el caso anterior, existe una mayor proporción de familias que cumplen los criterios de Bethesda en la serie correspondiente a mutaciones conocidas. El 80% de las familias con nuevas mutaciones identificadas cumplen los criterios clínicos de Bethesda, frente al 97,7% de las ya conocidas. El análisis estadístico realizado entre ambas poblaciones muestra diferencias significativas.

En la tabla adjunta se muestran los datos obtenidos de la comparación entre ambas poblaciones.

**Tabla 6.** Familias que cumplen criterios de Bethesda

BETHESDA				
	NO	SI	TOTAL	p-valor
<b>Nuevas</b>	3(20%)	12(80%)	15	<b>P&lt;0.05</b>
<b>Conocidas</b>	1(2,3%)	43(97,7%)	44	
<b>Total</b>	4	55	59	



**Figura 7.** Porcentaje de familias que cumplen criterios de Bethesda. (Elaboración propia).

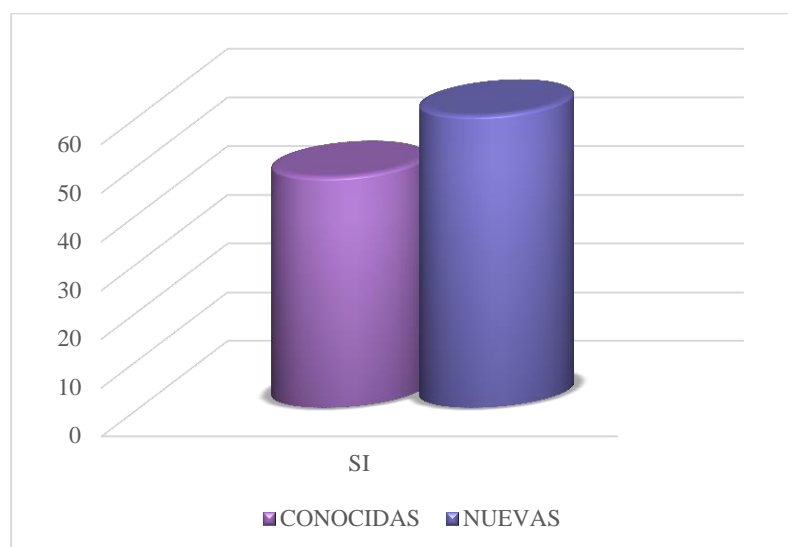
## 4.7 PREVALENCIA TUMORAL

Existe una mayor prevalencia tumoral en los portadores de las nuevas mutaciones identificadas (60%), frente a los portadores de la serie conocidas (47,4%), aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.

**Tabla 7.** Portadores que han desarrollado tumores

Tabla 7. PORTADORES QUE HAN DESARROLLADO TUMORES				
	SI	NO	TOTAL	p-valor
<b>Nuevas</b>	18(60%)	12(40%)	30	<b>P&gt;0.05</b>
<b>Conocidas</b>	108(47,4%)	120(52,6%)	228	
<b>Total</b>	110	149	258	

En la siguiente figura se muestran representados los porcentajes de ambas poblaciones a estudio.



**Figura 8.** Porcentaje de portadores con patología tumoral. (Elaboración propia).

El grupo de mutaciones nuevas muestra un mayor porcentaje de portadores que han desarrollado patología tumoral.

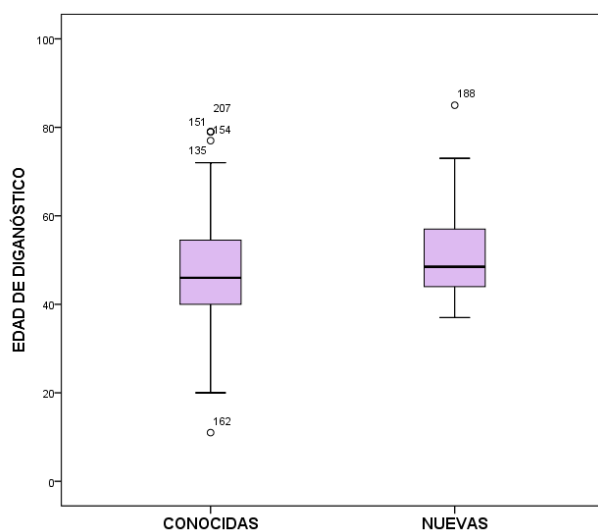
#### 4.8 EDAD DEL PRIMER DIAGNÓSTICO TUMORAL

Los pacientes de Síndrome de Lynch presentan a menudo varios cánceres a lo largo de su vida. A continuación, se muestran los resultados relativos la edad del primer diagnóstico tumoral. El grupo de mutaciones conocidas muestra una edad media de 48 años, mientras que el grupo de nuevas mutaciones sitúa su edad media en 52 años. Al realizar la prueba de la t de *student* para comparar las medias no encontramos diferencias significativas entre ambas poblaciones.

**Tabla 8.** Edad media de diagnóstico tumoral

EDAD DEL PRIMER DIAGNÓSTICO TUMORAL						
	Media	IC 95%	Desv.típ	Mínimo	Máximo	t-Student
<b>Conocidas</b>	48	45-50	13	11	79	p>0,05
<b>Nuevas</b>	52	46-58	12	38	85	

En la gráfica adjunta, podemos observar una mayor dispersión de los datos mismos en el grupo de mutaciones conocidas.



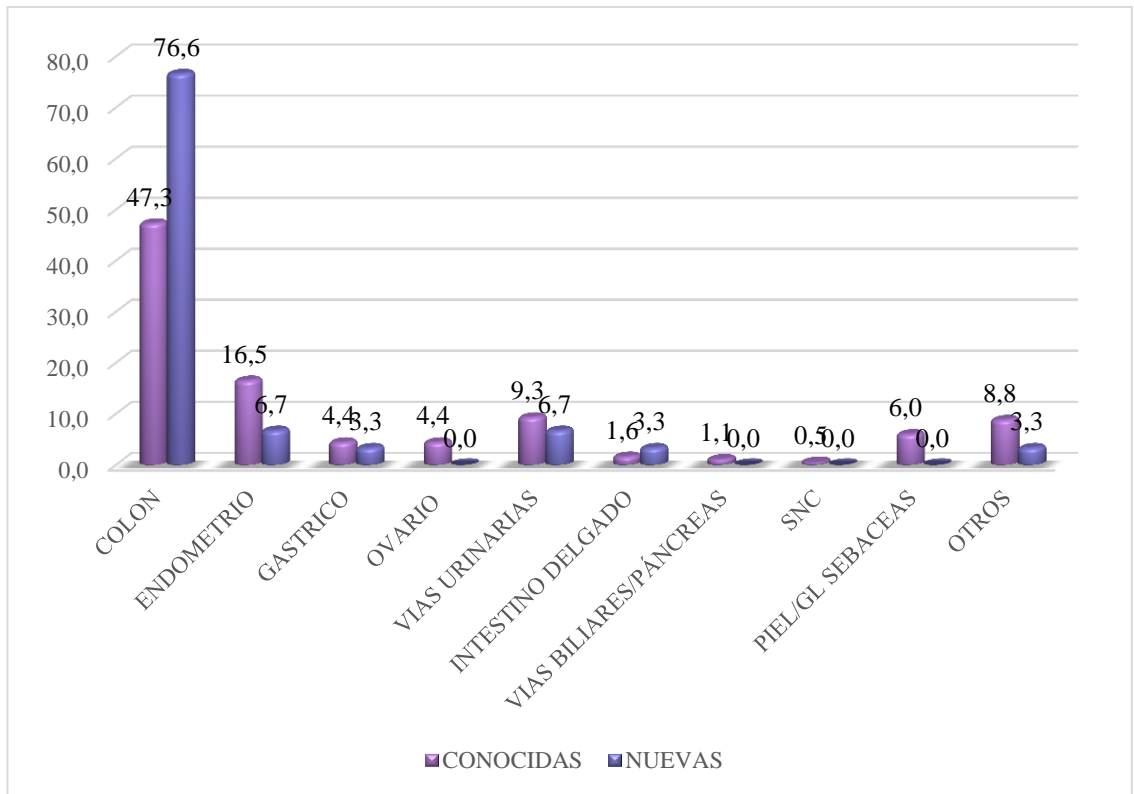
**Figura 9.** Edad media del primer diagnóstico tumoral. (Elaboración propia).

## 4.8 DISTRIBUCIÓN TUMORAL POR ÓRGANOS

La serie de mutaciones nuevas tiene una mayor prevalencia de cáncer colorrectal en comparación con la serie conocidas. Los resultados de la distribución se muestran a continuación

**Tabla 8.** Distribución por órganos

	CONOCIDAS	%	NUEVAS	%	TOTAL
COLON	86	47,25	23	76,67	109
ENDOMETRIO	30	16,48	2	6,67	32
GASTRICO	8	4,40	1	3,33	9
OVARIO	8	4,40	0	0,00	8
UROTELIAL	17	9,34	2	6,67	19
INTESTINO DELGADO	3	1,65	1	3,33	4
TRACTO BILIAR	2	1,10	0	0,00	2
SNC	1	0,55	0	0,00	1
PIEL/GL. SEBÁCEAS	11	8,79	0	0,00	11
OTROS	16	6,04	1	3,33	17
<b>TOTAL</b>	<b>182</b>	<b>100</b>	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>212</b>



**Figura 9.** Distribución tumoral por órganos. (Elaboración propia).



# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

De los 971 tumores analizados a lo largo de tres años se ha obtenido la cifra de 21 portadores de mutaciones asociadas al Síndrome de Lynch, esto demuestra que en nuestra comunidad el 2,5% de los cánceres colorrectales son de origen hereditario asociados este síndrome. Estos resultados son similares a los de otros trabajos publicados anteriormente que sitúan su incidencia en torno al 3%<sup>10,17</sup>

En lo relativo a la distribución génica de las mutaciones encontradas, los datos difieren poco de los publicados previamente en otros estudios, donde los genes más frecuentemente alterados son *MHL1*, *MSH2* sumando casi el 80% de todos los cánceres colorrectales, seguido de *MHS6* (10-20%) y en menor proporción *PMS2*<sup>6,20</sup>.

La contribución de cada uno de estos genes al síndrome de Lynch puede variar de una población a otra y tiene que ver, en muchos casos, con un efecto fundador. Si se hace esta comparación entre las dos poblaciones del estudio, las diferencias son estadísticamente significativas. Las mutaciones ya conocidas muestran las siguientes frecuencias: *MLH1* (42.1%), *MSH2* (41,7%), *MSH6* (15,8%) y *PMS2* (0,4%). La serie de nuevas mutaciones tiene una distribución muy diferente: *MLH1* (56,7%), *MSH2* (10%), *MSH6* (26,7%) y *PMS2* (6,7%). Estos resultados indican que la selección de pacientes por criterios clínicos (Ámsterdam y Bethesda) es muy eficaz en la identificación de algunos genes especialmente en el caso de *MSH2* y menos sensible para *MSH6* y *PMS2*. En este sentido es importante tener en cuenta que las nuevas mutaciones han sido identificadas en un órgano concreto, en este caso colon, y en la serie de mutaciones conocidas se han tenido en cuenta otros cánceres asociados.

Los criterios de Ámsterdam II y Bethesda, funcionan muy bien para las mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2*, pero no tienen tanta sensibilidad para mutaciones situadas en los otros dos genes. Esto puede deberse a las diferencias, en lo que a manifestaciones clínicas se refiere, que existen según qué gen porte la mutación. El fenotipo de los genes *MLH1* y *MSH2* es más severo. Si bien la probabilidad de desarrollar cáncer colorrectal es la misma en ambos casos, en el caso de *MSH2* el riesgo de desarrollar cánceres extracolónicos es mucho mayor, especialmente cáncer de

endometrio. Varios de los casos índice de la serie de mutaciones conocidas tuvieron un tumor endometrial como origen del estudio genético. En el caso de *MHS6*, la probabilidad de desarrollar cáncer endometrial también es elevada, pero concretamente en el cáncer colorrectal, su riesgo es menor que para *MLH1* y *MSH2*. Por este motivo es sorprendente la alta proporción encontrada en la serie de nuevas mutaciones.

Lo mismo ocurre con *PMS2*, cuyo riesgo a desarrollar cáncer colorrectal es inferior a los otros genes<sup>6,22</sup>. Algunos estudios publicados indican que puede existir un infradiagnóstico de estas mutaciones debido a una menor penetrancia y a una edad de aparición tumoral más tardía<sup>20-22</sup>, lo que podría explicar la baja proporción de mutaciones encontradas en estos genes cuando los pacientes que se derivan a estudios genéticos se filtran a través de criterios clínicos.

El por qué estos dos genes, *MHS6* y *PMS2*, contribuyen en menor medida al riesgo de padecer cáncer puede tener su origen en las bases moleculares del complejo de reparación<sup>23</sup>. La proteína codificada por el gen *MSH2* forma un heterodímero con otras proteínas del complejo, principalmente con *MSH6*, pero no exclusivamente. La función de este heterodímero es el reconocimiento de los emparejamientos incorrectos entre nucleótidos dentro de la hebra de ADN, una vez localizado el error, se une a la hebra y recluta el siguiente heterodímero formado por *MLH1* y *PMS2*, que se encarga de iniciar el proceso de reparación. Cuando el error comprende unas pocas pares de bases la proteína de unión es *MSH6*, sin embargo, si esto no es así, y la extensión del emparejamiento incorrecto es mayor, la proteína que forma el complejo es *MSH3*. Lo mismo ocurre con el heterodímero compuesto por *MLH1* y *PMS2*.

En ausencia de *PMS2*, existen otras proteínas como *MLH3* y *PMS1*, que pueden unirse a *MLH1* para formar parte del complejo de reparación. El por qué no se han encontrado mutaciones en *MSH3*, *PMS1* y apenas en *MLH3* todavía está sin dilucidar, lo que sí parece estar claro es que la redundancia de estas proteínas en el caso de *MSH6* y *PMS2* contribuye a que las mutaciones en estos genes sean menos agresivas.

En el caso concreto del gen *PMS2*, también existe otro factor que ha podido ser causante de la baja proporción de mutaciones que existe en la literatura como responsable del Síndrome de Lynch. El análisis de este gen es complicado debido a la existencia de un gran número de pseudogenes del mismo, que muestran una alta

homología en su secuencia con el gen original. Su análisis, históricamente, se ha restringido a unos pocos casos bien seleccionados por no estar estandarizado en la mayoría de los laboratorios. Este hecho, unido a su menor penetrancia ha podido propiciar que históricamente su contribución al síndrome de Lynch fuera muy escasa<sup>22</sup>.

También existen diferencias estadísticamente significativas para los criterios de diagnóstico clínico, tanto de Ámsterdam como de Bethesda, entre ambos grupos del presente estudio, lo cual no hace sino reforzar la hipótesis planteada con los resultados anteriores y sugiere que existen familias portadoras de este síndrome que no están siendo diagnosticadas con su aplicación.

Se ha publicado mucho en cuanto a la efectividad de estos criterios, pero casi siempre en relación a mutaciones en los genes de *MLH1* y *MSH2*, donde muestran buenos resultados<sup>24</sup>. Sin embargo, cuando se comparan estos resultados con los obtenidos estudiando además los otros dos genes del complejo, su sensibilidad se sitúa en 39% para los criterios de Ámsterdam y 72% para los criterios de Bethesda<sup>17</sup>.

Con respecto a la edad de aparición del primer tumor diagnosticado, la edad media del grupo de las nuevas mutaciones es mayor, con una media de 52 años lo que los sitúa fuera del primer criterio de Bethesda (cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años) y con una mayor dispersión de los datos hacia edades más avanzadas. Aunque no hemos encontrado diferencias significativas entre ambas poblaciones, los datos obtenidos nos sugieren una mayor dificultad en el diagnóstico clínico de estos pacientes. El pequeño tamaño muestral en el grupo de nuevas mutaciones (30 tumores), frente a 182 en el caso de conocidas puede estar influyendo en estos resultados.

Los criterios clínicos de diagnóstico tienen una limitación importante en el caso de familias con muy pocos miembros. En estas situaciones, cuando no se dispone de información familiar, la probabilidad de que estos pacientes sean remitidos a una unidad de consejo genético se ve reducida. En las familias que ya se habían diagnosticado previamente el número medio de portadores es de 5.2 frente a 2 en las nuevas familias. Estos datos sugieren, que en general, son familias más grandes y con más miembros, que tienen más posibilidades de cumplir criterios ya que es más probable que varios individuos presenten cánceres asociados y, por tanto, nos encontremos con árboles

genealógicos más extensos e informativos. En el cribado molecular universal de los tumores este factor no es determinante para su identificación.

Existe una mayor prevalencia de tumores en las nuevas mutaciones, especialmente entre los cánceres colorrectales, pero no se han encontrado diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a su distribución por órganos. La mitad de los tumores en el grupo de nuevas mutaciones tienen su origen en alteraciones del gen *MLH1*, mientras en el caso de mutaciones conocidas se deben a fundamentalmente *MHS2*.

Los resultados globales del estudio demuestran que existen diferencias entre ambas poblaciones según el esquema de diagnóstico que se haya utilizado para su identificación. El esquema basado en criterios clínicos parece seleccionar principalmente familias con mutaciones en los genes cuyo fenotipo muestra una mayor severidad. La Comunidad Foral de Navarra, tiene una larga trayectoria en el diagnóstico genético del síndrome de Lynch como demuestra el gran número de portadores identificados.

La implementación de un *screening* molecular a todos los cánceres colorrectales permitiría la identificación de portadores que, de otra forma, por sus características clínicas o fenotípicas quedarían sin diagnosticar según el esquema clásico.

Son numerosos trabajos publicados que recomiendan su implementación rutinaria en los centros sanitarios<sup>17,25,26</sup>, sin embargo, la mayor objeción suele ser el coste económico. Esta objeción ha sido rebatida por varios estudios que demuestran que es costo efectiva<sup>27</sup>. Las familias diagnosticadas se pueden beneficiar de medidas de prevención que harán disminuir el número de tumores, que de otro modo sería imposible evitar, por ejemplo, mediante histerectomía una vez cumplidos los deseos reproductivos, o la eliminación de adenomas en el contexto de las colonoscopias de seguimiento que se realizan en estos pacientes.

La implementación de este sistema, requiere la colaboración de varios servicios médicos y su organización puede ser problemática en su inicio, donde las técnicas de cribado (inmunohistoquímica, IMS, BRAF) se deben escoger según los medios y la experiencia con que cuenta cada centro sanitario.

Una limitación del presente proyecto es que el *screening* se ha realizado únicamente en colon y no se ha hecho en otros tejidos como endometrio, que es el segundo órgano con más riesgo. La inestabilidad de microsátélites aparece prácticamente en la totalidad de los tumores colorrectales de los portadores de SL. pero no es así en todos los órganos<sup>6</sup> y la conveniencia un screening similar en endometrio está siendo motivo de varios estudios en este momento<sup>28</sup>.

Por otra parte, las familias portadoras de nuevas mutaciones llevan menos años en seguimiento que las ya conocidas. Desde el momento en que se diagnostica a un paciente, se le hace un seguimiento anual en el Servicio de Genética donde se actualizan los datos clínicos y normalmente se van incorporando nuevos portadores a las familias, bien porque el paciente lo comunica a sus familiares en riesgo o porque la descendencia, en caso de que exista, alcanza la mayoría de edad y decide realizarse el estudio genético. También suelen aumentar el número de tumores, al ir cumpliendo años es más probable su aparición. Esto hace posible que datos analizados en el presente estudio como la prevalencia tumoral o el número de portadores puedan variar.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. La incidencia del cáncer colorrectal debido al Síndrome de Lynch en la Comunidad Foral de Navarra se sitúa en 2,5%.
2. Las mutaciones que han sido diagnosticadas mediante el screening molecular del cáncer colorrectal, cumplen en menor proporción los criterios clásicos de diagnóstico que las que ya habían sido identificadas previamente.
3. La distribución génica de las mutaciones diagnosticadas muestra diferencias entre ambas poblaciones.
4. El número de portadores es mayor en las familias diagnosticadas mediante criterios clínicos.
5. Las familias de las nuevas mutaciones identificadas mediante el *screening* molecular de los tumores colorrectales tienen unas características diferentes a las de las familias ya conocidas.
6. La implementación de un *screening* molecular universal a todos los cánceres colorrectales permite la identificación de portadores que no habrían sido identificados mediante el esquema clásico de diagnóstico.



# BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

1. Young GP et al, eds. Prevention and Early Detection of Colorectal Cancer. London: Saunders; 1996:171-194
2. Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. *CMAJ*. 2009; 181:273–280.
3. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*. 1993;71(3):677–685.
4. Watson P, Lynch HT. Cancer risk in mismatch repair gene mutation carriers. *Fam Cancer*. 2001; 1:57–60.
5. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin J-P, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994; 54:1645-1648
6. Peltomäki P. Update on Lynch syndrome genomics. *Familial Cancer*. 2016; 15:385-393.
7. Vasen H. F. A., Mecklin J.-P., Khan P. M., Lynch H. T. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC) *Diseases of the Colon & Rectum*. 1991;34(5):424–425.
8. Vasen H. F. A., Watson P., Mecklin J.-P., Lynch H. T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1453–1456.
9. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96:261–268
10. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352: 1851–60
11. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20:1043-1048.

12. Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer*. 2008; 7:41–52.
13. Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Järvinen H, et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res*. 2001;61(11):4545-9.
14. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*. 2005;352(18):1851-60.
15. Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999; 59:2029-2033.
16. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet*. 2004;41(9):664-8.
17. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5783-8.
18. Julié C, Trésallet C, Brouquet A, Vallot C, Zimmermann U, Mitry E, et al. Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(11):2825-35
19. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:169-74
20. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG et al. Risks of Lynch syndrome cancer for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:193-201.
21. Soto JL, Castillejo A, Barberá V et al. High prevalence of MSH6 gene mutation as causes of Lynch syndrome in Spanish patients. *Fam Cancer* 2011;10(Supl 1) S37

22. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germline *PMS2* mutations. *Gastroenterology*. 2008;135(2):419-428.
23. Li G-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 2008; 18:85–98.
24. Piñol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of Revised Bethesda Guidelines, Microsatellite Instability, and Immunohistochemistry for the Identification of Patients with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *JAMA*. 2005;293(16):1986-1994.
25. Hampel H. Point: justification for Lynch syndrome screening among all patients with newly diagnosed colorectal cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010;8(5):597-601.
26. Cohen SA, Laurino M, Bowen DJ, Upton MP, Pritchard C, Hisama F, et al. Initiation of universal tumor screening for Lynch syndrome in colorectal cancer patients as a model for the implementation of genetic information into clinical oncology practice. *Cancer*. 2016;122(3):393-401.
27. Vindigni, S.M. & Kaz, A.M. Universal Screening of Colorectal Cancers for Lynch Syndrome: Challenges and Opportunities *Digestive Diseases and Science* (2016) 61: 969.
28. Goodfellow PJ, Billingsley CC, Lankes HA, et al. Combined Microsatellite Instability, *MLH1* Methylation Analysis, and Immunohistochemistry for Lynch Syndrome Screening in Endometrial Cancers from GOG210: An NRG Oncology and Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(36):4301-4308.

# ANEXOS

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA  
PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DEL SÍNDROME DE LYNCH (SÍNDROME DE  
PREDISPOSICIÓN HEREDITARIA AL CÁNCER)**

El doctor abajo firmante me ha facilitado información sobre:

**1. INFORMACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

Una pequeña proporción (menos del 5%) de los casos de cáncer colorrectal resultan hereditarios como consecuencia de unas alteraciones genéticas transmisibles entre generaciones, que médicamente llamamos síndrome de Lynch. A pesar de su escaso número, si conocemos de antemano a las personas que presentan esta predisposición, podremos brindarles medidas de prevención que disminuirán en ellos la incidencia y gravedad de la enfermedad.

El Departamento de Salud del Gobierno de Navarra está realizando una investigación para tratar de descubrir el máximo número de personas que tienen Síndrome de Lynch en nuestra comunidad, en la que Usted puede participar. Para ello una pequeña muestra de su biopsia junto con los documentos e informes médicos necesarios, será enviada al Servicio de Genética del Hospital Virgen del Camino de Pamplona para su estudio y almacenamiento. En caso de detectarse alguna sospecha de esta enfermedad hereditaria, el Servicio de Genética, se pondrá en contacto con usted para realizarle los análisis oportunos y, en su caso, informarle de las recomendaciones de prevención adecuadas para sus familiares.

**2. RIESGOS**

Esta prueba no conlleva otros riesgos o molestias para Vd. salvo los derivados de la extracción de sangre que puede requerírsele en el futuro. Los riesgos psicológicos derivados del uso y almacenamiento de información y material genético son habitualmente bajos. Usted podría sentir que participar en estudios genéticos de investigación puede causarle ansiedad, stress y sentimiento de culpa y decepción si los resultados no son los esperados.

**3. BENEFICIOS**

Mediante el uso y almacenamiento de este material, Vd. y su familia podrían beneficiarse del uso clínico de la información genética solicitada. Aunque no es posible predecir si este estudio resultará en un beneficio personal para usted o sus familiares, la información obtenida de él, usada científicamente, resultara en un beneficio personal para otras personas con una enfermedad similar.

**4. CONFIDENCIALIDAD**

La información médica de este estudio será usada dentro de los historiales clínicos del Servicio Navarro de Salud. Los resultados de este estudio serán revelados solo a usted o al “contacto familiar” que usted podrá designar al fin de este documento. La información genética de este estudio podrá ser utilizada para su difusión en publicaciones o reuniones científicas, pero, en tal caso, ningún dato será expuesto de

manera que permita identificar específicamente a un individuo sin su autorización expresa.

## 5. VOLUNTARIEDAD

Tomar parte en este estudio es voluntario. Usted puede elegir no hacerlo o dejar de hacerlo en cualquier momento y si decide no participar, esto no afectará a la calidad de la asistencia médica que Vd. o sus familiares van a recibir.

## 6. ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Es posible que otras alteraciones genéticas relacionadas con esta enfermedad puedan ser analizadas en el futuro, por lo que, si usted lo autoriza al final de este documento, las muestras de ADN se almacenarán tras su análisis. Este material se deposita para uso clínico que mejore su asistencia o la de sus familiares, y su uso o cesión para fines de investigación en un futuro, requerirá de su aprobación mediante consentimiento informado de acuerdo con lo previsto por la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica del Gobierno de España.

DECLARO que estoy satisfecho/a con la información recibida y que comprendo los beneficios y riesgos del estudio. También comprendo que, en cualquier momento, puedo revocar el consentimiento que ahora presto. Por ello,

1. He decidido AUTORIZAR al doctor abajo firmante a la realización del estudio.
2. He decidido AUTORIZAR a que mi familiar.....  
....., con nº teléfono de contacto..... sea informado de los resultados de mi estudio.
3. He decidido AUTORIZAR el almacenamiento de mis muestras por parte del equipo investigador.

El/La médico informante/nº de  
colegiación:

El paciente:

El/la representante legal del

paciente /DNI:

en calidad de:

Pamplona, a...de.....20..

Pamplona, a...de.....20..

**TÍTULO:**

SCREENING MOLECULAR PARA EL SÍNDROME DE LYNCH EN  
NAVARRA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE  
LAS NUEVAS VARIANTES IDENTIFICADAS

MOLECULAR SCREENING FOR LYNCH SYNDROME IN  
NAVARRA: DEMOGRAPHIC AND CLICAL CHARACTERISTICS OF  
NEW VARIANTS IDENTIED

**AUTORES:**

Sira Moreno Laguna. Complejo Hospitalario de Navarra.

[sira.moreno.laguna@navarra.es](mailto:sira.moreno.laguna@navarra.es)

Marta Montes Díaz. Complejo Hospitalario de Navarra. [marta.montes.diaz@navarra.es](mailto:marta.montes.diaz@navarra.es)

María Luisa Dorronsoro Auzmendi. Complejo Hospitalario de Navarra.

[maria.dorronsoro.auzmeni@navarra.es](mailto:maria.dorronsoro.auzmeni@navarra.es)

Ana Guerra Lacunza. Complejo Hospitalario de Navarra.

[ana.guerra.lacunza@navarra.es](mailto:ana.guerra.lacunza@navarra.es)

Isabel Janices Zapata. Complejo Hospitalario de Navarra. [ijanicez@navarra.es](mailto:ijanicez@navarra.es)

Ana Insausti. Universidad Pública de Navarra. [ana.insausti@unavarra.es](mailto:ana.insausti@unavarra.es)

Paula Camelia Trandafir. Universidad Pública de Navarra

[paulacamelia.trandafir@unavarra.es](mailto:paulacamelia.trandafir@unavarra.es)

Angel Alonso Sánchez. Complejo Hospitalario de Navarra.

[angel.alonso.sanchez@navarra.es](mailto:angel.alonso.sanchez@navarra.es)



**PRIMER AUTOR:**

María del Mar Arias Alonso. Navarrabiomed-Fundación Miguel Servet.

[mm.arias.alonso@navarra.es](mailto:mm.arias.alonso@navarra.es). Teléfono: 848429243

Servicio de Genética. Complejo Hospitalario de Navarra.

Calle Irunlarrea, nº 3. 31008. Pamplona. Navarra.

**FINANCIACIÓN DEL TRABAJO:**

El presente trabajo se ha financiado dentro del marco de las ayudas a la investigación biomédica del Gobierno de Navarra. Proyecto GN 88/2010.

## INTRODUCCIÓN:

El cáncer colorrectal es un problema de primera magnitud para la salud pública, en los países occidentales. Ocupa el segundo lugar en incidencia: 1000.000 habitantes/año y con una alta tasa de mortalidad. Se ha estimado que, si bien el riesgo de desarrollar tumores colorrectales de la población general a lo largo de la vida es inferior al 5%, en el caso de tener antecedentes personales o familiares, este riesgo se ve incrementado<sup>1</sup>. Existen varias alteraciones de genes concretos que causan predisposición a sufrir este tipo de tumores, siendo el Síndrome de Lynch la entidad más frecuente, su incidencia causa el 3% de todos los tumores colorrectales y se hereda de forma autosómica dominante con penetrancia incompleta<sup>2</sup>. Se caracteriza por un incremento del riesgo de cáncer de colon principalmente, pero también de otros cánceres como endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, tracto hepatobiliar, vías urinarias, cerebro y piel<sup>3-4</sup>.

El síndrome de Lynch está causado por alteraciones genéticas de la maquinaria de reparación del ADN conocida como *mismatch repair system* (MMR). Esta maquinaria corrige los apareamientos incorrectos que se producen como consecuencia de los errores acumulados durante la replicación. Existen varios genes implicados en este sistema, pero en lo que afecta al SL las mutaciones asociadas se distribuyen principalmente en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*<sup>5-6</sup>. La importancia de identificar estos pacientes es muy alta, debido a que con un correcto seguimiento se pueden tomar medidas preventivas encaminadas a reducir su mortalidad. El diagnóstico de estas familias se puede iniciar basándose en la historia familiar. Para ello existen diversos criterios clínicos elaborados en este sentido, el primero de ellos se estableció en los años 90 por el *International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*. En el cual se establecieron las condiciones que tiene que cumplir una familia para hacer el estudio de las mutaciones en los genes asociados al SL. El fruto de esta

BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

colaboración se conoce como Criterios de Ámsterdam <sup>7</sup>. Si bien estos criterios son adecuados para la selección de familias susceptibles de ser portadores de SL, se basan exclusivamente en el cáncer colorrectal y aunque fue un avance en esta patología, también fueron ampliamente criticados por no incluir los tumores extracolónicos. En 1999, se decidieron modificar estos criterios para incluir más tumores asociados dando lugar a los criterios de Ámsterdam II<sup>8</sup>:

- Tres o más familiares con cánceres asociados a CCHNP (CCR, cáncer de endometrio, intestino delgado, uréter, o pelvis renal):
  - Cualquier combinación de histologías en 3 miembros diferentes de la familia.
  - Uno familiar de primer grado de los otros dos.
- Al menos dos generaciones sucesivas afectadas.
- Uno o más casos de cáncer antes de los 50 años.
- Ausencia de Poliposis Adenomatosa Familiar.

Estos criterios clínicos han ido variando con el tiempo para incluir prácticamente todas las características de este síndrome, con el objetivo de seleccionar más adecuadamente aquellos pacientes que deben someterse a un estudio molecular. Los criterios vigentes en la actualidad son los de Bethesda modificados, recogidos en 2002 en un workshop realizado por el *National Cancer Institute en Bethesda, Meryland, USA*<sup>9</sup>:

- CCR diagnosticado antes de los 50 años.
- CCR u otro cáncer asociado al síndrome de Lynch, sincrónico o metacrónico, sin tener en cuenta la edad.

BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

- CCR con morfología de IMS (presencia de linfocitos infiltrantes de tumor, carcinoma con diferenciación mucinosa o en anillo de sello, reacción linfocitaria peritumoral de tipo Crohn-like, patrón de crecimiento medular) antes de los 60 años.
- CCR con uno o más familiares de primer grado con CCR u otro cáncer relacionado con el síndrome de Lynch, uno de los cánceres diagnosticado antes de los 50 años.
- CCR con dos o más familiares con CCR o cánceres relacionados con el síndrome de Lynch, sin tener en cuenta la edad.

Una vez definidos los pacientes que deben ser remitidos para el estudio de mutaciones surge el problema de cómo se aborda dicho estudio. Los estudios genéticos son costosos en tiempo y dinero y la tasa de detección para los Criterios de Ámsterdam es del 50% <sup>10</sup> y para los de Bethesda es inferior al 15%. Una de las principales características de los tumores que tienen una pérdida de función de las principales proteínas del complejo MMR, es la pérdida de expresión en su tinción inmunohistoquímica (IHQ). Éste es un método relativamente rápido y barato, fácil de implementar y nos orienta hacia el gen concreto que puede estar alterado, ahorrando de este modo tiempo y dinero. Otra aproximación es el estudio de los microsatélites en tejido tumoral <sup>11</sup>. Los microsatélites son regiones de secuencias cortas, entre 1 y 9 pares de bases que se encuentran repartidas por todo el genoma. Son regiones más susceptibles de sufrir errores durante la replicación y en ellas los genes de reparación deben actuar eficientemente. Cuando existe un fallo en este mecanismo, la consecuencia lógica es una alteración en estas regiones, esto se conoce como inestabilidad microsatelital (MSI) <sup>12</sup>. Cuando el tejido tumoral muestra distintas longitudes en varios *loci* del genoma bien definidos por su estabilidad, se dice que el tumor muestra alta inestabilidad (MSI-H) <sup>13-14</sup>. Se deben analizar 5 regiones de microsatélites y el tumor debe mostrar inestabilidad al menos en dos de ellas para ser considerado MSI-H. Se ha debatido bastante sobre la conveniencia de usar la IHC o los microsatélites para el cribaje de los tumores y en la actualidad suele hacerse en función de la experiencia con cada una de las técnicas del laboratorio en

## BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA SANITARIO DE NAVARRA

cuestión. Otro de los marcadores biológicos que debe ser implementado en el cribaje de los tumores inestables con pérdida de expresión de la proteína *MLH1*, es el estudio de la metilación de su promotor<sup>15</sup>. La metilación del *MLH1* en el cáncer colorrectal es un proceso que se produce en tumores esporádicos y excepcionalmente es el resultado de un defecto en la línea germinal. Cuando esto es así, el fenotipo del paciente tiene unas características clínicas más agresivas que pueden guiarnos para testar dicha condición en sangre periférica además de en el tumor. Lo mismo ocurre con la mutación de otro gen relacionado con el ciclo celular, la mutación V600E en *BRAF*<sup>16</sup> está ligada con la pérdida de función de *MLH1* en el cáncer esporádico, aunque el mecanismo de actuación aún está sin dilucidar. En este caso no se ha encontrado esta mutación ligada a ningún portador de Síndrome de Lynch<sup>17</sup>.

En los últimos años diferentes grupos de investigación han propuesto la conveniencia de implementar un algoritmo de análisis molecular a todos los tumores colorrectales como screening para la detección del SL. Tal análisis permitiría identificar tanto los casos clásicos como aquellos que no cumplan los criterios clínicos habituales. En el año 2010, el grupo de Investigación en Oncología y Cáncer Hereditario de la Fundación Miguel Servet, formado principalmente por profesionales del Complejo Hospitalario de Navarra, inició un estudio de investigación con esta propuesta. El presente trabajo es un análisis parcial de los resultados obtenidos.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

En el presente estudio se incluyeron todos los cánceres colorrectales diagnosticados en la Comunidad Foral de Navarra, desde noviembre de 2010 a noviembre de 2013.

A todos los pacientes se les invitó a participar en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado. A partir de ese momento una muestra de su biopsia

BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

parafinada fue sometida la siguiente batería de pruebas moleculares con el fin de determinar la probabilidad de un origen hereditario:

- Estudio de Inmunohistoquímica de genes reparadores: Estudio de MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 con anticuerpos MLH1 a 1:10 (Becton Dickinson) MSH2 a 1:100 (Oncogene), MSH6. A 1:120 (Becton Dickinson), PMS2 a 1:100 (Becton Dickinson). Equipo A. Menarini.
- Extracción de ADN tumoral: Selección de los cortes de la biopsia, desparafinización, extracción y purificación y posterior medida espectrofotométrica de la concentración de ADN (Proteinasa K, QIAamp DNA Mini Kit, Nanodrop-ND1000).
- Estudio de Inestabilidad de microsatélites: Análisis de los tamaños alélicos del panel de microsatélites BAT25, BAT26, MONO-27, NR-21, NR-24, Penta-C y Penta-D (MSI Analysis System), mediante amplificación (PCR) y electroforesis capilar en secuenciador automático ABI-3500 Applied Biosystems. Aquellos tumores que mostraron inestabilidad de 2 o más marcadores fueron clasificados como “alta inestabilidad” y se les sometió al estudio de la metilación del promotor del gen *MLH1* y la mutación V660E del gen *BRAF*.
- Estudio de la mutación V600E del gen *B-RAF*: Análisis de la secuencia del exón 15 donde se localiza la mutación V600E del gen *B-RAF* mediante amplificación (PCR) y secuenciación y electroforesis capilar en secuenciador automático ABI-3500 Applied Biosystems.
- Estudio de la metilación de los promotores de los genes de reparación *MLH1* y *MSH2* mediante la técnica de *Multiplex Probe Ligation-dependent Amplification* (MLPA) con la SALSA ME043 de Mrc-Holland, PCR y electroforesis capilar en secuenciador automático ABI-3500 Applied Biosystems.

Se citó a aquellos pacientes cuyos tumores mostraron alta inestabilidad, metilación normal de *MLH1* y *BRAF* normal, para acudir a la consulta de consejo genético, donde se recogieron sus antecedentes personales y familiares. Aquellos que

## BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA SANITARIO DE NAVARRA

mostraron conformidad con el estudio genético de mutaciones en vía germinal, fueron sometidos a una extracción de sangre periférica para su posterior análisis. En dos casos los tumores mostraron hipermetilación del promotor de *MLH1*, pero aun así se citó a dichos pacientes por las características llamativas de sus antecedentes personales. En estos casos se volvió a repetir la técnica de MLPA para el estudio de secuencias metiladas, pero en esta ocasión en sangre periférica.

- Extracción de ADN de sangre periférica: Extracción automática de ADN (Quick Gene 610LFujifilm, Kit QIA- AmpBlood Mini) y medida espectrofotométrica de la concentración de ADN (Nanodrop-ND1000).
- Estudio de mutaciones puntuales de los genes reparadores: Análisis de las secuencias correspondientes a los 19 exones del gen *MLH1*, 17 de *MSH2* y los 10 exones de *MSH6* mediante amplificación (PCR) y electroforesis capilar en secuenciador automático ABI-3500 Applied Biosystems. Comenzando por los genes que causan pérdida de expresión en la tinción histológica.
- Estudio de grandes reordenamientos de genes reparadores: Amplificación génica mediante la técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) con la SALSA P003 y P072B1, (*MLH1*, *MSH2* y *MSH6*, respectivamente). Análisis de los fragmentos por electroforesis capilar en secuenciador automático ABI-3500 Applied Biosystems. Confirmación diagnóstica con salsas P248 y P008.

Una vez identificada una mutación causal, estudio de la mutación familiar a sujetos en riesgo mediante la técnica idónea (secuenciación, MLPA).

Se analizaron variables clínicas y demográficas el grupo de portadores de mutaciones nuevas identificadas mediante este sistema y de la población histórica de casos diagnosticados en nuestra comunidad. Estos resultados fueron analizados con el programa estadístico SPSS v22 de Windows.

Se calcularon estadísticos descriptivos (media, mínimo, máximo) para la variable cuantitativa edad y se llevó a cabo un análisis de frecuencias (Nº, %) para las variables cualitativas.

## BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA SANITARIO DE NAVARRA

Se contrastaron las diferencias entre ambos grupos mediante el test de Chi-cuadrado de Pearson, siempre que se cumpliesen las exigencias para la utilización de esta prueba: menos de un 20% de celdas con frecuencia esperada menor que 5, y ninguna celda con frecuencia esperada menor que 1. En caso contrario se realizó el estadístico exacto de Fisher. La variable edad fue contrastada con la prueba t para igualdad de varianzas.

### **RESULTADOS**

#### Resultados del screening molecular

A lo largo de tres años se analizaron 971 tumores de colon, procedentes de los Servicios de Anatomía Patológica de la red sanitaria pública de la Comunidad Foral de Navarra. La incidencia del cáncer colorrectal en nuestra comunidad fue de 323,66 casos/año. Se extrajo ADN de todos ellos y se les realizó el estudio de Análisis de Inestabilidad Microsatelital, según la técnica descrita en el apartado de métodos. De todos ellos, 93 de estos tumores (9,57%) resultaron ser altamente inestables. Todos fueron analizados para la mutación V600E y la metilación del promotor del gen *MLH1*.

La incidencia de la metilación fue de 46 tumores (49,46%), de los cuales 19 también mostraron la mutación V600E (20,43%). En 5 casos encontramos la mutación en el gen *BRAF* sin que exista hipermetilación asociada.

En dos casos encontramos metilación del promotor de *MLH1* y aun así citamos a ambos pacientes para estudio de mutaciones y metilación del promotor en sangre periférica. El primer paciente mostraba un fenotipo personal severo asociado a cánceres metacrónicos a edades menores de 50 años y el segundo paciente tenía un diagnóstico de cáncer colorrectal a los 38 años de edad. Por tanto, el resultado del screening molecular arrojó una cifra de 44 tumores (4,53%) con sospecha de Síndrome de Lynch.

Se citaron para consulta de consejo genético a los pacientes seleccionados para el estudio molecular de mutaciones en sangre periférica. Se recogieron los datos clínicos y



BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

el pedigrí de cada uno de ellos. De los 44 acudieron a consulta 41, los otros 3 fallecieron durante el periodo de tiempo que llevó el análisis tumoral.

No se encontró ninguna mutación descrita como patogénica en 18 de ellos (41,46%). Los otros 23 (58.53%) pacientes eran portadores de alguna mutación patogénica asociada al síndrome de Lynch, 8 de los cuales habían sido diagnosticados con anterioridad al inicio del estudio en el Servicio de Genética Clínica.

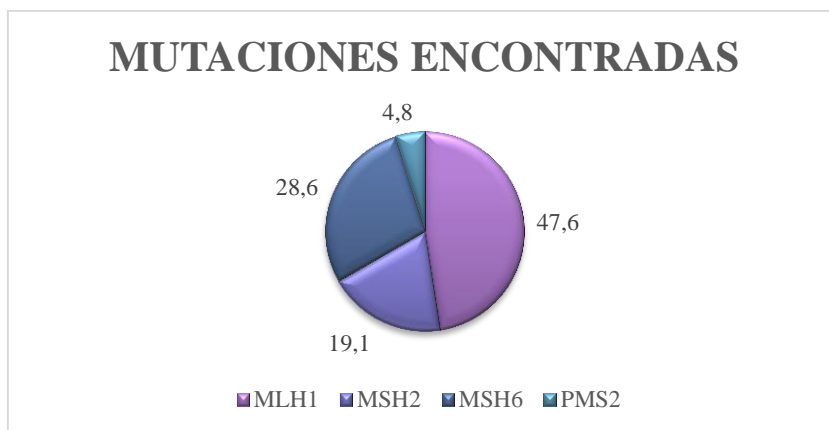
La incidencia por tanto del SL en los tumores colorrectales se situó en 2,5 %

Mutaciones identificadas

El número de familias identificadas con SL fue 21, debido a que existen dos familias con dos portadores cada una de ellas. La distribución génica de las mutaciones muestra un predominio de *MLH1* (47,6%), *MSH2* (19,1%), *MSH6* (28,5%) y *PMS2* (4,8%).

**Tabla 1.** Mutaciones identificadas

PACIENTES			FAMILIAS			
GEN	NUEVOS	CONOCIDOS	TOTAL	NUEVOS	CONOCIDOS	TOTAL
<i>MLH1</i>	7	4	11(47,8%)	7	3	10(47,6%)
<i>MSH2</i>	2	3	5 (21,7%)	2	2	4(19,1%)
<i>MSH6</i>	5	1	6(26,1%)	5	1	6(28,6%)
<i>PMS2</i>	1	0	1(4,4%)	1	0	1(4,8%)
<b>TOTAL</b>	15	8	23(100%)	15	6	21(100%)



**Figura 1.** Distribución por genes de los portadores encontrados en el proyecto

### Comparación de las series

**Nº de portadores por familia:** A lo largo de 13 años de trabajo en el ámbito sanitario, el Servicio de Genética Médica identificó 44 familias con mutaciones patogénicas y 228 portadores, con un promedio de 5,4 portadores por familia.

Como producto de tres años de screening molecular se identificaron 21 familias, 15 de ellas nuevas, 30 portadores y un promedio de 2 portadores por familia.

**Sexo de los portadores:** Existe mayor proporción de hombres dentro del grupo de nuevas mutaciones (63,3%), frente a la serie de conocidos (46,5%), pero estas diferencias no resultan significativas.

**Distribución génica:** La distribución génica de las nuevas mutaciones difiere de las anteriormente identificadas. Para los portadores de mutaciones situadas en el gen *MLH1* las frecuencias son similares en ambos grupos (56,7%) y (42,1%) respectivamente. Sin embargo, si nos fijamos en los genes *MSH2* y *MSH6*, encontramos que la distribución es totalmente opuesta. En aquellas familias ya conocidas, la distribución por genes muestra una frecuencia muy similar entre *MLH1* (42%) y *MSH2* (41,7%), seguida de

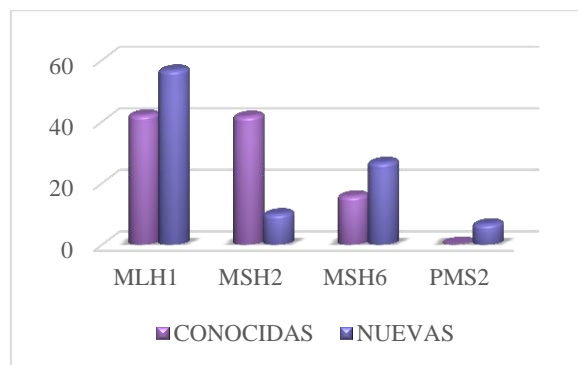
BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

MSH6 (15,8%) y PMS2 (0,4%). En las nuevas familias los valores de MSH2 y MSH6 se invierten (10%) y (26.7%) respectivamente.

El análisis de ambas poblaciones muestra diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 2.** Distribución génica de las mutaciones

	<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>	<i>MSH6</i>	<i>PMS2</i>	TOTAL	P-valor
<b>Nuevas</b>	17(56,7%)	3(10%)	8(26,7%)	2(6,7%)	30(100%)	
<b>Conocidas</b>	96(42,1%)	95(41,7%)	36(15,8%)	1(0,4%)	228(100%)	<b>p&lt;0.01</b>
<b>Total</b>	113(43,7%)	98(37,9%)	45(17,44%)	3(1,16%)	258	



**Figura 2.** Distribución génica de las mutaciones

**Criterios de Ámsterdam II:** La proporción de familias que cumplen los criterios clínicos de Ámsterdam es mayor en el grupo cuyas mutaciones han sido diagnosticadas con independencia del cribado molecular. El 66.7% de estas familias cumplen criterios de Ámsterdam II, frente al 31,8% de las familias que se han identificado fruto del screening molecular. Los resultados de la comparación entre ambas poblaciones son estadísticamente significativos.

BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

**Tabla 3.** Criterios de Ámsterdam II

AMSTERDAM II				
	NO	SI	TOTAL	p-valor
<b>Nuevas</b>	10(66,7%)	5(33,3%)	15	<b>P&lt;0.01</b>
<b>Conocidas</b>	14(31,8%)	30(68,2%)	44	
<b>Total</b>	24(40,7%)	35(59,3)	59	

**Criterios de Bethesda:** Como en el caso anterior, existe una mayor proporción de familias que cumplen los criterios de Bethesda en la serie correspondiente a mutaciones conocidas. El 80% de las familias con nuevas mutaciones identificadas cumplen los criterios clínicos de Bethesda, frente al 97,7% de las ya conocidas. El análisis estadístico realizado entre ambas poblaciones muestra diferencias significativas.

**Tabla 4.** Criterios de Bethesda

BETHESDA				
	NO	SI	TOTAL	p-valor
<b>Nuevas</b>	3(20%)	12(80%)	15	<b>P&lt;0.05</b>
<b>Conocidas</b>	1(2,3%)	43(97,7%)	44	
<b>Total</b>	4	55	59	

**Prevalencia tumoral:** El 60% de los portadores de las nuevas mutaciones identificadas han desarrollado patología tumoral, frente a 47% los portadores de la serie conocidas, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.

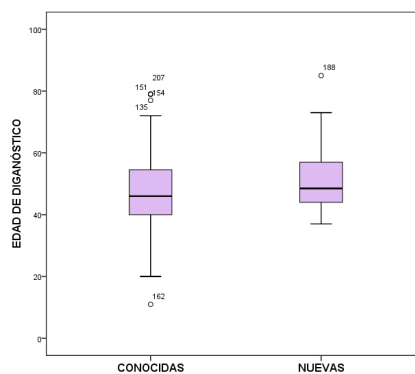
**Tabla 5.** Prevalencia tumoral

PORTADORES QUE HAN DESARROLLADO TUMORES				
	SI	NO	TOTAL	p-valor
<b>Nuevas</b>	18(60%)	12(40%)	30	<b>P&gt;0.05</b>
<b>Conocidas</b>	108(47,4%)	120(52,6%)	228	
<b>Total</b>	110	149	258	

**Edad del primer diagnóstico tumoral:** El grupo de mutaciones conocidas muestra una edad media de 48 años, mientras que el grupo de nuevas mutaciones sitúa su edad media en 52 años. Al realizar la prueba de la t de *student* para comparar las medias no encontramos diferencias significativas entre ambas poblaciones.

**Tabla 6.** Edad del primer diagnóstico tumoral

EDAD DEL PRIMER DIAGNÓSTICO TUMORAL						
	Media	IC 95%	Desv.típ	Mínimo	Máximo	t-Student
<b>Conocidas</b>	48	45-50	13	11	79	p>0,05
<b>Nuevas</b>	52	46-58	12	38	85	



**Figura 3.** Edad media del primer diagnóstico tumoral

**Distribución tumoral por órganos:** La serie de mutaciones nuevas tiene una mayor prevalencia de cáncer colorrectal en comparación con la serie conocidas. Los resultados de la distribución se muestran a continuación.

BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

**Tabla 7. Distribución tumoral por órganos**

	CONOCIDAS	%	NUEVAS	%	TOTAL
COLON	86	47,25	23	76,67	109
ENDOMETRIO	30	16,48	2	6,67	32
GASTRICO	8	4,40	1	3,33	9
OVARIO	8	4,40	0	0,00	8
UROTELIAL	17	9,34	2	6,67	19
INTESTINO DELGADO	3	1,65	1	3,33	4
TRACTO BILIAR	2	1,10	0	0,00	2
SNC	1	0,55	0	0,00	1
PIEL/GL. SEBÁCEAS	11	8,79	0	0,00	11
OTROS	16	6,04	1	3,33	17
TOTAL	182	100	30	100	212

## DISCUSIÓN

De los 971 tumores analizados a lo largo de tres años se ha obtenido la cifra de 23 portadores de mutaciones asociadas al Síndrome de Lynch, esto demuestra que en nuestra comunidad el 2,5% de los cánceres colorrectales son de origen hereditario asociados este síndrome. Estos resultados son similares a los de otros trabajos publicados anteriormente que sitúan su incidencia en torno al 3%<sup>10,17</sup>.

En lo relativo a la distribución génica de las mutaciones encontradas como producto del screening molecular, los datos no difieren demasiado de los datos más recientemente publicados en el International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) database<sup>24</sup>, donde los genes más frecuentemente alterados son *MHL1* y

BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

*MSH2* sumando casi el 80% de todos los cánceres en una proporción muy parecida, seguido de *MHS6* (18%) y *PMS2* (8%). Estos datos difieren mucho en el grupo de nuevas mutaciones. El porcentaje de mutaciones situadas en *MSH6* es mayor del que habríamos de esperar, a costa de encontrar muy pocas mutaciones situadas en *MSH2* con tan solo el 10% de los casos. Este dato es muy llamativo, teniendo en cuenta que a priori la probabilidad de desarrollar cáncer colorrectal es muy similar entre los portadores de los genes *MLH1* Y *MSH2* y menor en *MSH6* y *PMS2*<sup>6</sup>.

No hemos encontrado diferencias significativas entre el sexo de los portadores.

En lo relativo a la edad de aparición del primer tumor diagnosticado, aunque las nuevas mutaciones muestran una edad media de diagnóstico más elevada, y una mayor dispersión de los datos hacia edades más avanzadas, no hemos encontrado diferencias significativas.

Sí que hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas para los criterios de diagnóstico clínico, tanto de Ámsterdam como de Bethesda, entre ambos grupos. Este resultado sugiere que una proporción de portadores no están siendo diagnosticados cuando se aplican dichos criterios.

Uno de los factores que pueden estar afectando a estas diferencias es el número de portadores por familia. En las familias que ya se habían diagnosticado previamente el número medio de portadores es de 5.2 frente a 2 en las nuevas familias. Estos datos sugieren, que en general, son familias más grandes y con más miembros, que tienen más posibilidades de cumplir criterios ya que es más probable que varios individuos presenten cánceres asociados y por tanto nos encontremos con árboles genealógicos más extensos e informativos.

Por otra parte, los criterios de Ámsterdam II y Bethesda, funcionan muy bien para las mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2*, pero no tienen tanta sensibilidad para mutaciones situadas en los otros dos genes. Esto puede deberse a las diferencias en cuanto a manifestaciones clínicas que existen según qué gen porte la mutación. El

BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

fenotipo de los genes MLH1 y MSH2 es más severo. Si bien la probabilidad de desarrollar cáncer colorrectal es la misma en ambos casos, en el caso de MSH2 el riesgo de desarrollar cánceres extracolónicos es mucho mayor, especialmente cáncer de endometrio. Varios de los casos índice conocidos tuvieron un tumor endometrial como origen del estudio genético. En el caso de MSH6, la probabilidad de desarrollar cáncer endometrial también es mayor que en MLH1 o PMS2, sin embargo, existen estudios publicados que indican que puede existir un infra diagnóstico clínico de estas mutaciones debido a una menor penetrancia<sup>20-21</sup>, lo que podría explicar las diferencias que hemos encontrado en los datos de distribución génica. Lo mismo ocurre con *PMS2*, la probabilidad de desarrollar tumores es menor y su edad media de diagnóstico suele ser más avanzada<sup>23</sup>.

No hemos encontrado resultados estadísticamente significativos en cuanto a la prevalencia tumoral entre las dos poblaciones, pero también es cierto que las nuevas familias tienen pocos años de seguimiento y habrá que esperar para ver cómo evolucionan en este sentido.

En cuanto a la distribución tumoral por órganos encontramos una mayor prevalencia del cáncer colorrectal en el grupo de nuevas mutaciones, lo cual no es sorprendente debido a que el cribado se ha realizado en dicho órgano.

Las limitaciones en nuestro estudio vienen dadas por el número tan pequeño de mutaciones encontradas, la baja incidencia de este síndrome no permite la obtención de unos tamaños muestrales suficientemente grandes en periodos relativamente cortos de tiempo. Las familias con el tiempo se van ampliando en muchos casos y aportando información al dar tiempo a los portadores a presentar sucesivos tumores a partir de la fecha del primer diagnóstico. Es probable que con más años de aplicación de este sistema pudiéramos encontrar diferencias significativas donde hoy no las hay. La implementación de un screening molecular a todos los cánceres colorrectales permitiría la identificación de portadores que, de otra forma, por sus características clínicas o



BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

fenotípicas quedarían sin diagnosticar. Esta idea no hace sino reforzar los numerosos trabajos publicados que recomiendan su implementación rutinaria en los centros sanitarios<sup>24-25</sup>.

**AGRADECIMIENTOS:** El presente trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Gobierno de Navarra dentro del marco de las ayudas a la investigación biomédica.

**RESUMEN:**

El Síndrome de Lynch (SL) es una patología hereditaria que predispone a sufrir cáncer colorrectal. En la Comunidad Foral de Navarra se ha desarrollado un screening molecular para el SL en tumores colorrectales que permita evaluar su eficacia. Para ello han sido estudiados 971 tumores de colon de manera prospectiva sin ningún criterio de selección. A cada uno de ellos se le han realizado pruebas de inestabilidad de microsatélites e inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras. En los tumores con alta inestabilidad se han realizado pruebas de metilación del promotor del gen *MLH1* y mutación V660E del gen *BRAF*. Aquellos casos que indicaban cáncer esporádico fueron descartados para el posterior estudio de los genes de SL en sangre periférica. Los resultados obtenidos se han comparado con la serie de pacientes diagnosticados por criterios clínicos a lo largo de 13 años de actividad en el Servicio de Genética del Complejo Hospitalario de Navarra. Encontramos diferencias entre ambos grupos, la sensibilidad de los criterios Ámsterdam II y Bethesda es menor en el grupo del screening molecular.

**ABSTRACT:**

Lynch syndrome is a hereditary pathology that predisposes to colorectal cancer. A universal screening strategy for Lynch syndrome in colorectal cancer has been performed in Navarra for three years to evaluate its effectiveness. We prospectively studied a set of 971 colorectal tumors without any selection criteria. Tumors were tested for microsatellite instability and mismatch repair proteins immunohistochemistry. V600E *BRAF* mutation and *MLH1* promoter methylation were assessed in all MSI-H

BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

tumors. *BRAF* V600E or methylated tumors were discarding for MMR genes germ line studies. Sensitivity of Amsterdam II and Bethesda criteria is lower in molecular screening group.

**Palabras clave:** Síndrome de Lynch, sistema de reparación MMR, inestabilidad de microsatélites.

**BIBLIOGRAFÍA:**

1. Young GP et al, eds. Prevention and Early Detection of Colorectal Cancer. London: Saunders; 1996:171-194
2. Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. *CMAJ*. 2009; 181:273–280.
3. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*. 1993;71(3):677–685.
4. Watson P, Lynch HT. Cancer risk in mismatch repair gene mutation carriers. *Fam Cancer*. 2001; 1:57–60.
5. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin J-P, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994; 54:1645-1648
6. Peltomäki P. Update on Lynch syndrome genomics. *Familial Cancer*. 2016; 15:385-393.
7. Vasen H. F. A., Mecklin J.-P., Khan P. M., Lynch H. T. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC) *Diseases of the Colon & Rectum*. 1991;34(5):424–425.
8. Vasen H. F. A., Watson P., Mecklin J.-P., Lynch H. T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1453–1456.
9. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96:261–268
10. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352: 1851–60

BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

11. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20:1043-1048.
12. Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer*. 2008; 7:41–52.
13. Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Järvinen H, et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res*. 2001;61(11):4545-9.
14. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*. 2005;352(18):1851-60.
15. Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999; 59:2029-2033.
16. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet*. 2004;41(9):664-8.
17. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5783-8.
18. Julié C, Trésallet C, Brouquet A, Vallot C, Zimmermann U, Mitry E, et al. Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(11):2825-35
19. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:169-74
20. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG et al. Risks of Lynch syndrome cancer for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:193-201.
21. Soto JL, Castillejo A, Barberá V et al. High prevalence of MSH6 gene mutation as causes of Lynch syndrome in Spanish patients. *Fam Cancer* 2011;10(Supl 1): S37

BORRADOR DE ARTÍCULO PARA LA REVISTA ANALES DEL SISTEMA  
SANITARIO DE NAVARRA

22. Hampel H. Point: justification for Lynch syndrome screening among all patients with newly diagnosed colorectal cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2010;8(5):597-601.
23. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germline *PMS2* mutations. *Gastroenterology.* 2008;135(2):419-428.
24. Thompson BA, Spurdle AB, Plazzer J-P, et al. Application of a five-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants lodged on the InSiGHT locus-specific database. *Nature genetics.* 2014;46(2)
25. Cohen SA, Laurino M, Bowen DJ, Upton MP, Pritchard C, Hisama F, et al. Initiation of universal tumor screening for Lynch syndrome in colorectal cancer patients as a model for the implementation of genetic information into clinical oncology practice. *Cancer.* 2016;122(3):393-401.