



Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DEL SÍNDROME DE LYNCH-LIKE

MARIA DOLORES PICÓ SALA

DIRECTOR:

FRANCISO JAVIER LACUEVA GÓMEZ

CO-DIRECTOR:

RODRIGO JOAQUIN JOVER MARTÍNEZ

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA, CIENCIAS MÉDICAS Y
QUIRÚRGICAS**

Universidad Miguel Hernández

Septiembre 2020

Esta tesis es un compendio de trabajos de investigación sobre el síndrome de Lynch-like y cuyos resultados han sido aceptados para publicación:

➤ **CLINICAL AND PATHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF LYNCH-LIKE SYNDROME.**

Picó MD, Castillejo A, Murcia Ó, Giner-Calabuig M, Alustiza M, Sánchez A, Moreira L, Pellise M, Castells A, Carrillo-Palau M, Ramon Y Cajal T, Gisbert-Beamud A, Llorca G, Yagüe C, López-Fernández A, Alvarez-Urturi C, Cubiella J, Rivas L, Rodríguez-Alcalde D, Herraiz M, Garau C, Dolz C, Bujanda L, Cid L, Povés C, Garzon M, Salces I, Ponce M, Hernández-Villalba L, Alenda C, Balaguer F, Soto JL, Jover R. Clin Gastroenterol Hepatol. 2020 Feb;18(2):368-374.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2019.06.012. Epub 2019 Jun 17.

➤ **RISK OF CANCER IN FAMILY MEMBERS OF PATIENTS WITH LYNCH-LIKE SYNDROME**

María Dolores Picó; Ana Beatriz Sánchez-Heras; Adela Castillejo; Óscar Murcia; Mar Giner-Calabuig; Miren Alustiza; Ariadna Sánchez; Leticia Moreira; María Pellise; Antoni Castells, Gemma Llorca; Carmen Yagüe; Teresa Ramon y Cajal; Alexandra Gisbert-Beamud; Joaquin Cubiella; Laura Rivas; Maite Herraiz; Catalina Garau; Inmaculada Salces; Marta Carrillo-Palau; Luis Bujanda; Adriá López-Fernández; Cristina Alvarez-Urturi; María Jesús López; Cristina Alenda, Pedro Zapater; Francisco Javier Lacueva; Francesc Balaguer; Jose-Luis Soto; Rodrigo Jover. Cancers 2020, Volume 12, Issue 8, 2225. doi: 10.3390/cancers12082225.

D. Francisco Javier Lacueva Gómez, director, y D. Rodrigo Joaquín Jover Martínez, co-director, de la tesis doctoral titulada “CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DEL SÍNDROME DE LYNCH-LIKE”

CERTIFICAN:

Que Dña. María Dolores Picó Sala ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DEL SÍNDROME DE LYNCH-LIKE” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos en Sant Joan d’Alacant, a treinta de junio de dos mil veinte.

Fdo. D. Francisco Javier Lacueva Gómez

Director de tesis

FRANCISCO
JAVIER|
LACUEVA|
GOMEZ

Firmado digitalmente por FRANCISCO JAVIER| LACUEVA|GOMEZ
Fecha: 2020.10.07 22:54:25 +02'00'

Fdo. D. Rodrigo Joaquín Jover Martínez

Co-director de tesis

RODRIGO
JOAQUIN|
JOVER|
MARTINEZ

Firmado digitalmente por RODRIGO JOAQUIN| JOVER|MARTINEZ
Fecha: 2020.10.08 09:25:55 +02'00'



D. Vicente Francisco Gil Guillén, Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

AUTORIZA:

La presentación y defensa como tesis doctoral del trabajo “CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DEL SÍNDROME DE LYNCH-LIKE” realizado por Dña. M^a Dolores Picó Sala bajo la dirección del Dr. D. Francisco Javier Lacueva Gómez y la co-dirección del Dr. D. Rodrigo Joaquín Jover Martínez. De acuerdo a la información recibida sobre las evaluaciones previas realizadas en cumplimiento de la normativa general vigente y la propia de la Universidad Miguel Hernández y según lo certificado por las personas que han realizado la tutoría y dirección, la tesis cumple los requisitos para proceder a su defensa pública.

En Sant Joan d’Alacant, a treinta de junio de 2020

VICENTE
FRANCISCO
GIL|GUILLEN

Firmado digitalmente
por VICENTE
FRANCISCO|GIL|
GUILLEN
Fecha: 2020.07.30
15:10:37 +02'00'

Firmado: Prof. Vicente Francisco Gil Guillén

Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas



Este trabajo fue financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI08 / 0726, INT-09/208, PI11 / 2630, INT-12-078, INT13-196, PI14 / 01386, PI17 / 01756), Fundación de Investigación Biomédica de Comunidad Valenciana – Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (UGP-14-120, UGP-13-221, UGP-14-265). Recibió una subvención predoctoral de la Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana (VALi + d. EXP ACIF / 2010/018, ACIF / 2016/002) y una beca pre-doctoral del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante ISABIAL. La Asociación para la Investigación en Gastroenterología de la Provincia de Alicante (AIGPA), una asociación privada que promueve la investigación en enfermedades gastrointestinales en Alicante, también apoyó los aspectos logísticos del estudio, pero no declara ningún conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

En este apartado me gustaría agradecer en primer lugar a mis directores de tesis. A Rodrigo, por la confianza depositada en mí. Durante estos años me has enseñado aspectos importantes sobre el desarrollo de un proyecto de investigación. A pesar de las dificultades surgidas durante esta etapa de investigación por la dificultad de conciliar trabajo, investigación y familia, siempre has conseguido hacer fácil y sencillas aquellas situaciones que me parecían complicadas. También me gustaría agradecerte tu ayuda, y apoyo en los congresos a los que hemos acudido para dar difusión de esta investigación. Todo ello ha enriquecido de manera notable mi carrera profesional y ha generado una necesidad de continuar esta trayectoria de investigación, que me gustaría seguir compartiendo a tu lado. Igualmente me gustaría agradecer a Javier Lacueva, el tiempo que me has dedicado para enseñarme aspectos importantísimos en el área de la investigación, así como en la metodología, y la manera de dar a conocer dicha investigación.

A Adela y José Luis. Sois un gran equipo. He aprendido muchísimo con vosotros y os agradezco vuestro tiempo, vuestra ayuda.

A Beatriz y a Carmen, de la Unidad de Consejo Genético de Elche. Me gustaría agradecer vuestra ayuda e implicación con este trabajo, además de vuestra disposición a pesar del poco tiempo que disponemos en nuestra práctica clínica.

A Pedro Zapater, por tu amabilidad, tu tiempo. Me has ayudado mucho con la metodología del trabajo de forma paciente y siempre disponible.

A Cristina Alenda, por tu ayuda en todo momento y a María Cabezas, por tu tiempo, tu disposición en todo momento para resolver las dudas que me surgían y por todo lo que me has enseñado.

Gracias a Óscar y a todos los colaboradores del proyecto EPICOLON, por vuestro tiempo, interés y ayuda para el desarrollo de este proyecto.

Gracias a los pacientes, por su participación, ya que este trabajo es por y para ellos.

Agradecimientos

A María Asunción Almarcha, por su interés y eficiencia a la hora de solucionar las dudas surgidas.

A Marife, por su apoyo constante e incondicional con este proyecto. A mis compañeros de Digestivo, por su comprensión, apoyo y ayuda.

A mis padres por su apoyo incondicional y a Carlos, sin tu comprensión y ayuda no habría podido realizar esta Tesis. A Ana y Arturo, por su paciencia.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Adenomatous Polyposis Coli
<i>BRAF</i>	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CCRHNP	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico
CCR	Cáncer colorrectal
CIMP	<i>CpG Island Methylator Phenotype</i> (Fenotipo metilador en islas CpG)
DCC	DCC netrin 1 receptor
DS	Desviación estándar
<i>EPCAM</i>	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
FPG	Familiares de primer grado
IC	Intervalo de confianza
IHQ	Inmunohistoquímica
IMS	Inestabilidad de microsatélites
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>LRRFIP2</i>	<i>Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 2</i>
MGMT	O-6-methylguanine-DNA-methyltransferase
MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. Coli)
<i>MLH1</i>	Gen que codifica para el <i>MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. Coli)</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i> (Sistema reparador de errores)
MSH2	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. Coli)
<i>MSH2</i>	Gen que codifica para el <i>MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. Coli)</i>

MSH6	MutS homolog 6, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. Coli)
MSH6	<i>Gen que codifica para el MutS homolog 6, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. Coli)</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa) PIK3CA <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PMS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)
PMS2	<i>Gen que codifica para el PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)</i>
POLD1	<i>Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit</i>
POLE	<i>Polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit</i>
SL	Síndrome de Lynch
SLL	Síndrome de Lynch-like
SMAD4	<i>SMAD family member 4</i>
STK11	<i>Serine/threonine kinase 11</i>
TGF-beta	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIE	Tasa de incidencia estandarizada
TP53	<i>Tumor protein p53</i>

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS**RESUMEN/ ABSTRACT****1. INTRODUCCIÓN**

1.1. Epidemiología del cáncer colorrectal.....	1
1.2. Estadaje y supervivencia del CCR.....	2
1.3. Etiología del CCR. Lesiones precursoras.....	5
1.4. Carcinogénesis colorrectal.....	9
1.5. Síndromes con riesgo familiar de CCR.....	21
1.5.1. Cáncer de colon hereditario no polipósico o síndrome de Lynch.....	24
1.5.1.1. Criterios clínicos para el diagnóstico de síndrome de Lynch.....	26
1.5.1.2. Cribado universal para el diagnóstico de síndrome de Lynch.....	28
1.5.1.3. Estudio genético.....	29
1.5.2. Síndrome de Lynch-like.....	32
1.5.3. Desafíos diagnósticos en el Síndrome de Lynch y Síndrome de Lynch-like. Situación actual.....	34
1.6. Proyecto EPICOLON.....	37
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	38

2.1. Justificación del estudio.....	39
2.2. Hipótesis de trabajo.....	39
3. OBJETIVOS.....	40
4. METODOLOGÍA.....	42
4.1. Diseño del estudio.....	43
4.2. Pacientes y ámbito del estudio.....	45
4.3. Base de datos.....	46
4.4. Análisis de riesgo familiar de cáncer.....	47
4.5. Variables analizadas.....	48
4.6. Estudio inmunohistoquímico y molecular.....	50
4.7. Análisis estadístico.....	53
5. RESULTADOS.....	56
5.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y PATOLÓGICA DEL SÍNDROME DE LYNCH-LIKE.....	57
5.1.1. Características de los pacientes con SLL.....	57
5.1.2. Caracterización de los pacientes con SLL en función de motivo del diagnóstico de SLL o la edad al diagnóstico de CCR y/o antecedentes familiares de CCR.....	60
5.2. RIESGO FAMILIAR DE CCR Y OTRAS NEOPLASIAS ASOCIADAS AL SÍNDROME DE LYNCH.....	65

5.2.1. Características clínicas y patológicas entre pacientes con SL y SLL.....	65
5.2.2. Riesgo familiar de CCR y otras neoplasias asociadas a SL entre FPG de pacientes con SL y SLL.....	68
5.2.3. Riesgo de desarrollo de CCR u otros tumores asociados a SL.....	71
5.2.4. Neoplasias asociadas a SL (no-CCR) en los pacientes con SL y SLL y sus familiares de primer grado.....	72
6. DISCUSION.....	74
6.1. Caracterización del síndrome de Lynch-like.....	76
6.1.1. Edad al diagnóstico de CCR.....	77
6.1.2. Análisis de inmunohistoquímica del CCR.....	79
6.1.3. Características del CCR.....	82
6.1.3.1. Localización.....	82
6.1.3.2. Estadiaje.....	83
6.1.3.3. Características histopatológicas.....	84
6.1.4. Antecedentes personales o familiares de neoplasias asociadas a SL.....	90
6.2. Riesgo familiar de CCR y otras neoplasias asociadas al síndrome de Lynch.....	92

6.3. Conclusiones caracterización del síndrome de Lynch-like.....	95
6.4. Limitaciones /Fortalezas.....	101
7. CONCLUSIONES.....	103
8. REFERENCIAS.....	106
9. ANEXO 1. Investigadores del proyecto EPICOLON.....	127
10.ADENDA. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	132

RESUMEN

RESUMEN

Introducción y objetivos:

El síndrome de Lynch (SL) se caracteriza por una deficiencia en el sistema de reparación de ADN (MMR). En algunos casos en los que se sospecha de SL por la presencia de deficiencia en el sistema reparador del ADN, no se identifica mutación germinal patogénica en dichos genes con las técnicas diagnósticas que se utilizan actualmente. Estos casos son conocidos como síndrome de Lynch-like (SLL). Actualmente no hay consenso sobre el manejo de estos pacientes. Los objetivos de este estudio fueron, en primer lugar, identificar las características clínicas y patológicas que permitiesen orientar el posible origen hereditario o esporádico del CCR en pacientes con SLL. En segundo lugar, se comparó el riesgo de CCR y otras neoplasias asociadas a SL entre familiares de primer grado (FPG) de pacientes con SLL y SL.

Material y Métodos:

Estudio multicéntrico, en el cual, los pacientes fueron identificados a partir de un registro nacional (EPICOLON III). Se diagnosticó SLL cuando los tumores mostraron pérdida en la inmunohistoquímica de MSH2, MSH6, PMS2; o pérdida de MLH1 (sin presencia de la mutación V600E *BRAF* y / o ausencia de metilación de *MLH1*), y ausencia de mutación patogénica en estos genes. Para el primer objetivo sobre la caracterización clínica y molecular de los pacientes con SLL, se llevó a cabo un análisis retrospectivo con el fin de identificar características clínico-epidemiológicas, moleculares o histopatológicas que permitiesen diferenciar un posible origen hereditario o esporádico entre los pacientes con SLL, en base al motivo de diagnóstico de SLL (diagnosticados por los criterios de Amsterdam y / o Bethesda frente a aquellos diagnosticados cribado universal para SL). En segundo lugar, se analizaron diferencias de entre los pacientes con SLL en base a la edad del diagnóstico de CCR y la historia familiar de neoplasias asociadas a SL.

Para el segundo objetivo, sobre el análisis del riesgo familiar de desarrollo de neoplasias asociadas a SL, se calculó la tasa de incidencia estandarizada (TIE) para CCR y otras neoplasias asociadas a SL, entre los familiares de primer grado (FPG) de pacientes con SLL y se comparó con la de los familiares de pacientes con SL.

Resultados:

Se incluyeron 160 pacientes con SLL. La edad media al diagnóstico de CCR fue de 55 años. Los criterios de Amsterdam I y II estaban presentes en el 11% y los criterios revisados de Bethesda en el 65% de los casos. De los pacientes con SLL, 24% fueron diagnosticados mediante la realización de cribado universal para la detección de SL mediante inmunohistoquímica. No hubo diferencias significativas en relación al sexo, indicación de colonoscopia, inmunohistoquímica, localización y estadiaje de CCR, hallazgos histopatológicos o antecedentes personales de CCR u otros tumores asociados a SL entre los pacientes que cumplían los criterios de Amsterdam y / o Bethesda frente los pacientes diagnosticados mediante el cribado universal para SL. Asimismo, tampoco se observaron diferencias relevantes entre los pacientes con SLL en función de la edad al diagnóstico de CCR y/o la presencia de historia familiar de neoplasias asociadas a SL.

Para el análisis del riesgo familiar de desarrollo de neoplasias asociadas a SL, se incluyeron en total, 205 pacientes con SL (1.205 FPG) y 131 pacientes con SLL (698 FPG) de los que sí disponíamos de genogramas completos. Los FPG de pacientes con SLL presentaron una incidencia elevada de CCR (TIE, 2,08; intervalo de confianza [IC] del 95%, 1,56-2,71), que fue significativamente menor que la presentada por los FPG de pacientes con SL (TIE, 4,25; IC del 95%, 3,67-4,90; $p < 0,001$). Asimismo, el riesgo de desarrollar otras neoplasias asociadas a SL también se observó incrementado entre los familiares de pacientes con SLL (TIE, 2,04; IC 95%, 1,44–2,80), aunque menor que el presentado entre los familiares de pacientes con SL (TIE, 5,01; IC 95%, 4,26–5,84; $p < 0,001$).

Conclusiones:

Los pacientes con SLL presentan características clínicas, demográficas e histopatológicas homogéneas, independientemente de los antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL o la edad al diagnóstico de CCR. Sin embargo, los FPG con SLL tienen un riesgo incrementado de desarrollo de CCR y otras neoplasias asociadas a SL. Aunque este riesgo es menor que el de las familias con SL, se debe tener en cuenta en el seguimiento de pacientes con SLL y sus familiares.

ABSTRACT

Background & Aims:

Lynch syndrome (LS) is characterized by DNA mismatch repair (MMR) deficiency. Some patients with LS syndrome have DNA MMR deficiencies but no detectable mutations in genes that encode MMR proteins—this is called Lynch-like syndrome (LLS). There is no consensus on management of patients with LLS. The objectives of this study were, first of all, to identify the clinical and pathological characteristics that would guide the possible hereditary or sporadic origin of CRC in patients with LLS. Second, the risk of CRC in first-degree relatives (FDR) of patients with SLL and SL was compared.

Material and Methods:

Patients were included in a national registry of hereditary CRC (EPICOLON III). LLS was diagnosed when tumors showed immunohistochemical loss of MSH2, MSH6, PMS2; or loss of MLH1 without mutation in *BRAF* and / or absence of methylation of *MLH1*, and absence of pathogenic mutation in these genes. For the first objective, on the clinical and molecular characterization of patients with LLS, an analysis was carried out in order to identify clinical-epidemiological, molecular or histopathological characteristics that allowed differentiating a possible hereditary or sporadic origin among patients with LLS, based on the reason for LLS diagnosis (diagnosed by the Amsterdam and / or Bethesda criteria compared to those diagnosed with universal screening for LS). Secondly, differences between LLS patients were analyzed based on the age of diagnosis of CRC and family history of LS related tumors. For the second objective, based on the analysis of the family risk of developing LS associated tumors, the standardized incidence rate (SIR) for CRC and other LS tumors was calculated among first-degree relatives (FDR) of patients with LLS and was compared with that presented by FDR of patients with LS.

Results:

We identified 160 patients with LLS; their mean age at diagnosis of CRC was 55 years. The Amsterdam I and II criteria for Lynch syndrome were fulfilled by 11% of cases and the revised Bethesda guideline criteria by 65% of cases. Of the patients with LLS, 24% were identified in universal screening. There were no proportional differences in sex, indication for colonoscopy, immunohistochemistry, pathology findings, or personal history of CRC or other LS-related neoplasms between patients who met the Amsterdam and/or Bethesda criteria for Lynch syndrome and patients identified in universal screening for Lynch syndrome. Also, no significant differences were observed between patients with LLS based on age at diagnosis of CRC and/or the presence of family history of LS-related neoplasms. For the analysis of the family risk of developing LS-related neoplasms, a total of 205 patients with LS (1,205 FDRs) and 131 with LLS (698 FDRs) had complete pedigrees. FDRs of patients with LLS had a high incidence of CRC (SIR, 2.08; 95% confidence interval [CI], 1.56–2.71), which was significantly lower than that in FDRs of patients with LS (SIR, 4.25; 95% CI, 3.67–4.90; $P < 0.001$). The risk of developing neoplasms associated with LS (other than CRC) also increased among relatives of patients with LLS (SIR, 2.04; 95% CI, 1.44–2.80), but was lower than that among family members of patients with LS (SIR, 5.01, 95% CI, 4.26–5.84; $P < 0.001$).

Conclusions

Patients with LLS have homogeneous clinical, demographic, and pathology characteristics, regardless of family history of LS-related neoplasms or age at diagnosis of CRC. However, FDRs with LLS have an increased risk of developing CRC as well as LS-related neoplasms, although this risk is lower than that of families with LS. Thus, their management should take into account this increased risk.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología del cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más frecuentes en los países occidentales (Fig.1). En Europa es el cuarto cáncer más incidente y es la segunda causa más común de muerte por cáncer (1). En España, es la segunda causa de cáncer en hombres, por detrás del cáncer de próstata, y la segunda en mujeres tras el cáncer de mama (Fig.2). La incidencia aumenta de forma progresiva a partir de los 40 años. La mayoría de CCR se origina a partir de pólipos adenomatosos y serrados, lesiones benignas que presentan potencial maligno.

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages

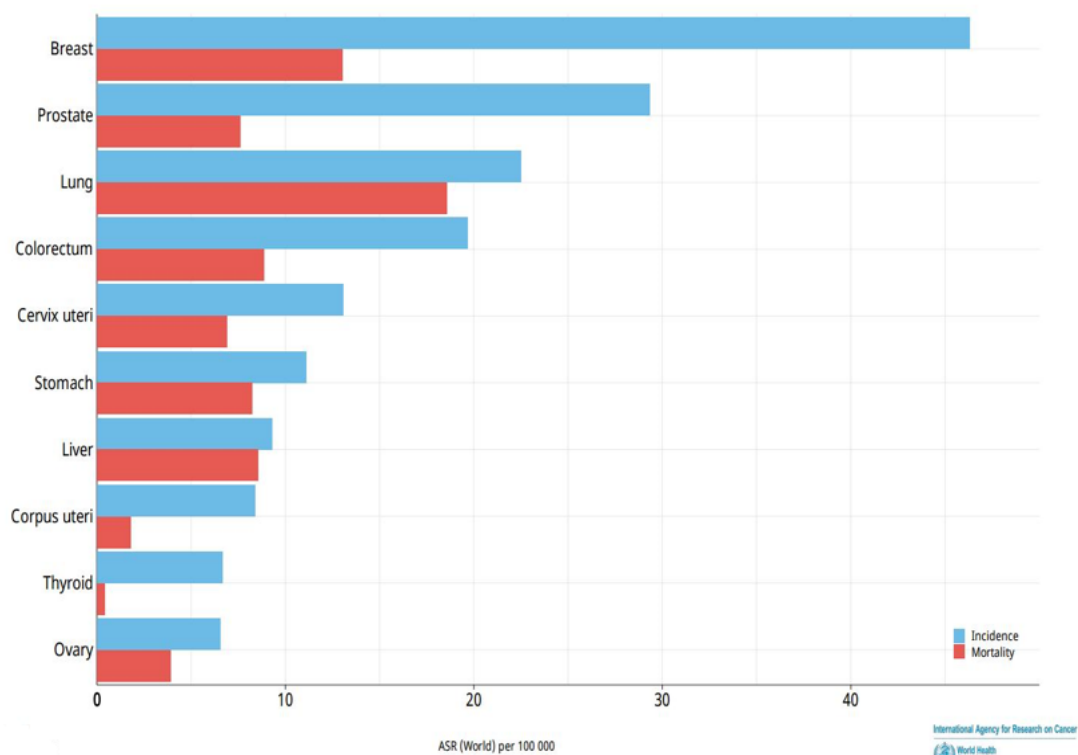


Figura 1. Causas más frecuentes de incidencia y mortalidad a nivel mundial, secundarias a tumores en el año 2018. Datos obtenidos de GLOBOCAN. Disponible online en: <https://gco.iarc.fr>

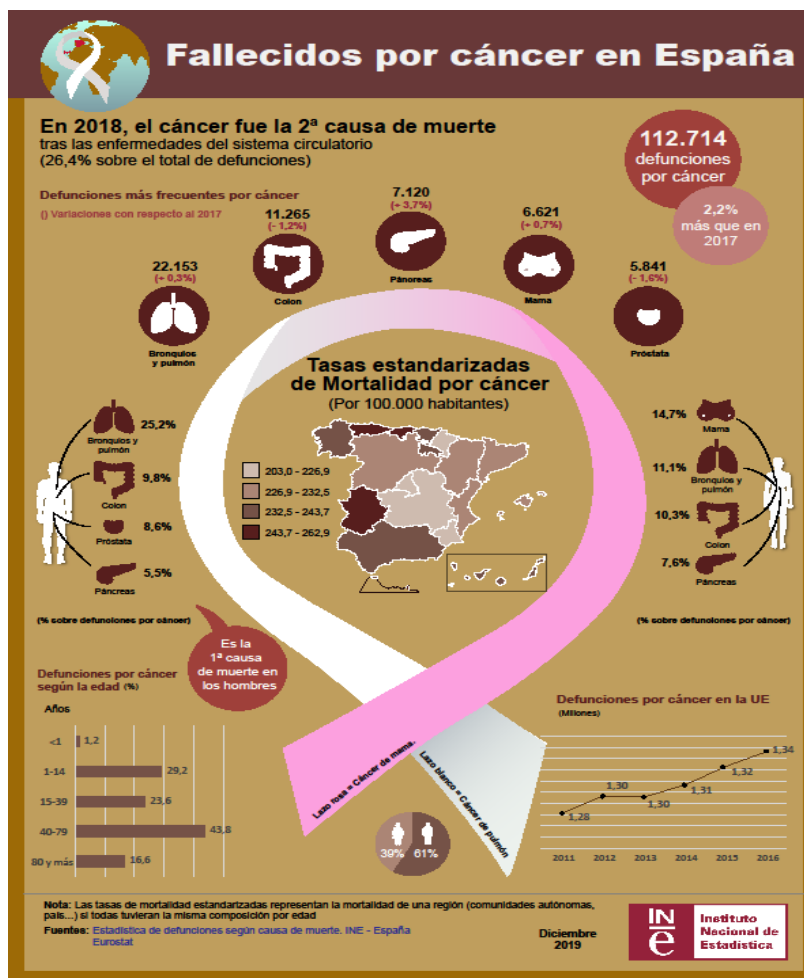


Figura 2. Tasas de mortalidad para los distintos tipos de cáncer en España en 2018. Disponible online: <https://www.ine.es>

1.2. Estadaje y supervivencia del CCR

La supervivencia del CCR depende fundamentalmente del estadio tumoral en el momento del diagnóstico.

En la tabla 1 se muestra la clasificación TNM para el CCR, 8ª edición (2).

ESTADIO 0	Tis	N0	M0
ESTADIO I	T1, T2	N0	M0
ESTADIO II	T3, T4	N0	M0
ESTADIO IIA	T3	N0	M0
ESTADIO IIB	T4a	N0	M0
ESTADIO IIC	T4b	N0	M0
ESTADIO III	Cualquier T	N1, N2	M0
ESTADIO IIIA	T1, T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
ESTADIO IIIB	T1, T2	N2b	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T3, T4a	N1/N1c	M0
ESTADIO IIIC	T3, T4a	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T4b	N1, N2	M0
ESTADIO IV	Cualquier T	Cualquier N	M1
ESTADIO IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
ESTADIO IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b
ESTADIO IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1c

Tabla 1. Estadificación del CCR con la clasificación basada en el sistema TNM, 8ª edición.

Tis: tumor “in situ”, confinado a la mucosa; T1: tumor que invade la submucosa; T2: tumor que invade la *muscularis* propia; T3: tumor que llega hasta la subserosa o los tejidos grasos perirectales; T4a: tumor que invade la superficie del peritoneo visceral; T4b: tumor que invade o se adhiere a órganos o estructuras adyacentes; N0: ausencia de afectación ganglionar; N1: presencia de afectación tumoral en 1 a 3 ganglios linfáticos perirectales (N1a: afectación de 1 ganglios linfático; N1b:

afectación de 2 o 3 ganglios linfáticos; N1c: presencia de depósitos de tumor en subserosa, mesenterio o en tejidos perirectales/mesorectales o depósitos pericólicos no peritonealizados; N2a: afectación de 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos; N2b: afectación de 7 o más ganglios linfáticos adyacentes; M0: ausencia de metástasis; M1: presencia de metástasis a distancia: M1a: metástasis a un órgano distante o a un grupo de ganglios linfáticos distantes, pero sin metástasis peritoneal; M1b: metástasis a dos o más de un órgano distante o a un grupo de ganglios linfáticos distantes, pero sin metástasis peritoneal; M1c: metástasis en la superficie peritoneal, acompañada o no de metástasis en otros órganos o localizaciones.

El estudio EUROCARE (European Cancer Registry Study of Survival and Care of Cancer Patients) es un análisis de base poblacional que proporciona información sobre la supervivencia de los pacientes con cáncer en Europa en los últimos 20 años (3). En España la supervivencia media a los 5 años del cáncer de colon se sitúa en la media de Europa y para el cáncer de recto muy discretamente por encima:

- Cáncer de colon en el 57,1 % (Europa, 57 %)
- Cáncer de recto en el 56,4 % (Europa, 55,8 %)

Los programas de cribado de CCR, ofrecen una oportunidad para la detección del CCR en estadios precoces y en distintos estudios, la polipectomía ha demostrado un aumento de la supervivencia. En el estudio llevado a cabo por Winawer et al, (4) se evaluó a 1.418 pacientes a los que se realizó una colonoscopia y posteriormente se llevó a cabo un seguimiento durante 6 años. La incidencia de CCR durante este período fue de 88 a 90% menor comparada con la población de pacientes con pólipos a los que no se realizó polipectomía, y un 76% menor con respecto al registro de población general.

En España, en 2006, el Sistema Nacional de Salud asumió el cribado del CCR a la población comprendida en la franja de edad de 50 a 69 años, mediante la detección inmunológica de sangre oculta en heces, que se repetirá cada dos años

en caso de resultado negativo para la detección de sangre oculta y en caso positivo, se llevará a cabo la realización de colonoscopia.

1.3. Etiología del CCR. Lesiones precursoras.

En el tracto gastrointestinal podemos distinguir distintos tipos de pólipos (5–8):

➤ Pólipos inflamatorios.

Se forman como consecuencia del proceso regenerativo de un foco inflamatorio, por lo que carecen de potencial de degeneración neoplásica.

➤ Pólipos hamartomatosos

Son consecuencia de la proliferación de células maduras de la mucosa. Se presentan principalmente en el contexto de dos entidades clínicas: la poliposis juvenil y el síndrome de Peutz-Jeghers.

➤ Pólipos serrados

Este tipo de lesiones representa un grupo heterogéneo de lesiones que engloba a los pólipos hiperplásicos, lesiones serradas sésiles o adenomas serrados tradicionales. Estos dos últimos tipos de lesiones son precursoras de CCR a través de la vía serrada de la carcinogénesis.

○ Pólipos hiperplásicos

- Constituyen el 20-30% de todos los pólipos colónicos. Se trata de pólipos de pequeño tamaño (≤ 5 mm), con morfología plana o sésil. Alrededor del 70-80% se localizan en colon distal. A nivel histológico, la superficie del epitelio colónico muestra un patrón característico en "diente de sierra" en la parte superficial de las criptas del colon, con una arquitectura normal comparada con la mucosa normal del colon.

- Lesiones serradas sésiles (previamente denominados como adenomas o pólipos serrados sésiles) (8)
 - Representan alrededor del 5-15% de todos los pólipos serrados. Se encuentran más frecuentemente localizados en el colon proximal. Estos pólipos se caracterizan por un mayor tamaño (5-7 mm) y una superficie con una "apariencia de nube". A menudo son planos o sésiles y pueden estar cubiertos de moco (9). La característica histológica principal es la presencia de distorsión arquitectónica como consecuencia de alteraciones en la zona proliferativa de las criptas, dando lugar a la presencia de criptas horizontales o dilatadas en la base de la cripta y/o criptas ramificadas que se extienden en la base de la cripta.
 - Este tipo de lesiones frecuentemente presentan displasia. En un estudio encontraron áreas de displasia en el 37%, y carcinoma intramucoso (displasia de alto grado) en el 11% de estas lesiones (6). Entre los pacientes que presentan este tipo de lesiones, los factores de riesgo para el desarrollo de un adenoma avanzado sincrónico incluye la presencia de lesiones con un tamaño ≥ 10 mm, la ubicación en el colon proximal y la presencia de displasia (10–14).
 - Las lesiones serradas sesiles, particularmente aquellas con focos de displasia, se consideran posibles lesiones precursoras del cáncer de colon esporádico a través de la llamada vía del fenotipo metilador de islas CpG (CpG island methylator phenotype, CIMP) o vía serrada de carcinogénesis. Alrededor del 15 y el 30% de los CCR podrían estar asociados a esta vía (15). La activación de mutaciones en *BRAF* parece ser la lesión precursora, dando lugar a una metilación generalizada de las

islas CpG (CIMP). El CIMP produce el silenciamiento de muchos genes, incluidos algunos genes supresores de tumores (10–12,16). Existe una fuerte asociación entre el CIMP, la mutación de BRAF y la IMS, probablemente debida ésta última a la hipermetilación somática de MLH1 vinculada a este fenotipo metilador (13,14,17).

- Adenomas serrados tradicionales
 - Es el tipo menos frecuente (<1%). Se localizan más frecuentemente en el colon rectosigmoideo, presentan un tamaño superior a las lesiones serradas sésiles, y pueden ser pediculados o sésiles. Desde el punto de vista histológico, se trata de pólipos vellosos. También pueden presentar displasia citológica difusa, pero a menudo leve. La presencia de criptas ectópicas es característica de este tipo de lesiones (18).

En relación al síndrome de poliposis serrada, el diagnóstico clínico de esta entidad requiere la presencia de uno de los dos criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (8):

- Más de 20 pólipos serrados de cualquier tamaño, distribuidos en todo el colon.
 - Al menos 5 pólipos serrados proximales al recto > 5 mm, de los cuales, dos de ellos al menos con un tamaño ≥ 10 mm, dos de ellos mayores a 10 mm de diámetro.
-
- Pólipos adenomatosos.

Constituyen los pólipos más prevalentes en el colon. La mayoría (85%) son adenomas tubulares, es decir, presentan menos de un 20% de componente

velloso. Tan sólo un 10% son tubulovelloso y alrededor del 5% son vellosos (representados por más de un 80% de componente velloso). Existe cierto grado de displasias (anormalidades citológicas y estructurales) en todos los adenomas. Según el grado de displasia, los pólipos pueden ser de bajo o alto grado de displasia. En el carcinoma in situ (pTis de la clasificación TNM) o adenocarcinoma intramucoso, los focos neoplásicos invaden la lámina propia y puede afectar la capa muscularis de la mucosa, pero sin penetrarla y, por tanto, posee nula capacidad de diseminación. Sin embargo, el pólipo maligno (pT1), representa un adenoma con áreas de transformación carcinomatosa que se extienden a la capa submucosa y, en consecuencia, constituye un carcinoma invasivo precoz, con capacidad de diseminación.

Sólo una pequeña minoría de adenomas progresa a cáncer (5% o menos) durante un intervalo de 7 a 10 años. El riesgo de progresión es mayor para los adenomas avanzados (adenoma con displasia de alto grado, > 10 mm de tamaño o con componente velloso) (7,19,20).

Los pólipos adenomatosos se clasifican en función de (21):

a) Patrón glandular:

- Tubular: los adenomas tubulares representan más del 80% de los adenomas de colon. Se caracterizan por una red de epitelio adenomatoso ramificado. Para ser clasificado como tubular, el adenoma debe tener un componente tubular de al menos 75%.
- Velloso: para ser clasificado como velloso, el adenoma debe tener un componente velloso de al menos 75%. Representan del 5-15% de los adenomas. Se caracterizan por glándulas que son largas y se extienden directamente desde la superficie hasta el centro del pólipo.

- Tubulovelloso: aquellos adenomas con características vellosas del 25-75%. Los adenomas tubulovelloso representan del 5-15% de los adenomas de colon.

- b) Grado de displasia. Existe cierto grado de displasia en todos los adenomas. El grado de displasia se determinará en función su foco de displasia de mayor grado hallado. Según el grado de displasia, los pólipos se clasifican por tener:
 - Displasia de bajo grado
 - Displasia de alto grado

La displasia de alto grado (sinónimo de carcinoma intraepitelial) representa un paso intermedio en la progresión de una displasia de bajo grado a cáncer. El término se aplica a las lesiones que están confinadas a la capa epitelial de las criptas y carecen de invasión a través de la membrana basal hacia la lámina propia. Como no hay vasos linfáticos en la lámina propia, las lesiones con displasia de alto grado no están asociadas con metástasis (22,23).

En el carcinoma in situ (Tis) o en el adenocarcinoma intramucoso, las células cancerosas invaden la lámina propia y pueden afectar pero no penetrar la muscularis mucosa (21,24). El adenocarcinoma invasivo se extiende a través de la mucosa muscular hasta la submucosa o en mayor profundidad.

1.4. Carcinogénesis colorrectal

El CCR evoluciona a través de la acumulación de alteraciones genéticas y/o epigenéticas, que conducen primero a la transformación de la mucosa colónica normal en una lesión benigna, y posteriormente, al desarrollo de un carcinoma invasor.

En la actualidad se reconocen tres vías moleculares diferentes en el proceso de carcinogénesis colorrectal: vía de la inestabilidad cromosómica (CIN), vía de la inestabilidad de microsatélites (IMS) y vía del fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) o vía serrada. Estas vías, no son mutuamente excluyentes ya que algunos tumores exhiben características de más de una vía (Fig.3).

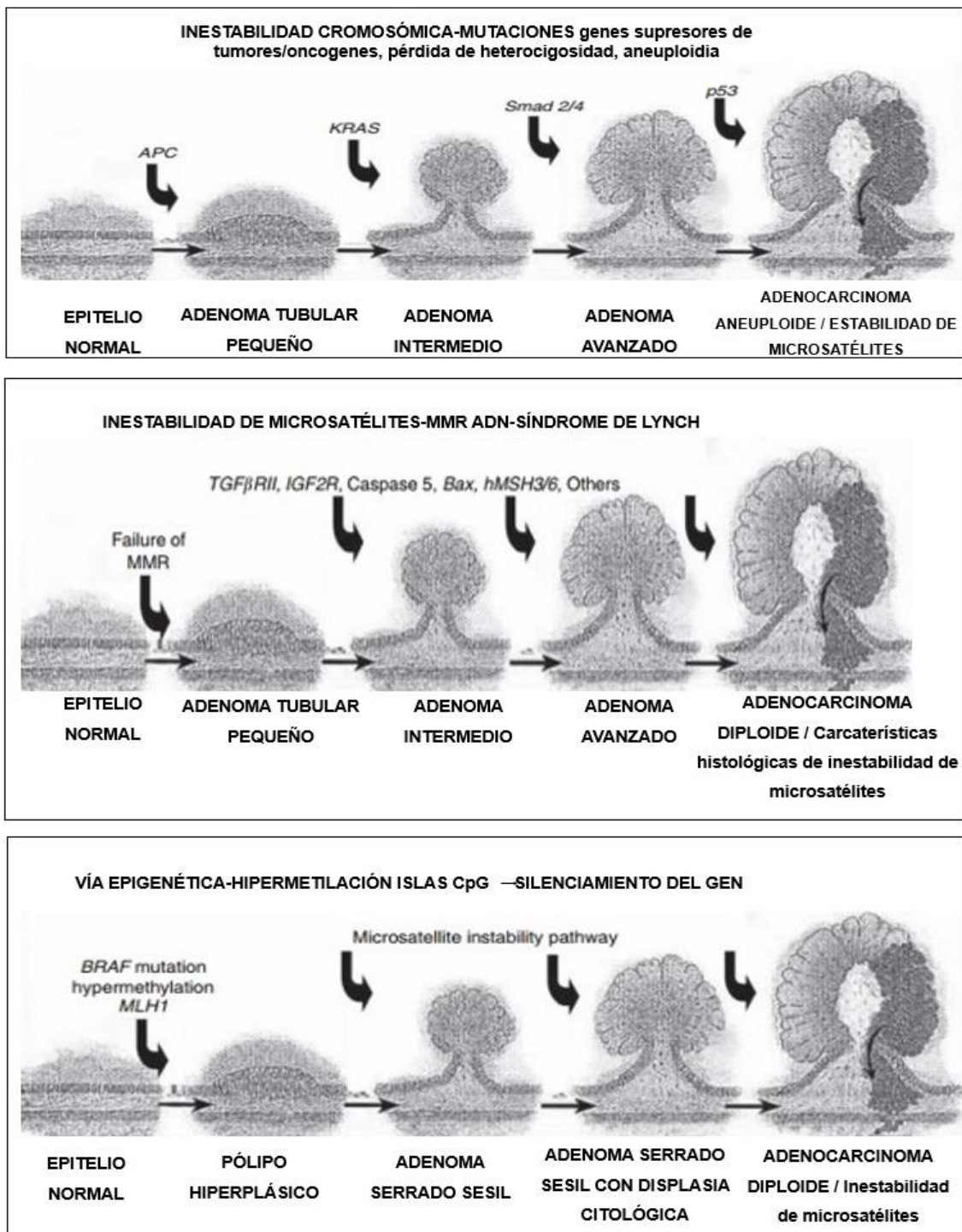


Figura 3. Vías carcinogénicas en CCR. Secuencia propuesta de fenómenos genéticos moleculares en la evolución del cáncer de colon. Fuente: Ahnen et al. 2011.

Vía supresora o de inestabilidad cromosómica

Es la causa más común de inestabilidad genómica. Se desarrolla de acuerdo con el modelo de progresión clásico adenoma-carcinoma propuesto por Vogelstein y Fearon.

El origen del adenoma se produce por un fallo en el proceso normal de proliferación y apoptosis celular. La aberración inicial se origina en una cripta colónica, dando lugar a una proliferación en primer lugar monoclonal y posteriormente policlonal.

Esta evolución de adenoma a carcinoma suele durar entre unos 5 a 10 años y se apoya en datos epidemiológicos, clínicopatológicos y genéticos (4,25–29). En esta vía carcinogénica, el desarrollo del CCR se inicia por mutaciones en el gen *APC*, lo que conduce a la formación de un adenoma benigno en la mucosa colónica (30–33). Posteriormente, mutaciones en *KRAS*, dan lugar a un aumento de la tasa de proliferación y progresión hacia un adenoma avanzado. Por último, mutaciones en otros genes (*TP53*, deleciones del cromosoma 18q), favorecen la progresión hacia CCR. Por tanto, las mutaciones en los oncogenes y los genes supresores tumorales potencian la proliferación celular e inhiben la apoptosis. Sin embargo, los genes de estabilidad mantienen las alteraciones genéticas al mínimo y, por tanto, cuando se inactivan permiten las consecuencias de mutaciones en otros genes.

Vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites

Aproximadamente un 12-17% de los CCR se desarrolla a través de esta vía (34). Estos tumores se producen como consecuencia de la existencia de mutaciones en los genes que habitualmente se encargan de la reparación de errores en el ADN. La inactivación de estos genes aumenta la tasa de mutaciones durante la síntesis de ADN, con un aumento en las anomalías estructurales que tienden a aparecer en secuencias repetitivas de ADN. Esta característica se llama inestabilidad de microsatélites (IMS) y se observa en más del 95% de los tumores en pacientes con CCR u otros tumores asociados con SL.

No obstante, cabe tener en cuenta que la mayoría de los CCR con IMS son casos esporádicos (alrededor del 80-85%), donde la presencia de IMS se debe a la hipermetilación somática del promotor del gen *MLH1* (35). Pero hay un pequeño porcentaje de CCR con IMS (15-20%) que son de origen hereditario, como es el caso de los pacientes con SL, donde la alteración del sistema MMR ocurre a nivel germinal (34).

Los tumores con fenotipo con IMS tienen una elevada tasa de mutaciones puntuales (fenotipo hipermutador) y pocas anomalías cromosómicas, siendo la gran mayoría de ellos diploides, al contrario que los tumores que siguen la vía de inestabilidad cromosómica. El "fenotipo mutador" se descubrió en bacterias en los años 1970 y 1980 y estaba bien caracterizado a principios de la década de 1990. Es causada por la inactivación mutacional de genes involucrados en la reparación del ADN. Por tanto, cuando se deteriora el sistema MMR que corrige errores de replicación en el ADN, las células acumulan gran cantidad de mutaciones, que se cree que conduce a la transformación maligna y, finalmente, a la formación de tumores con un fenotipo hipermutado.

Vía del fenotipo metilador (CIMP) o Vía Serrada

La metilación del ADN tiene lugar en las citosinas (C) seguidas de guaninas (G) principalmente en las llamadas islas CpG de los promotores de los genes. Las islas CpG son regiones del genoma de entre 0,5-5 Kilobases con un contenido en dinucleótidos CG superior al 55%. Se ha demostrado la existencia de un conjunto de tumores de colon que muestra alto grado de metilación en esta región, y se ha caracterizado mediante un nuevo fenotipo, el denominado fenotipo metilador de islas CpG (36,37).

Por tanto, además de las vías de carcinogénesis anteriormente descritas, en los últimos años se ha profundizado en el conocimiento de una nueva vía, la vía del fenotipo metilador o vía serrada de carcinogénesis, que surge a partir de una lesión

precursora de morfología serrada y parece no seguir los mecanismos habituales de la secuencia clásica adenoma-carcinoma (38).

La carcinogénesis en la vía serrada parece iniciarse mediante una mutación que activa el oncogén *BRAF (V600E)*, lo que ocasiona una inactivación de la apoptosis fisiológica a nivel de las células epiteliales del colon (39). A partir de ese momento, las lesiones serradas pueden dar lugar a pólipos hiperplásicos o adenomas serrados y estas lesiones son muy propensas a la metilación de las islas CpG de regiones promotoras de múltiples genes (40). En el contexto del CCR, la hipermetilación de las islas CpG da lugar a un mecanismo epigenético que permite la represión transcripcional de genes que son importantes en el desarrollo neoplásicos como *p16*, *MGMT* o *MLH1* (35,41,42).

Por tanto, el fenotipo metilador, la inestabilidad de microsatélites y la inestabilidad cromosómica constituyen los tres mecanismos de inestabilidad genética y epigenética más importantes del CCR.

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE DEFICIENCIA EN LA FUNCIÓN DE LOS GENES REPARADORES DEL ADN

El estudio de las alteraciones del mecanismo de reparación puede realizarse en 3 ámbitos analizando:

- a) Inestabilidad de microsatélites
- b) Expresión de proteínas de los genes MMR
- c) Mutaciones en los genes MMR

a) Microsatélites

Los microsatélites son secuencias cortas (1-6 pares de bases) repetitivas en tándem de uno a cuatro nucleótidos que existen en el ADN en condiciones normales

y que se denominan mono-, di-, tri- y tetranucleótidos. Durante la replicación del ADN, estas secuencias son muy propensas a desalinearse o aparearse incorrectamente por causa de un fenómeno conocido como deslizamiento de las hebras (*slippage*). Como resultado de ese deslizamiento, se producen deleciones o inserciones en las secuencias microsatélites, que son corregidas por el sistema de reparación del ADN de los errores de la replicación (MMR). Este sistema está formado por cuatro proteínas: MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 (34). La pérdida de función de cualquiera de los elementos que intervienen en este mecanismo produce la acumulación de errores de tipo inserción o deleción a lo largo de todo el genoma tras la replicación del ADN. Si los microsatélites se encuentran en la región codificante de los genes, estos errores pueden ocasionar pérdida de función por mutaciones de desplazamiento del marco de lectura (*frameshift*), codones de stop prematuros y, por tanto, proteínas truncadas y defectuosas.

Por tanto, cuando se deteriora el sistema MMR, las células acumulan gran cantidad de mutaciones, lo que conduce a la transformación maligna y, finalmente, a la formación de tumores con un fenotipo hipermutado (34).

En 1998, el National Cancer Institute (43), en un esfuerzo por unificar criterios a la hora de detectar la IMS en cánceres colorrectales, recomendó el análisis de un panel de 5 marcadores, 2 de tipo mononucleótido (BAT-25 y BAT-26) y 3 de tipo dinucleótido (D2S123, D5S346 y D17S250). Actualmente, el diagnóstico de IMS se realiza, de modo consensuado, analizando un panel de cinco marcadores de microsatélites quasi-monomórficos que muestran una alta sensibilidad y especificidad para su detección (BAT25, BAT26, NR21, NR24 Y NR27). Se considera que un tumor presenta alta IMS (IMS-H) si muestra inestabilidad en el 40% de los loci examinados (en 2 o más marcadores) y baja IMS (IMS-L) si aparece en un solo marcador, o estables en los casos en los que no aparece inestabilidad. Actualmente tiende a abandonarse el concepto de IMS-L porque se ha demostrado que este grupo presenta características superponibles a las de los tumores sin IMS. Excepto que se especifique lo contrario, el término IMS+ se refiere a los antes denominados IMS-H.

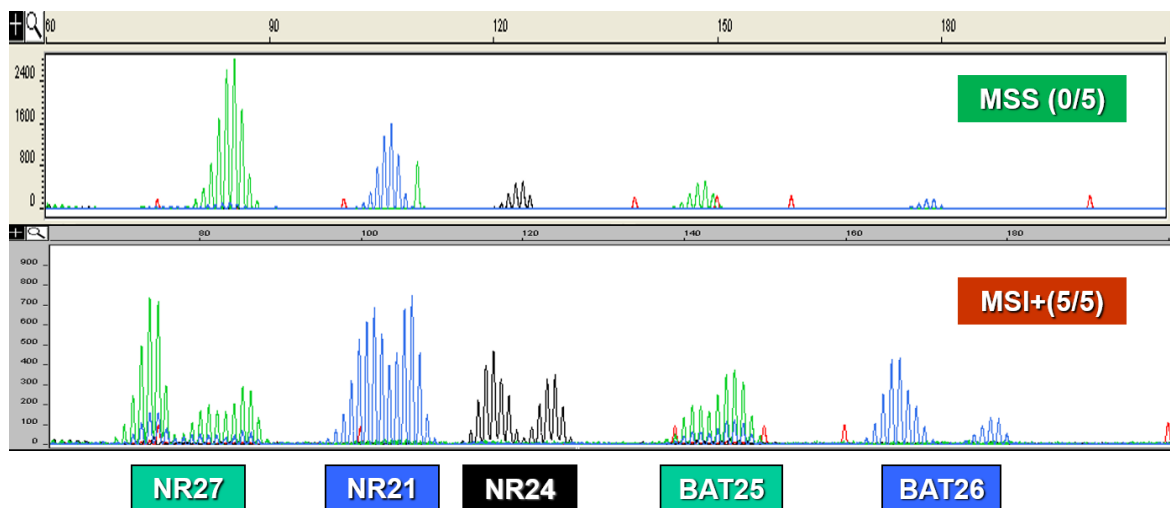


Figura 4. Imagen que muestra el análisis de microsatélites. En la parte superior el tumor no muestra inestabilidad de microsatélites, mientras que, en la parte inferior, el tumor sí muestra inestabilidad de microsatélites.

Los CCR que se desarrollan a través de la vía de la IMS, sean esporádicos o hereditarios, comparten determinadas características (Fig.5)

- La localización es más frecuente en colon proximal (44).
- Su presentación histológica es habitualmente con pobre grado de diferenciación, de tipo mucinoso, medular, en anillo de sello y con frecuente infiltración linfocitaria peri e intratumoral. La mayoría de los tumores presenta un patrón de crecimiento expansivo (45–49).
- En cuanto al potencial maligno, en general tienen mejor pronóstico y supervivencia que el resto de los CCR. Los tumores con IMS invaden con mayor profundidad la pared del colon, pero, en cambio, se diagnostican en estadios menos avanzados, siendo menos frecuente la presencia de metástasis ganglionares o a distancia. Por otra parte, algunos estudios han mostrado que con frecuencia los CCR con IMS tienen un tamaño mayor en el momento del diagnóstico (50–54).

- Los tumores esporádicos, con fenotipo mutador afectan a individuos de edad similar a la del resto de los pacientes con CCR. Como suele ocurrir en los cánceres hereditarios, en general los CCR con IMS que aparecen en el SL se diagnostican en edad más temprana (52,55).

Características clínicas e histopatológicas de las neoplasias colorrectales con fenotipo mutador
Localización frecuente en colon proximal
Pobre grado de diferenciación histológico. Presentación histológica frecuentemente de tipo mucinoso, medular, en anillo de sello y con frecuente infiltración linfocitaria peri e intratumoral. Patrón de crecimiento tumoral expansivo
Mejor supervivencia que el resto de los CCR

Figura 5: Características clínicas e histopatológicas de las neoplasias colorrectales con fenotipo mutador.

Análisis inmunohistoquímico

El sistema MMR está controlado fundamentalmente por las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. Entre ellas forman complejos heterodiméricos. El más abundante y primero en actuar está formado por MSH2-MSH6. A este complejo se le une posteriormente otro formado por MLH1-PMS2. El complejo final escinde el error del ADN y lo repara. Si ambos alelos de alguno de estos genes se inactivan por cualquier mecanismo (delección, mutación o metilación), los errores de replicación no se pueden reparar y se acumularán mutaciones en microsatélites, produciéndose IMS y desarrollándose el CCR. La inactivación de ambos alelos tiene como consecuencia la pérdida de expresión de la proteína, lo cual puede detectarse

mediante inmunohistoquímica, lo que ofrece la ventaja de dirigir el análisis genético al gen que codifica para la proteína no expresada (46). En la tabla 2 se especifica la interpretación de los diferentes patrones de pérdida de expresión proteica a nivel tumoral.

Patrón inmunohistoquímico en el CCR	Sospecha de mutación germinal
Pérdida de expresión de MLH1/PMS2	MLH1
Pérdida de expresión de MSH2/MSH6	MSH2
Pérdida de expresión de MSH6	MSH6
Pérdida de expresión de PMS2	PMS2
Expresión normal de las 4 proteínas	No sospecha de mutación (valorar confirmar mediante IMS)

Tabla 2. Patrones de expresión proteica por inmunohistoquímica del sistema de reparación del ácido desoxirribonucleico.

En los tumores del síndrome de Lynch puede observarse pérdida de expresión de cualquiera de las proteínas MMR (MLH1 50%, MSH2 39%, MSH6 7%, PMS2<4%). Un mínimo porcentaje (5% aproximadamente) de pacientes con mutación germinal puede mostrar expresión conservada de las cuatro proteínas. Esto puede ser debido a la expresión de una proteína mutante no funcional pero con conservación del epítipo reconocido por el anticuerpo, o bien, que la mutación esté en alguno de los otros genes que controlan el MMR (*PMS1* o *MLH3*) (56,57).

La pérdida de expresión de MLH1 generalmente se asocia a pérdida secundaria de PMS2. De la misma forma, la pérdida de MSH2 suele asociarse a pérdida secundaria de MSH6. Las pérdidas aisladas de PMS2 o MSH6, indicativas de mutación en estos genes, son poco frecuentes y sólo deben considerarse tras haber observado expresión de MLH1 y MSH2.

Sin embargo, los CCR que muestran IMS y / o pérdida de expresión de la proteína MLH1 no son exclusivos de SL y ocurren en hasta el 15% de todos los CCR esporádicos.

Los CCR esporádicos con pérdida de expresión inmunohistoquímica de MLH1, son debidos a la metilación de la isla CpG en el promotor del gen *MLH1*, lo que provoca el silenciamiento transcripcional del gen *MLH1*. La distinción entre el CCR con IMS asociado a SL y el CCR con IMS esporádico es clínicamente importante, ya que las vías de carcinogénesis son diferentes. A diferencia de CCR asociado a SL en el cual la secuencia de adenoma a carcinoma ha sido reconocida durante mucho tiempo como la principal vía de carcinogénesis colorrectal (30), los casos de CCR esporádicos con IMS son secundarios a una vía alternativa donde el CCR se desarrolla a partir de pólipos precursores con arquitectura serrada (58). La vía serrada se caracteriza por un fenotipo metilador de isla CpG (CIMP), la mutación *BRAF* (V600E) y la metilación del promotor del gen *MLH1*.

Por este motivo, en estos casos, en lugar de proceder directamente al análisis de mutaciones en *MLH1*, se debe realizar previamente el análisis de mutaciones somáticas en el gen *BRAF* (V600E) puesto que ha demostrado ser de utilidad, ya que la presencia de mutación somática en este gen se asocia a los tumores con hipermetilación de MLH1 y por tanto a un origen esporádico (42,59–61).

Valoración de la inmunohistoquímica

El estudio inmunohistoquímico se basa en la tinción histológica con anticuerpos sobre tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina. Para su

valoración siempre se dispone de controles internos positivos (estroma, linfocitos), necesarios para poder determinar que la ausencia de expresión en un tumor no es debida a un problema de la técnica. Un caso se considera con pérdida de expresión cuando no se observa inmunotinción en ninguna célula neoplásica. Frecuentemente la tinción obtenida es heterogénea. Por ello, siempre se debe valorar la pérdida de expresión en un campo de gran aumento que disponga de controles internos positivos (46) (Fig. 6). El resultado inmunohistoquímico debe expresarse como presencia o ausencia de expresión de cada una de las proteínas o como no valorable si no se obtienen controles internos adecuados.

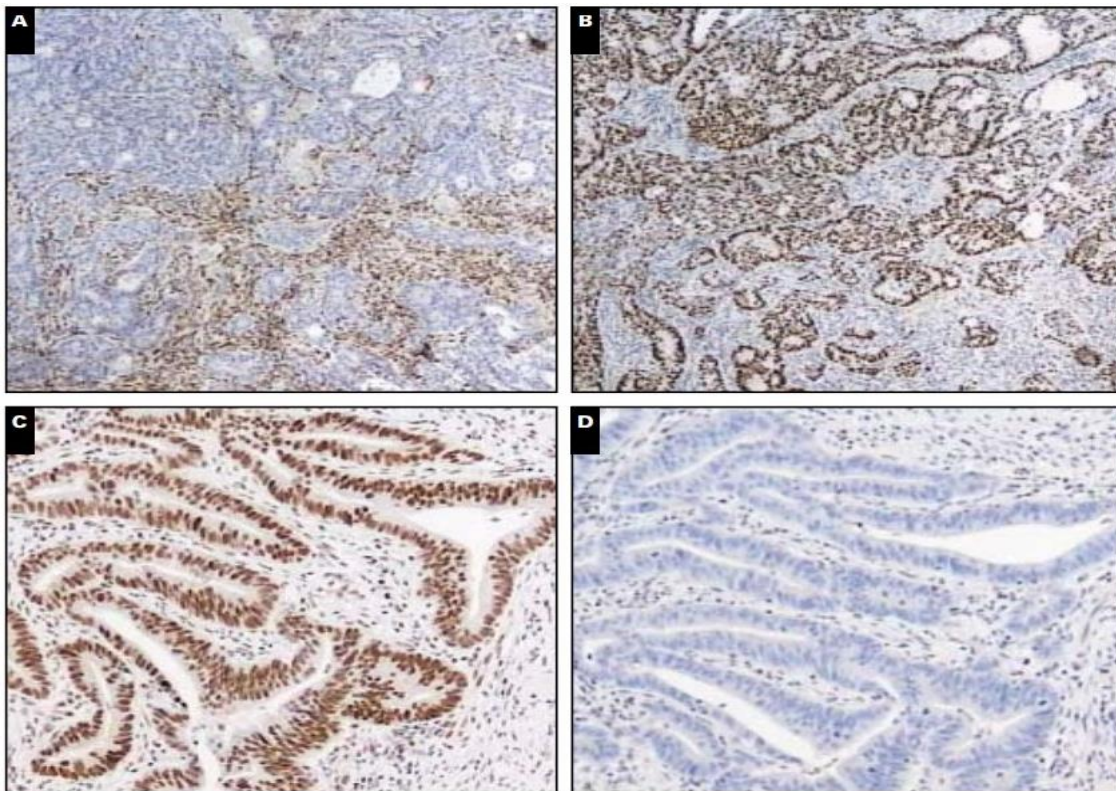


Figura 6. A. Muestra pérdida de expresión en MLH1. B. Expresión conservada en MSH2. C. Expresión conservada en MLH1. D. Pérdida de expresión en MSH2.

Análisis genético

El análisis genético permite identificar la alteración puntual del gen. Está especialmente indicado en casos con sospecha de SL, no sólo para su confirmación sino también para la identificación de familiares portadores. En los casos esporádicos el gen está inactivado sólo en el ADN tumoral, mientras que en los casos de CCRHNP la mutación es germinal y, por tanto, también se halla presente en el ADN constitucional.

Entre los individuos con SL, las mutaciones en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* se encuentran aproximadamente en 37%, 41%, 13% y 9%, respectivamente (57).

El estudio genético de las mutaciones germinales se realiza con una extracción de sangre periférica. Este análisis implica por un lado el estudio de mutaciones puntuales, así como inserciones o deleciones de pequeño tamaño, mediante secuenciación Sanger de la región codificante completa y las uniones intrón-exón del gen en cuestión; y por otro lado, el estudio de grandes reordenamientos genéticos en dichos genes mediante MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) (62–64). Hasta la actualidad se conocen más de 300 mutaciones germinales, estando la mayoría localizadas en los genes *MLH1* y *MSH2* (65–69).

1.5. Síndromes con riesgo familiar de CCR

La mayor parte de los CCR que se diagnostican (75%) son esporádicos, es decir se desarrollan en pacientes sin antecedentes familiares de la enfermedad y en general a partir de los 50 años. Por otra parte, los estudios con gemelos han demostrado que hasta el 35% de los casos de CCR tienen un componente familiar (70). Por último, sólo un porcentaje más pequeño de los casos de CCR (3-5%) son

secundarios a un síndrome hereditario causado por una mutación en línea germinal, en un gen de alta penetrancia (gen *APC*, gen *MuTYH*, genes MMR, entre otras causas menos frecuentes de mutaciones) (71) (fig. 7). Dentro de estos síndromes hereditarios que asocian un elevado riesgo de desarrollo de CCR, podemos diferenciar dos grupos:

- a) CCR asociado a poliposis intestinal (poliposis adenomatosa familiar, Sd Peutz-Jeghers, Sd poliposis juvenil)
- b) SL o CCRHNP

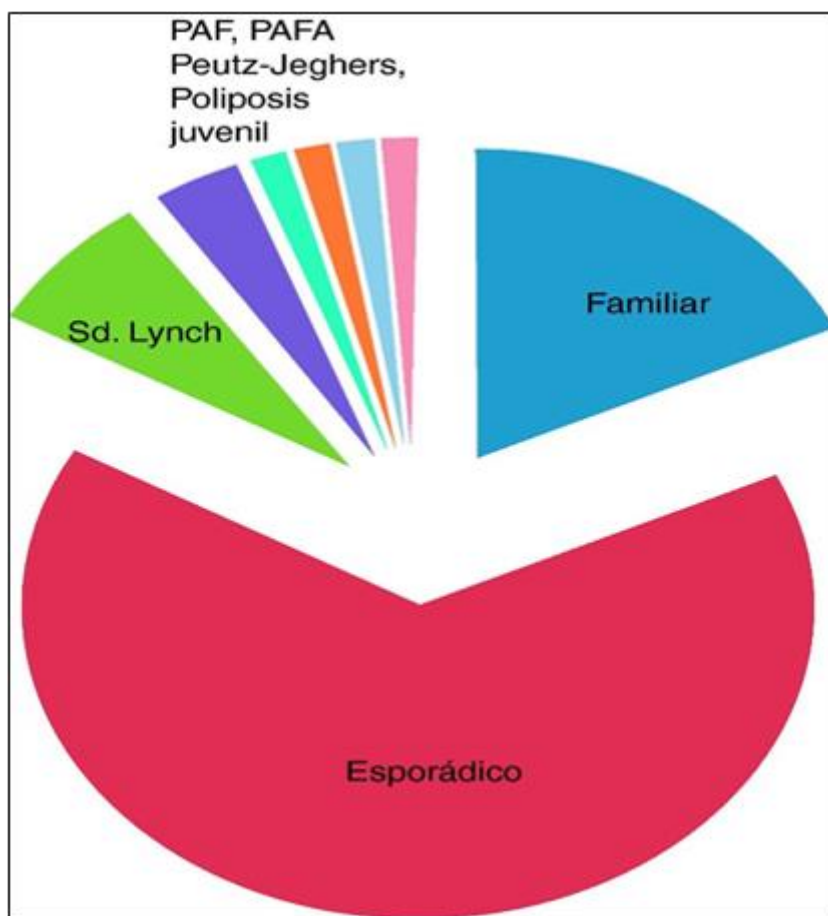


Figura 7. Distribución de las distintas entidades de CCR.

El cáncer colorrectal familiar se define como un grupo heterogéneo de individuos portadores de un mayor riesgo familiar de desarrollar CCR sin identificar una causa genética conocida. En aquellas personas que presentan antecedentes familiares de CCR, el riesgo de desarrollo de CCR depende de varios factores (grado de parentesco, número de miembros de la familia afectados o la edad en el momento del diagnóstico del CCR) (72,73).

A continuación, se detallan los diferentes grupos de riesgo familiar que condicionan un incremento de CCR:

GRUPO DE RIESGO FAMILIAR	DEFINICIÓN
CCR familiar	Presentan un incremento en el riesgo de desarrollo de CCR debido a la presencia de antecedentes familiares de CCR, pero no se identifica una causa genética conocida.
Cáncer colorrectal hereditario tipo X	Familia que cumple criterios de Amsterdam tipo I con sistema de reparación normal en el tumor
Síndrome de Lynch	Mutación causante en <i>MLH1/MSH2/MSH6/PMS2/EPCAM</i> identificada
Poliposis adenomatosa familiar	Causada por mutación en <i>APC</i> o en <i>MUTYH</i>
Sd Peutz-Jeghers	Mutación en <i>STK11</i> . Pólipos hamartomatosos
Otros síndromes de poliposis	Cronkite-Canada, poliposis juvenil, poliposis hereditaria mixta (hiperplásico, adenoma serrado o adenomatosa sin mutación identificada en <i>APC</i> o en <i>MUTYH</i>)

Tabla 3. Grupos de riesgo familiar que condicionan un incremento de CCR.

Dentro del grupo de síndromes hereditarios que asocian un riesgo incrementado de desarrollo de CCR, el más frecuente es el cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP) o síndrome de Lynch (SL).

1.5.1. Cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP) o síndrome de Lynch.

El síndrome de Lynch es un trastorno hereditario que predispone al desarrollo de diferentes tipos de tumor. Actualmente, el síndrome de Lynch es la forma más frecuente de CCR hereditario, representando el 1-3 % de todos los CCR (74). Es un trastorno autosómico dominante, con penetrancia elevada, por lo que se observa la afectación de múltiples generaciones. Se caracteriza principalmente por el elevado riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal (CCR) principalmente, seguido de un elevado riesgo de desarrollo de cáncer de endometrio (75) (Fig. 8). Aunque con menor frecuencia, también se encuentra incrementado el riesgo de desarrollo de neoplasias de ovario, tracto urinario alto (pelvis renal y uréter), estómago, intestino delgado, tracto biliar, páncreas, cutáneos (como adenomas sebáceos, carcinomas sebáceos y múltiples queratoacantomas. Esta variante de expresión fenotípica es conocida como síndrome de Muir-Torre), y cerebro (glioblastomas; síndrome de Turcot) (65,76,77). En el estudio realizado por Møller et al (78), se observó una incidencia acumulada para el CCR a los 75 años del 46%, 43% y 15% en los portadores de mutación en los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*, respectivamente; para el cáncer de endometrio: 43%, 57% y 46%; para el cáncer de ovario: 10%, 17% y 13%; para gastrointestinal superior (gástrico, duodenal, conducto biliar o cánceres pancreáticos): 21%, 10% y 7%; para neoplasias del tracto urinario: 8%, 25% y 11%, y para tumores cerebrales: 1%, 5% y 1%, respectivamente. El cáncer de ovario ocurrió principalmente en la fase premenopáusica. Por el contrario, las neoplasias en tracto gastrointestinal superior y tracto urinario ocurrieron predominantemente a edades más tardías. La supervivencia general a los 5 años para la neoplasia de colon fue de 96%, para las neoplasias en sigma y recto del 75%, para la neoplasia

de endometrio del 93%, para las neoplasias de ovario, del 83%, de vejiga urinaria del 93%, uréter 85%, duodeno 67%, estómago 61%, tracto biliar 29%, cerebro 22% y páncreas 0%. Los portadores de mutación en *PMS2* tenían menor riesgo de cáncer.

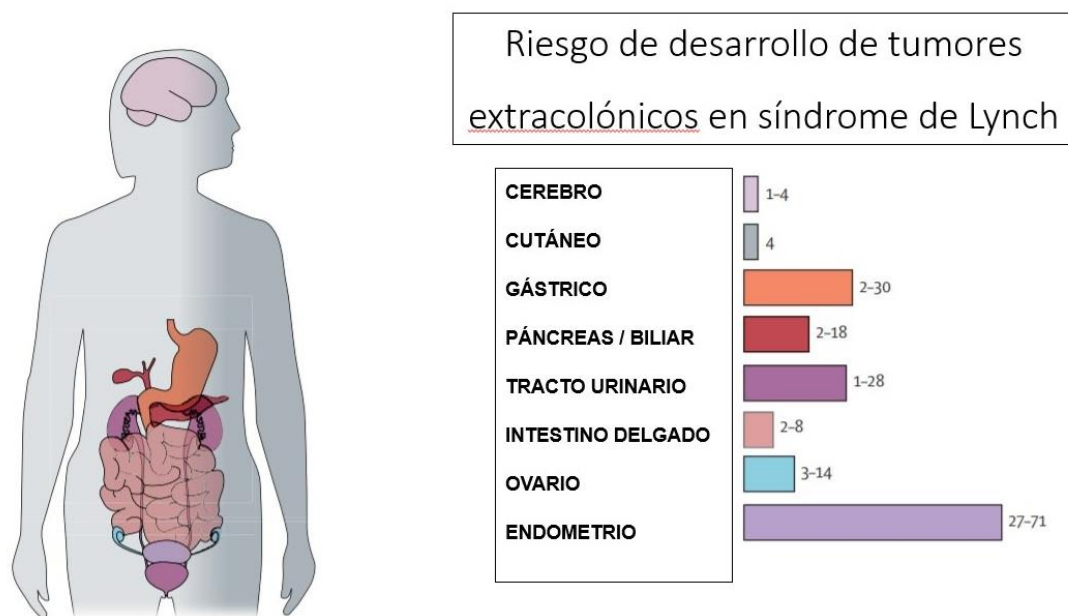


Figura 8. Riesgo de desarrollo de tumores extracolónicos en síndrome de Lynch. Fuente: Koornstra JJ et al. 2009.

Casi todos los tumores relacionados con este síndrome se caracterizan por una edad temprana de aparición (edad media aproximada de 45 años), las neoplasias de colon suelen localizarse en colon derecho (aproximadamente el 70% presentan una localización proximal a ángulo esplénico) y con frecuencia son tumores que muestran las siguientes características en el estudio histológico: peor grado de diferenciación, productores de mucina y con intenso infiltrado linfocitario. En estos pacientes es frecuente la aparición de otros CCR sincrónicos (definidos como la presencia de más de un CCR en los seis primeros meses desde el diagnóstico de CCR inicial) y CCR metacrónicos (aquellos diagnosticados a partir de los seis meses, tras el diagnóstico de CCR inicial (65,76,77)).

El SL está causado por mutaciones en la línea germinal en alguno de los genes MMR. La mayoría de los pacientes con SL presentan mutaciones en los genes *MLH1* o *MSH2*, aunque también se pueden observar con menor frecuencia mutaciones en los genes *MSH6* y *PMS2* (57). Estos genes son responsables de corregir los errores que ocurren durante la replicación del ADN denominados apareamiento incorrecto y que da lugar a anomalías estructurales que involucran bases no apareadas. Por tanto, la inactivación de estos genes incrementa la tasa de mutaciones durante la síntesis del ADN, con presencia de un aumento de estas anomalías estructurales que tienden a aparecer en secuencias de ADN repetitivas. Esta característica se denomina "inestabilidad de microsatélites" (IMS) y se observa en más del 95% de los tumores de pacientes con CCR u otros tumores asociados a SL (43).

Por otra parte, la IHQ con anticuerpos frente a las proteínas de los genes reparadores del ADN muestra si hay expresión o pérdida de la misma de estos genes y puede ser útil para identificar posteriormente alteraciones en los genes MMR (79).

Dada la alta prevalencia de CCR en los pacientes con SL y, aunque con menor frecuencia, también de desarrollo de otras neoplasias, es de vital importancia la sospecha clínica de este síndrome. Por ello, con el fin de identificar los pacientes con riesgo de padecer SL, se desarrollaron hace años una serie de criterios clínicos que permitiesen seleccionar a los pacientes con sospecha de SL.

1.5.1.1. Criterios clínicos para el diagnóstico de síndrome de Lynch

En 1989, el *Internacional Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* propuso los criterios de Ámsterdam I para unificar la definición clínica del síndrome de Lynch (80). En 1999 estos criterios se revisaron (Criterios de Ámsterdam II) para incluir los tumores extracolónicos (81) (Tabla 4). Posteriormente, en 1996 un grupo de trabajo del *National Cancer Institute* propuso las guías de

Bethesda para caracterizar a los individuos con CCR y alteraciones en la reparación del ADN (82,83). Estas guías son menos restrictivas que los criterios de Ámsterdam. Posteriormente, en 2004 se publicó una nueva guía revisada de los criterios de Bethesda (84) (Tabla 5).

<u>CRITERIOS DE AMSTERDAM II</u>
Al menos 3 familiares con CCR o tumor asociado a SL (endometrio, ID, uréter, pelvis renal),
➤ Uno de ellos, familiar de primer grado de los otros 2.
➤ Afectación de 2 generaciones consecutivas
➤ Como mínimo un caso diagnosticado < 50 años
➤ Exclusión de PAF
➤ Confirmación histológica del diagnóstico

Tabla 4. Criterios de Ámsterdam II.

<u>CRITERIOS DE BETHESDA revisados</u>
Alguno de los siguientes:
➤ CCR diagnosticado < 50 años
➤ Presencia de CCR sincrónico o metacrónico, o de otros tumores relacionados con SL, independientemente de la edad.
➤ CCR con IMS-alta en paciente < 60 años.
➤ Paciente con CCR y un familiar de primer grado con un tumor relacionado con SL, uno de los cánceres diagnosticado antes de los 50 años.
➤ Paciente con CCR con dos o más familiares de primer o segundo grado con un tumor relacionado con SL, independientemente de la edad.

Tabla 5. Criterios de Bethesda revisados.

1.5.1.2. Cribado universal para el diagnóstico de síndrome de Lynch

Sin embargo, aunque la estrategia de detección de pacientes con SL guiada en base al cumplimiento de los criterios de Amsterdam y/o Bethesda, ha demostrado ser eficaz y coste-efectiva (79), diversos estudios han puesto de manifiesto la eficacia de implementar el cribado para identificar el SL mediante el análisis de expresión de las proteínas de los genes MMR o el estudio de inestabilidad de microsatélites en todos los casos de CCR. Esta estrategia diagnóstica permite identificar nuevos casos de SL que no cumplían los criterios de Amsterdam y/o Bethesda, y que por tanto hubiesen quedado sin poder identificar, si nos basamos en la identificación de estos pacientes mediante el empleo exclusivo de los criterios clínicos de Amsterdam o Bethesda (64,85).

En el año 2009 se evaluó el manejo en los pacientes con SL, recomendado dicho cribado para SL mediante el análisis de IMS o la realización de IHQ, en al menos todos los casos diagnosticados de CCR con edades inferiores a 70 años (86).

Esta estrategia de cribado universal se basa en la evidencia mostrada en diversos estudios que ponen de manifiesto que hasta un 28% de pacientes con SL podrían no ser identificados si el estudio mediante IMS o IHQ se llevase a cabo sólo, en base al cumplimiento de los criterios revisados de Bethesda (57,87–92).

Estudios adicionales sugieren que la estrategia de implementar el cribado universal para la identificación de SL, mediante el análisis con IHQ en todos los casos de CCR, presenta una mayor sensibilidad para la identificación de SL, comparado con otras estrategias diagnósticas, como el empleo de los criterios de Bethesda para seleccionar la población a estudio o estrategias selectivas (análisis mediante IMS o IHQ en pacientes con CCR con edad \leq 70 años o pacientes de mayor edad que cumplían los criterios de Bethesda) (57,93). En este sentido, diversos estudios han puesto de manifiesto la rentabilidad de la estrategia del cribado universal para identificar pacientes con SL al reducir la morbimortalidad de los familiares con SL (90,94,95), permitiendo beneficiarse de las medidas de vigilancia para la detección de neoplasias asociadas (96), quimioprevención (97) y

de medidas quirúrgicas que permiten reducir el riesgo de desarrollo de estas neoplasias (98).

1.5.1.3. Estudio genético. Unidades de consejo genético.

A continuación, se expone el algoritmo de práctica clínica habitual tras el diagnóstico de CCR, en la Comunidad Valenciana.

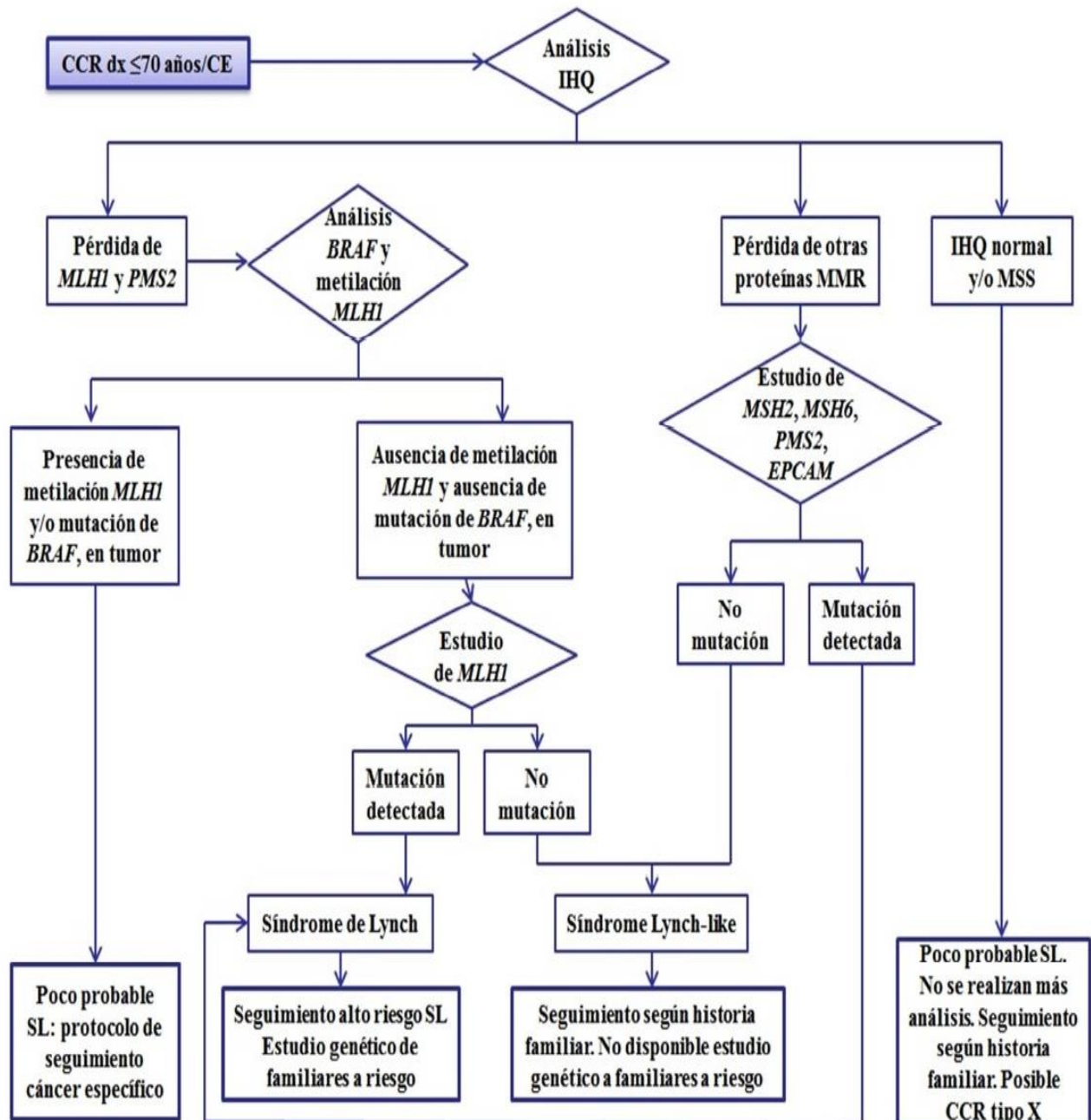


Figura 9. Estrategia de estudio genético de síndrome de Lynch en pacientes con cáncer colorrectal o de endometrio diagnosticado antes de los 70 años. Guía de práctica clínica en cáncer hereditario de la Comunidad Valenciana. Tercera edición servicio de promoción de la salud y prevención en el entorno sanitario. Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública Generalitat, 2017.

Una vez identificada la mutación patogénica en los genes MMR, al paciente se le informa de dicho resultado en las consultas de alto riesgo de CCR o en las unidades de consejo genético. Además, el estudio genético se amplía al resto de familiares de primer grado, mediante la extracción de una muestra de sangre, que nos permite llevar a cabo la búsqueda entre sus familiares de la mutación identificada en el caso índice (es decir el paciente con CCR al que se realizó estudio molecular y genético en el tumor). Por tanto, aquellos familiares en los cuales no se identifica dicha mutación, les informamos que no son portadores de la mutación y por tanto no presentan un riesgo incrementado de desarrollo de neoplasias asociadas a SL. En estos casos, las recomendaciones que deben realizar para cribado de CCR son las mismas que se emplean en la población general (test de sangre oculta en heces en aquellos con un rango de edad entre 50 a 69 años, con una periodicidad de cada dos años en caso de resultado negativo y en caso de identificar sangre en heces se llevaría a cabo la realización de colonoscopia).

Sin embargo, a los familiares que son portadores de dicha mutación, por tanto, hereditaria, se les deriva a consultas específicas de alto riesgo de tumores para realizar medidas de vigilancia y profilaxis para prevenir el desarrollo de CCR y neoplasia de endometrio, principalmente. Respecto el resto de las neoplasias asociadas a SL (ovario, tracto urinario alto, estómago, intestino delgado, tracto biliar/pancreático, piel y cerebro), dado que el riesgo es menor, no se indican medidas de vigilancia de manera rutinaria y se recomienda individualizar la vigilancia de estos tumores en base a la historia familiar.

Las recomendaciones de vigilancia actuales son:

- ✓ Colonoscopia a partir de los 20-25 años, o 2-5 años antes de la edad de diagnóstico de CCR en el familiar afecto más joven, escogiendo la opción que primero ocurra, con carácter bianual y con carácter anual a partir de los 40 años (92,99,100).

- ✓ Exploración ginecológica en las mujeres con carácter anual, a partir de los 30-35 años mediante ultrasonografía transvaginal y/o aspirado/biopsia endometrial (92,101–104).
- ✓ En relación al resto de neoplasias extracolónicas asociadas al síndrome de Lynch, como se comentaba anteriormente, la incidencia es menor y no está demostrada la eficacia de las estrategias de vigilancia en estos casos (105), salvo en aquellas familias en las que existe una mayor agregación de una determinada neoplasia extracolónica endometrial (101–104).

1.5.2. Síndrome de Lynch-like

La implementación de las actuales recomendaciones de la guía de Jerusalem que recomiendan la realización del estudio de inmunohistoquímica en todos los CCR o de endometrio en aquellos pacientes con edades inferiores a 70 años (86), e incluso el cribado universal para SL, ha dado lugar a un incremento en el número de pacientes diagnosticados con SL. No obstante, en un elevado número de pacientes, observamos la presencia de inestabilidad de microsatélites o pérdida de expresión de los genes MMR en la IHQ, pero sin poder identificar mutación patogénica en dichos genes u otras causas de inactivación de los genes reparadores del ADN con los métodos diagnósticos actuales empleados en nuestra práctica clínica (89). Estos pacientes se consideran que presentan CCR u otras neoplasias asociadas a SL de origen “probablemente no esporádico” o síndrome Lynch-like (SLL). Este grupo de pacientes representa aproximadamente un 30% de todos los pacientes que muestran tumores inestables (89).

Dentro de este grupo de pacientes, destaca la presencia de una proporción importante de pacientes con CCR que no presentan antecedentes familiares de neoplasias, y el único elemento para sospechar SL es la pérdida de expresión de alguna de las proteínas del sistema MMR y/o la presencia IMS. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que alteraciones somáticas en los genes del sistema MMR,

distintas a la hipermetilación del promotor de MLH1, pueden explicar la pérdida de funcionalidad de este sistema en aquellos CCR con tumores con IMS positivos con un origen patogénico desconocido. Sin embargo, los casos con ausencia de metilación somática o mutación en los genes del sistema MMR pueden tener otros mecanismos hereditarios causantes de la enfermedad, que no han sido todavía implementados en los protocolos diagnósticos que se realizan de forma rutinaria.

En este sentido, podemos distinguir cuatro posibles mecanismos patogénicos que podrían explicar la pérdida de expresión de las proteínas reparadoras de los genes reparadores del ADN (Fig. 10).

- Uno de los posibles mecanismos patogénicos podría ser la presencia de alteraciones germinales atípicas en genes del sistema reparador del ADN (regiones reguladoras, inversiones o translocaciones) o mutaciones crípticas (no detectadas con los métodos diagnósticos convencionales) que podrían provocar alteraciones somáticas en el alelo remanente del sistema MMR. Este grupo de pacientes, en realidad se trataría de pacientes con SL no identificado (Fig 10; mecanismo nº 2).
- Otra posible causa sería la presencia de alteraciones germinales en otros genes (ej. *MUTYH*, *POLD1*, *POLE*) que podrían alterar el sistema MMR (Fig 10; mecanismo nº 1).
- Por último, es posible observar la presencia de tumores esporádicos secundarios a la inactivación somática bialélica de los genes MMR u otros genes asociados al sistema MMR. La inactivación puede ser secundaria a la presencia de dobles mutaciones somáticas en esos genes, inactivación por pérdida de heterocigosidad o la combinación de ambas. Además, mosaicismo en los genes MMR puede ser una potencial causa para la inactivación (Fig 10; mecanismo nº 3,4).

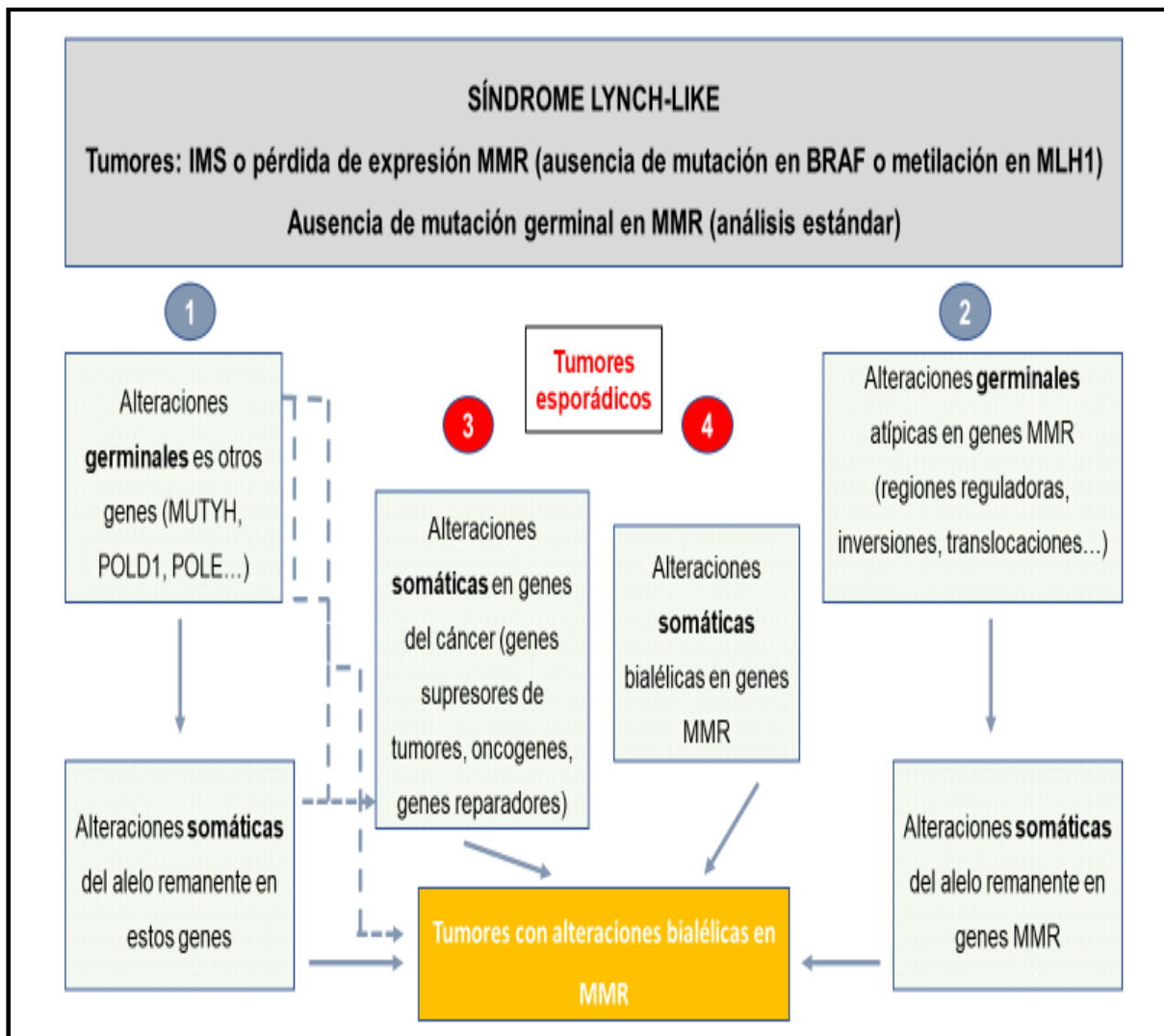


Figura 10. Mecanismos patogénicos responsables de la pérdida de expresión de proteínas de los genes reparadores del ADN.

1.5.3. Desafíos diagnósticos en el Síndrome de Lynch y Síndrome de Lynch-like. Situación actual.

Las pruebas genéticas actuales para el diagnóstico del SL implican una combinación de secuenciación directa del ADN y análisis de grandes

reordenamientos dentro las regiones codificantes de los genes del sistema MMR. En los últimos años algunos casos de SLL han sido explicados posteriormente por nuevas alteraciones germinales tales como deleciones del gen *EPCAM* (106) o epimutaciones constitucionales en el gen *MLH1* (107–109). Sin embargo, algunos reordenamientos genómicos tales como inversiones son difíciles de detectar e interceptar utilizando procedimientos de rutina (110). Hasta el momento, sólo una inversión que afecta a los exones 1-7 del gen *MSH2* ha sido asociada al SL (111), mientras que una publicación reciente ha descrito una inversión paracéntrica que implica los genes *MLH1* y *LRRFIP2* (112). Además existen evidencias de que el promotor de *MLH1* es bidireccional con un segundo gen, *EPM2AIP1* (113), y se ha demostrado que alteraciones genéticas en este promotor dan lugar a disminución transcripcional de *MLH1* y a un fenotipo IMS. Sin embargo, las regiones reguladoras no se incluyen en las pruebas genéticas para el diagnóstico del SL y, como consecuencia, la prevalencia de las mutaciones en estas regiones es todavía desconocida.

Como ya se ha referido con anterioridad, en alrededor del 30% de los pacientes que cumplen criterios clínicos para el diagnóstico de SL no se identifican mutaciones germinales en los genes del sistema MMR, lo que no excluye del diagnóstico. Estos datos indican que la estrategia actual de diagnóstico del SL deberá ser complementada por algoritmos que integren otros datos moleculares de los tumores que permitan el diagnóstico diferencial entre formas esporádicas y familiares en tumores con fenotipo con IMS.

Sin embargo, el uso de paneles multigenes u otros métodos diagnósticos no han sido implementados de manera rutinaria en la mayoría de los centros debido a discrepancias respecto al análisis apropiado sobre mutaciones somáticas y sin la presencia de una metodología uniforme recomendada. Por otra parte, la identificación de las mutaciones somáticas en los genes del sistema MMR utilizando ADN de muestras tumorales embebidas en parafina y fijadas en formol ha sido un reto hasta la fecha, debido al daño que se produce en el ADN durante la preparación

de la muestra. Los secuenciadores de nueva generación permiten el análisis de miles de amplicones de PCR y está diseñado para utilizar ADN de baja calidad. Esta posible estrategia diagnóstica, subraya además la necesidad de incorporar secuenciadores de nueva generación incrementando el elevado coste de esta posible estrategia diagnóstica.

En este complejo escenario, dado que no se conoce el mecanismo patogénico del SLL, existe incertidumbre con respecto al tratamiento preventivo de los pacientes y sus familiares, ya que no existe consenso sobre si debiera ser considerado como un origen probablemente hereditario o esporádico. En la actualidad, existen pocos estudios clínicos o moleculares que caractericen a este grupo de pacientes con SLL, y el riesgo asociado de desarrollo de neoplasias, por lo que se desconoce la estrategia de seguimiento que se ha de realizar en estos pacientes y sus familiares. En un estudio previo, realizado por Rodríguez-Soler et al (114), se observó que la incidencia de CCR en el grupo de pacientes con SLL fue significativamente menor que la encontrada en familias con SL confirmado pero mayor que en familias con CCR esporádicos. Estos resultados sugieren que los pacientes con SLL, representa a un grupo heterogéneo que incluye probablemente al menos dos poblaciones diferentes. Un primer grupo se encuentra representado por aquellos casos en los que las características clínicas sugieren fuertemente un origen hereditario, pero en los que el defecto genético aún no ha sido identificado. Un segundo grupo incluye una proporción significativa de las familias con SLL que no tienen antecedentes de cáncer y en las cuales, el único elemento para sospechar SL es la presencia de IMS y la pérdida de expresión de alguna de las proteínas del sistema MMR. En este último grupo probablemente un evento a nivel somático, que no sea la hipermetilación del gen *MLH1*, podría ser la causa subyacente de este fenotipo IMS. Se ha propuesto el estudio de mutaciones somáticas para diferenciar los casos esporádicos de los probablemente hereditarios (115).

El presente proyecto pretende abordar este problema, mediante la caracterización clínica y patológica de los pacientes con SLL, y evaluar el riesgo de

desarrollo de neoplasias asociadas a SL entre estos pacientes y sus familiares, debido a la evidente trascendencia en la práctica clínica.

1.6. Proyecto EPICOLON

Con el fin de poder ampliar los conocimientos respecto al SLL, el Grupo de Oncología Gastrointestinal de la Asociación Española de Gastroenterología (www.aegastro.es), desarrolló hace ya unos años el proyecto EPICOLON, que consiste en una base de datos poblacional, en la que se realiza el registro online de variables demográficas, clínicas y patológicas de pacientes con SL, SLL y otras formas hereditarias de CCR. En este proyecto participan actualmente más de 25 hospitales distribuidos por toda la geografía española (ver anexo). El proyecto EPICOLON I incluía pacientes de manera consecutiva con nuevo diagnóstico de CCR diagnosticados entre noviembre del año 2000 y octubre del año 2001, con el principal objetivo de estimar la incidencia de SL en España (116). Posteriormente se desarrolló el proyecto EPICOLON II (2006), dirigido a profundizar en las bases moleculares de las formas hereditarias y familiares del CCR. Desde el año 2013, se han realizado modificaciones que han dado lugar al proyecto EPICOLON III, que actualmente sigue vigente con una inclusión progresiva de pacientes. Los pacientes diagnosticados de SLL incluidos en los proyectos anteriores (EPICOLON I y II) han sido incluidos en esta última versión de EPICOLON III.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

2.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Como ya se ha descrito en la introducción el cribado universal en el CCR para la detección de pacientes con SL ha puesto de manifiesto un elevado número de pacientes con SLL, en los que no podemos determinar entre un origen del tumor esporádico o hereditario.

Por este motivo, es preciso profundizar en el conocimiento relativo a la patogenia del tumor en los pacientes con SLL, mediante la caracterización epidemiológica, clínica y patológica de este grupo de pacientes con la finalidad de identificar y caracterizar a aquellos pacientes en los que realmente existe un origen esporádico de aquellos en los que dichas características, sugieran un origen hereditario, que condicione un riesgo incrementado de desarrollo de neoplasias asociadas.

Además, el análisis del riesgo de desarrollo de neoplasias asociadas a SL en los pacientes con SLL y sus familiares, podría permitir establecer medidas de vigilancia específicas.

2.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La caracterización epidemiológica, clínica y patológica de pacientes con SLL, permitirá discriminar entre un posible origen esporádico o hereditario del tumor y evaluar el riesgo de desarrollo de neoplasias asociadas a SL entre estos pacientes y sus familiares.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivos principales:

- ➔ Identificar las características epidemiológicas, clínicas o histopatológicas que permitan diferenciar un posible origen hereditario o esporádico en los pacientes con SLL.

- ➔ Evaluar el riesgo familiar de desarrollo de CCR u otras neoplasias asociadas a SL entre los familiares de primer grado (FPG) de pacientes con SLL en comparación con el riesgo presente entre los FPG de pacientes con SL.

Objetivos específicos:

- Evaluar las posibles diferencias clínico-epidemiológicas o histopatológicas de los pacientes con SLL y SL.

- Analizar la posible diferencia en la prevalencia de CCR sincrónico o metacrónico y de otras neoplasias asociadas al SL en los pacientes con SLL.

- Analizar la prevalencia de neoplasias asociadas a SL entre los familiares de pacientes con SLL.

- Comparar la incidencia de neoplasias asociadas a SL entre pacientes con SL y SLL y sus familiares.

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

4.1. Diseño del estudio

Para el estudio de las características clínicas y patológicas de pacientes de la cohorte de SLL y SL se realizó un estudio retrospectivo, observacional, multicéntrico, de tipo transversal mediante muestreo consecutivo.

Para realizar el análisis del riesgo familiar de CCR y otras neoplasias asociadas a SL, se realizó en primer lugar, un estudio retrospectivo de la información relativa a neoplasias asociadas a SL, entre los familiares de primer grado de pacientes con SL y SLL, en el momento del diagnóstico del SLL y SL. Posteriormente, se realizó un estudio prospectivo, para el análisis de supervivencia de neoplasias asociadas a SL, de los casos nuevos de CCR y neoplasias asociadas a SL que han aparecido desde el momento del diagnóstico del CCR en los pacientes con SL y SLL, hasta final del seguimiento (31-07-2019).

A continuación, se muestra un diagrama con las diferentes fases del estudio (Fig. 11)

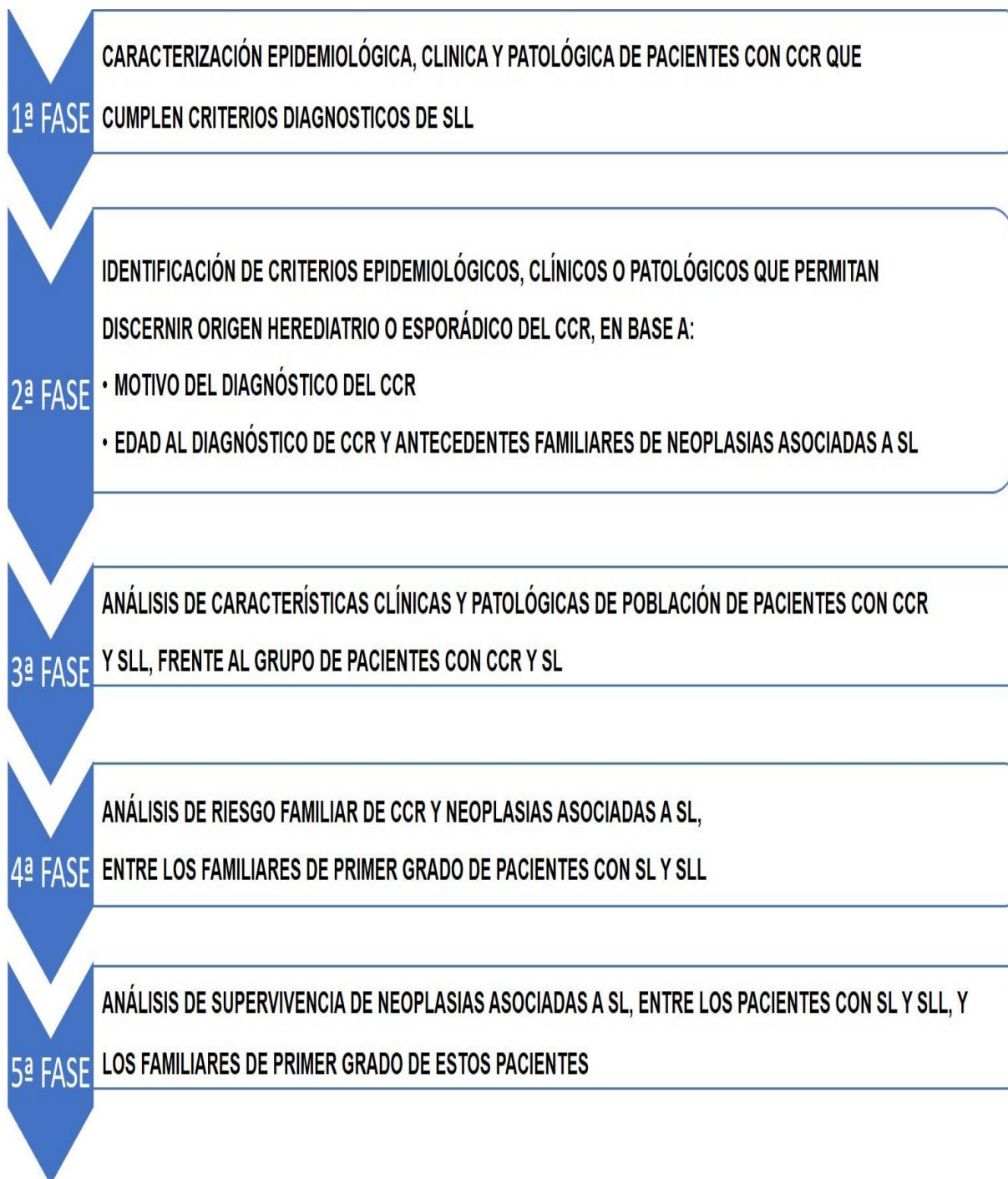


Figura 11. Diagrama de flujo en el que se exponen las diferentes fases del estudio.

4.2. Pacientes y ámbito del estudio

Ámbito del estudio

En este estudio se han incluido a aquellos pacientes procedentes de 25 centros sanitarios en España que fueron incorporados a la base poblacional online EPICOLON III. Los pacientes fueron estudiados de forma retrospectiva desde el diagnóstico del SLL o SL. La inclusión de pacientes comenzó en el año 2015 y finalizó a finales del año 2017. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de los hospitales participantes y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes para su inclusión.

Pacientes

Los criterios de inclusión fueron:

- ✓ Antecedente de neoplasia colorrectal con presencia de inestabilidad de microsatélites (IMS) y/o pérdida de expresión de las proteínas de los genes reparadores del ADN (MSH2, MSH6, PMS2, o pérdida de *MLH1* con BRAF wild type y/o ausencia de metilación en *MLH1*), o en *EPCAM*, en los cuales se realizó estudio genético, pudiendo diferenciar así dos cohortes diferentes en este estudio:
 - a) Pacientes con síndrome de Lynch: pacientes en los que el estudio genético, sí identificó la presencia de mutación patogénica en los genes reparadores del ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), o en *EPCAM*.
 - b) Pacientes con síndrome de Lynch-like: en este grupo de pacientes el estudio genético no identificó la presencia de mutación patogénica en estos genes.

Los criterios de exclusión del estudio fueron:

- ✓ Diagnóstico de otros síndromes hereditarios.
- ✓ Diagnóstico de poliposis colónica.
- ✓ Ausencia de estudio genético.

- ✓ Pacientes con neoplasias de endometrio con IMS y/o pérdida de expresión de las proteínas de los genes MMR, pero sin antecedente de CCR que mostrase IMS y/o pérdida de expresión de las proteínas de los genes MMR.
- ✓ En los casos de pérdida de expresión de MLH1, fueron excluidos aquellos que mostraban presencia de hipermetilación de MLH1 y/o mutación en *BRAF*.
- ✓ Para el análisis del riesgo familiar de desarrollo de neoplasias asociadas a SL, se excluyeron aquellos pacientes con SL y SLL de los cuales no disponíamos en los genogramas de la información completa acerca del número de los FPG y edades al diagnóstico de la neoplasia, o en el que caso de ausencia de neoplasia, edad hasta su fallecimiento o edad actual al final del seguimiento (31-07-2019).
- ✓ Por último, para el análisis prospectivo de supervivencia con relación a los nuevos casos de CCR y neoplasias asociadas a SL, sólo se incluyó la información relativa a aquellas familias de las que sí mantenían un seguimiento activo desde las consultas de alto riesgo de CCR.

4.3. Base de datos

El registro de las variables demográficas, del estudio de CCR (estudio molecular, genético, características histológicas, estadiaje TNM, tratamiento de la neoplasia) u otras neoplasias asociadas a SL, al igual que la historia familiar (antecedentes familiares de CCR u otras neoplasias asociadas a SL), se llevó a cabo a través de la base de datos online EPICOLON III (www.epicolon.es). En este proyecto han participado 25 centros nacionales en la inclusión de pacientes.

- Para el análisis de las características clínicas y patológicas de los pacientes con CCR diagnosticados de SL y SLL, se obtuvo la información a partir del registro de dichas variables en EPICOLON III.
- La información relativa a la historia familiar (número de familiares, desarrollo de neoplasias, edad al diagnóstico de las mismas; entre los

que no desarrollan neoplasias: edad al final del seguimiento o al fallecimiento por otras causas), se obtuvo a través de la información disponible mediante los genogramas adjuntos en la base de datos EPICOLON III.

4.4. Análisis de riesgo familiar de cáncer

Para el análisis del riesgo familiar de desarrollo CCR u otros tumores asociados con SL, se incluyó la información relativa a FPG de pacientes con CCR y SL o SLL, de los casos de los que disponíamos de genogramas con la información completa sobre las edades de todos los miembros de la familia, incluidos los familiares sin cáncer o no portadores de la mutación identificada, en los casos de SL. Consideramos tumores asociados a SL a los localizados en: endometrio, ovarios, tracto urinario, gástricos, intestino delgado, páncreas, tracto biliar, cutáneos (como adenomas sebáceos, carcinomas y queratoacantomas) y cerebro (gliomas cerebrales). Por otra parte, los genogramas debían incluir al menos una generación hacia atrás y hacia adelante, respecto el caso índice. Se calculó la tasa de incidencia estandarizada (TIE) como la razón del número observado de casos diagnosticados en las familias en el momento de la inclusión en la cohorte EPICOLON III. El caso índice fue excluido para el análisis de los antecedentes familiares en el momento del diagnóstico.

Posteriormente, se analizó el riesgo familiar de desarrollo CCR u otras neoplasias asociadas con LS, mediante la detección de nuevos casos de estos tumores que aparecieron desde el momento del diagnóstico del caso índice hasta 31-07-2019. Para este análisis, se incluyeron los nuevos casos de estas neoplasias que aparecieron durante el seguimiento entre los casos índices de SL y SLL y sus FPG. La información de los genogramas se actualizó preguntando a los pacientes o sus familiares, acerca de casos nuevos de neoplasias tras el diagnóstico del caso índice.

4.5. Variables analizadas

A continuación, se detallan las variables a estudio, recogidas mediante cuestionarios preestablecido en EPICOLON:

VARIABLES INDEPENDIENTES

- **DEMOGRÁFICAS:**

- Sexo
- Edad

- **GENÉTICAS**

- Análisis de inestabilidad de microsatélites:
 - IMS alta: si muestra inestabilidad en el 40% de los loci examinados (en 2 o más marcadores)
 - IMS baja o estables si aparece sólo en un marcador o en ninguno.
- Análisis de la expresión de proteínas de los genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) mediante IHQ en el tejido tumoral. El resultado inmunohistoquímico se expresa expresó como presencia o ausencia de expresión de cada una de las proteínas o como no valorable si no se obtienen controles internos adecuados.
- Estudio de mutación BRAF y de metilación de *MLH1* sobre tejido tumoral, en aquellos casos que mostraban pérdida de expresión en la IHQ de las proteínas del gen *MLH1*.
- Gen analizado, en base a los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica, y resultado de dicho análisis.

VARIABLES DEPENDIENTES

• CLÍNICAS:

- Motivo por el que se realizó la colonoscopia dicho estudio: cumplimiento de criterios clínicos de Amsterdam I y II o Bethesda o debido a la implementación del cribado universal para SL.
- Antecedentes de neoplasias colónicas:
 - Edad al diagnóstico
 - Localización colónica
 - Colon derecho (incluye aquellos tumores localizados en ciego, colon ascendente, ángulo hepático y colon transversal)
 - Colon izquierdo (incluye ángulo esplénico, descendente y sigma)
 - Recto
 - Estadía TNM (8ª edición)
 - Tratamiento neoplasia
- Hallazgos en colonoscopias de seguimiento
- Antecedentes de neoplasias extracolónicas:
 - Edad al diagnóstico
 - Localización
 - Tratamiento neoplasia
- Tiempo de seguimiento prospectivo de nuevos casos de CCR y otras neoplasias asociadas SL entre los pacientes con SLL y SL y sus FPG, desde el diagnóstico de CCR hasta el final de dicho seguimiento (31-07-2019)

• PATOLÓGICAS:

- Grado de diferenciación CCR: bien, moderado o mal diferenciado.
- Presencia de tumor mucinoso

- Infiltración vascular
- Infiltración linfocítica.

- **ANTECEDENTES FAMILIARES**

- Árbol genealógico
- Familiares con neoplasia: Parentesco, sexo, estado, tipo neoplasia, localización.
- Análisis del riesgo familiar de neoplasias asociadas a SL:
 - Edades al diagnóstico de la neoplasia, o en el que caso de ausencia de neoplasia, edad hasta su fallecimiento o edad actual al final del seguimiento (31-07-2019)
- Análisis de supervivencia con relación a los nuevos casos de CCR y neoplasias asociadas a SL:
 - Edades al diagnóstico de las neoplasias asociadas a SL
 - Tipo de neoplasia:
 - CCR
 - Otras neoplasias asociadas a SL

4.6. Estudio inmunohistoquímico y molecular

Análisis de inestabilidad de microsatélites

Los tumores incluidos en parafina se analizaron para determinar la inestabilidad de microsatélites, usando PCR y electroforesis capilar en el panel compuesto por los siguientes marcadores repetitivos monomórficos: BAT26, BAT25, NR21, NR24 y NR27 (117,118). Se considera que un tumor presenta alta IMS (IMS-H) si muestra inestabilidad en 2 o más marcadores.

Los cebadores empleados para la amplificación de secuencias de microsatélites en este panel fueron los empleados previamente (117). Todos los cebadores directos (Applied Biosystems, Foster City, CA) tenían una etiqueta

fluorescente (6FAM, HEX, NED) en el extremo 5' para permitir la detección de microsatélites por el Analizador Genético Avant ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Las 5 repeticiones se coamplificaron en una PCR múltiple que contenía 1 mol/L de cada cebador, 200 mol/L dNTP, 1.5 mmol MgCl₂, and 0.75 U Taq DNA polimerasa. La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, recocido a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos. Esto fue seguido por un paso de extensión en 72 °C durante 7 minutos. Los cebadores fueron diseñados para permitir la resolución de diferentes tamaños de productos de PCR en geles desnaturalizantes al 5% en un ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) secuenciador de ADN automatizado. El software Genescan (Genotyper 2.1; Applied Biosystems) se utilizó para calcular el tamaño de cada producto de PCR fluorescente. Los microsatélites se consideraron inestables si los fragmentos de PCR mostraban deleciones de al menos 3 pb en un locus dado.

Análisis de expresión de MLH1/MSH2/MSH6/PMS2

El estudio de la expresión de proteínas de los genes MMR mediante IHQ se realizó en todos los pacientes, aunque en 6 pacientes no se disponía de este dicho análisis. No obstante, se incluyeron por presentar inestabilidad alta de microsatélites.

El estudio IHQ de MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 se realizó en tejido tumoral fijado en formaldehído e incluido en parafina, como se describió previamente (46). Un caso se considera con pérdida de expresión cuando no se observa inmunotinción en ninguna célula neoplásica, en presencia de inequívoco control interno positivo (linfocitos, células del estroma).

Se utilizaron anticuerpos monoclonales primarios contra MLH1 (clon ES05, Novocastra, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido, 1:30), MSH2 (clon FE11, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, 1:50), MSH6 (clon EPR3945, Epitomics Inc, Burlingame, California, EE. UU., 1: 200), y

PMS2 (clon EPR3947, Epitomics Inc, Burlingame, California, EE. UU., 1: 200) en secciones de 4 µm de tejido fijado en formol y parafinado. Se utilizó como sistema de detección Dako REAL™ EnVision™ (Dako, Shanghai, China) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción se visualiza con Dako REAL™ DAB + Chromogen, y los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina. La mucosa colónica no neoplásica, las células del estroma, los linfocitos infiltrantes o los centros germinales de los folículos linfoides se utilizaron como controles positivos internos. Y los carcinomas colorrectales con alteración de la vía reparadora conocidos sirvieron como controles negativos externos. La expresión normal se definió como la tinción nuclear conservada de las células tumorales, mientras que la pérdida de expresión de las proteínas se definió como la ausencia total de tinción nuclear de las células tumorales con tinción inequívoca de los controles internos positivos.

Análisis de mutación somática en BRAF y/o análisis de metilación

En pacientes con pérdida de *MLH1*, se analizó la metilación de *MLH1* y / o el estado de mutación somática *BRAF*. El análisis de metilación *MLH1* se realizó utilizando la amplificación de sonda dependiente de la ligadura multiplex específica de metilación (MS-MLPA) de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando el kit SALSA MS-MLPA Kit ME011 Mismatch Repair Genes (MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos) (61).

El análisis de la mutación V600E *BRAF* se realizó utilizando sondas TaqMan específicas mediante PCR en tiempo real (ABI Prism 7500; Applied Biosystems, Foster City, CA) y software de discriminación alélica como se describió anteriormente (119).

Estudio genético: detección de mutaciones en línea germinal

El análisis de mutación en línea germinal se realizó de acuerdo con los resultados de la expresión de las proteínas de los genes MMR mediante la IHQ como se describió anteriormente (89).

En consecuencia, el análisis de mutación en *MLH1* y *MSH2* se realizó en todos los tumores con inmunotinción negativa en estos genes. El análisis genético en *MSH6* se realizó en pacientes con pérdida aislada de expresión de *MSH6* o en aquellos con pérdida combinada de expresión de *MSH2* y *MSH6*, sin evidencia de mutación en *MSH2*. Las pruebas genéticas para *PMS2* se realizaron en aquellos pacientes que mostraban pérdida aislada de *PMS2*. En aquellos pacientes con pérdida de expresión en *MSH2* sin evidencia de mutación detectada en dicho gen, se analizó posteriormente el gen *EpCAM* con el fin de detectar reordenamientos usando MLPA de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. En aquellos pacientes con IMS en los cuales no se pudo realizar el análisis de IHQ, se llevó a cabo el análisis genético de los cuatro genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*) (89).

La detección de mutaciones puntuales se realizó utilizando PCR y secuenciación directa de toda la secuencia de codificación y límites intrón-exón de cada gen. Los grandes reordenamientos (eliminaciones e inserciones) se analizaron utilizando la técnica MLPA (MLPA Kits P003:MLH1-MSH2; P248 (confirmación MLH1-MSH2), P008 (*PMS2*) y P072 (*MSH6*-*EpCAM*) MRC-HOLLAND; Amsterdam, Países Bajos) siguiendo el protocolo del fabricante. Los resultados del análisis genético se interpretaron en base a las Recomendaciones ACMG para los Estándares para la Interpretación de las Variaciones de Secuencia (2015) y la base de datos InSIGHT (120,121).

4.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa SPSS (SPSS 19.0, Chicago, IL, EE.UU.). En cuanto al análisis descriptivo, las variables

cualitativas se presentan como porcentajes. Las variables cuantitativas continuas se describen como la media y la desviación estándar o la mediana y el rango intercuartílico, dependiendo de si seguían o no una distribución normal. Para analizar la asociación entre variables cualitativas se empleó la prueba de chi-cuadrado, seguida por la prueba exacta de Fisher en su caso, y las pruebas de la t de Student o de la U de Mann-Whitney para las variables cuantitativas, según tuvieron o no una distribución normal. Para el contraste de las hipótesis descritas anteriormente se utilizó un nivel de confianza (p) <0.05 .

En segundo lugar, con el fin de analizar el riesgo familiar de desarrollo de CCR u otras neoplasias asociadas a SL, se calculó la tasa de incidencia estandarizada (TIE) para CCR y otras neoplasias asociadas a SL, entre los familiares de primer grado de pacientes diagnosticados de SLL y se comparó con la TIE de los familiares de pacientes con SL de la cohorte EPICOLON III.

Para ello, las tasas de incidencia de CCR u otras neoplasias asociadas a SL fueron estandarizadas por sexo y edad mediante el método indirecto. Los tiempos de seguimiento (persona-año) para cada familiar en riesgo se calcularon desde los 20 años de edad hasta el momento del diagnóstico de cáncer más precoz, la edad al fallecimiento o el fin del seguimiento. Para ello, se emplearon las tasas estándar obtenidas de los registros regionales españoles (122). Se calculó la tasa de incidencia estandarizada (TIE) para CCR y otras neoplasias asociadas a SL a partir del cociente entre los casos observados y los esperados entre los familiares. El número de casos esperados se calculó a partir de la suma de los tiempos de seguimiento (persona-año) para grupos de edad con intervalo de 5 años y por sexo y la correspondiente tasa de incidencia estándar.

Por último, se llevó a cabo un análisis prospectivo, de aquellos nuevos casos de CCR u otras neoplasias asociadas a SL en los casos índices de SL y SLL y entre sus familiares, que aparecieron desde el momento del diagnóstico del caso índice hasta el final del seguimiento (31-07-2019). Se incluyeron sólo aquellas familias de las que sí disponíamos de información relativa a dicho seguimiento posterior. A partir

de esta información se llevó a cabo un análisis de supervivencia mediante Kaplan-Meier y el test de log Rank.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y PATOLÓGICA DEL SÍNDROME DE LYNCH-LIKE

5.1.1. Características de los pacientes con SLL

Se incluyeron 160 pacientes con diagnóstico de CCR que cumplían los criterios diagnósticos de SLL. La vía diagnóstica del SLL se muestra en la figura 12.

Las características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas de esta cohorte se muestran en la tabla 6. La edad media al momento del diagnóstico de CCR fue de 54,9 años (DE 14,2) y 53 pacientes (33%) eran menores de 50 años en el momento del diagnóstico. El 41,3% de los pacientes eran mujeres. En la mayoría de los casos, la colonoscopia diagnóstica del CCR se llevó a cabo por la presencia de síntomas (87,4%).

El hallazgo más frecuente en la IHQ fue la ausencia de expresión de MLH1 / PMS2 en el 48,1% de los casos, seguido de la falta de expresión de MSH2 / MSH6 (26,9%). La pérdida aislada de MSH6 (12,5%) o PMS2 (8,8%) fue menos frecuente. No se realizó el estudio mediante IHQ en 6 pacientes, aunque se incluyeron debido a la presencia de inestabilidad alta de microstélites.

Con respecto a los antecedentes familiares, el 64,4% de los casos cumplieron con las pautas revisadas de Bethesda y el 11,2% cumplió con los criterios de Amsterdam para el diagnóstico de SL. En un 24,4% el diagnóstico se realizó debido a la realización del cribado universal.

En relación con las características del CCR, la mayoría se localizaba en colon derecho (61,4%), la mediana del tamaño del tumor fue de 5 cm. Respecto la histología, observamos la presencia de pobre grado de diferenciación en un 20,6% de los pacientes, infiltración linfocítica en el 23,1%, infiltración vascular en el 11,3% y presencia de componente mucinoso en el tumor en un 28,7%.

Acerca de los antecedentes personales, cinco pacientes (3,1%) desarrollaron un segundo CCR en una media de tiempo de seguimiento de 7 años (DE 3,9 años)

y 27 pacientes (16,8%) tenían antecedentes de otros tumores (no-CCR), de los cuales, en cinco pacientes (3,1%) eran neoplasias asociadas al SL.

Respecto a los antecedentes familiares, cabe mencionar que el 50% de los pacientes presentaban antecedentes familiares de CCR, y el 38,7% presentaba antecedentes familiares de otro cáncer relacionado con el SL.

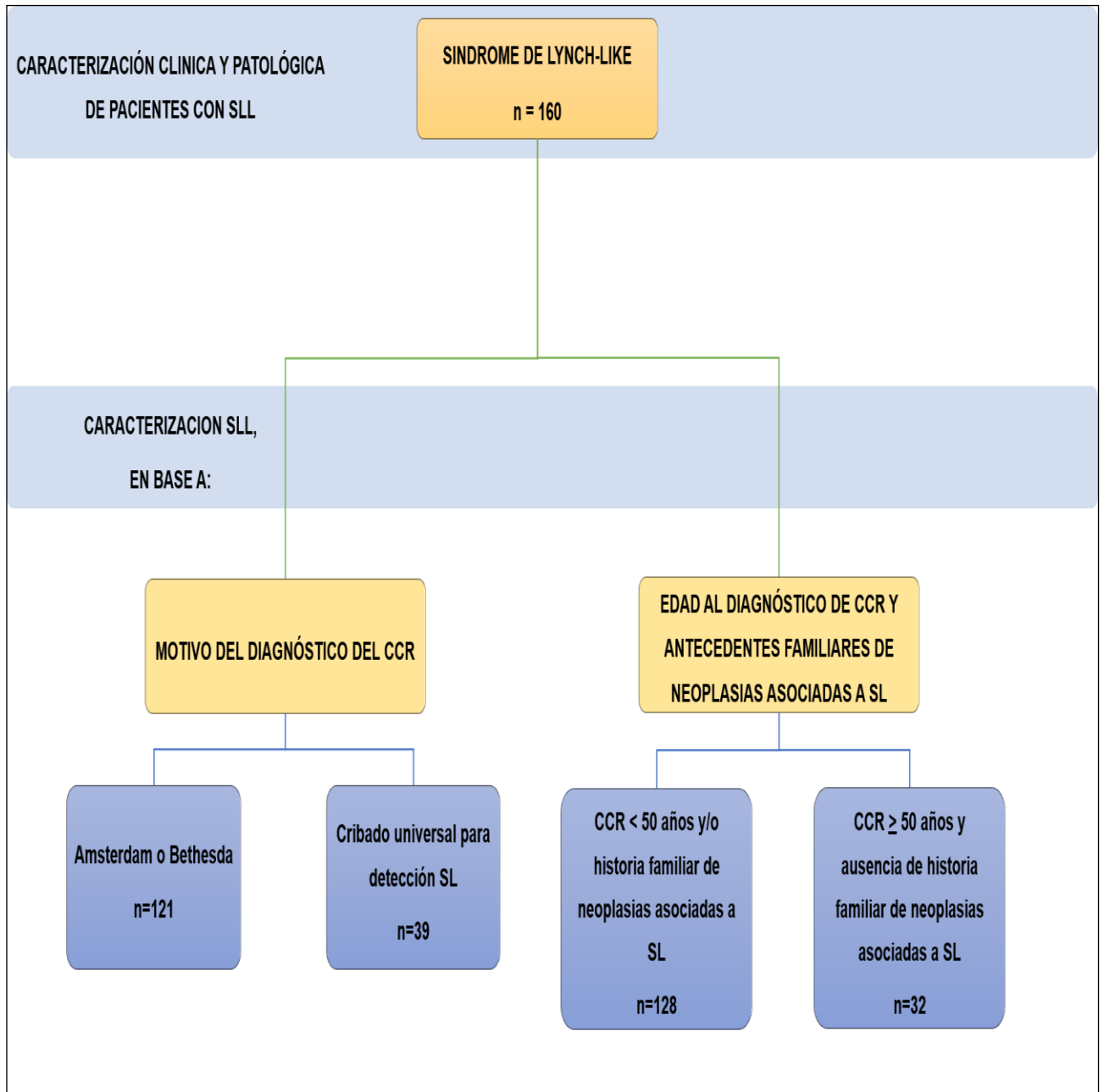


Figura 12. Diagrama de flujo de pacientes incluidos en estudio 1.

Tabla 6. Características epidemiológicas de pacientes con SLL.

SLL	n=160
Sexo: mujeres, n (%)	66 (41,3)
Edad media (desviación estándar)	63,5 (14,4)
Edad media al diagnóstico de CCR (desviación estándar)	54,9 (14,2)
Indicación de la colonoscopia, n (%)	
Síntomas	118 (87,4)
Cribado CCR	17 (12,6)
Inmunohistoquímica, n (%)	
Pérdida de expresión de:	
MLH1 and PMS2	77 (48,1)
MSH2 and MSH6	43 (26,9)
MSH6	20 (12,5)
PMS2	14 (8,8)
IHQ no disponible; IMS-H	6 (3,7)
Historia familiar, n (%)	
Criterios de Amsterdam I y II	18 (11,2)
Criterios de Bethesda	103 (64,4)
Cribado universal	39 (24,4)
Localización, n (%)	
Colon derecho	89 (61,4)
Colon izquierdo y recto	56 (38,6)
Mediana tamaño CCR (rango), cm	5 (0,6-30)
TNM, n (%)	
Estadio I-II	96 (60)
Histología, n (%)	
Mal diferenciado	33 (20,6)

Infiltración linfocítica	37 (23,1)
Infiltración vascular	18 (11,3)
Tumor mucinoso	46 (28,7)
CCR metacrónico, n (%)	5 (3,1)
Antecedentes personales de otras neoplasias (diferentes a CCR), n (%)	27 (16,8)
Antecedentes personales de neoplasias no CCR de la esfera de SL, n (%)	5 (3,1)
Antecedentes familiares de cáncer colorrectal, n (%)	80 (50)
Antecedentes familiares de neoplasias no CCR de la esfera de SL, n (%)	62 (38,7)

5.1.2. Caracterización de los pacientes con SLL

Con la finalidad de identificar características clínicas o moleculares que pudieran resultar de interés a la hora de poder establecer un posible origen genético frente esporádico, se llevaron a cabo dos análisis. El primero en base al motivo del diagnóstico de SLL, y el segundo, en base a la edad al diagnóstico de CCR y/o antecedentes familiares de CCR.

- **Caracterización de los pacientes con SLL en base al motivo del diagnóstico de SLL:**
 - Pacientes con SLL que cumplían criterios de Amsterdam o Bethesda frente aquellos en los que el diagnóstico de SLL se llevó a cabo debido a la realización del cribado universal para el diagnóstico de SL.

Las diferencias significativas que observamos entre ambos grupos se relacionaron con la edad media al diagnóstico de CCR y con los antecedentes familiares de CCR.

La edad media al diagnóstico de CCR fue mayor, de 65,5 años (DE 10,1) en pacientes diagnosticados por cribado universal frente a una edad media al diagnóstico de CCR de 51,6 años (DE 13,7) en pacientes que cumplían los criterios de Amsterdam o Bethesda ($p = 0,02$). Por otra parte, el 57% de los pacientes que cumplían los criterios de Amsterdam o Bethesda tenían antecedentes familiares de CCR, en comparación con el 28% de los pacientes identificados a través del cribado universal mediante IHQ para el diagnóstico de SL ($p < 0,001$).

No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos, en relación con el sexo, motivo de la indicación para la realización de la colonoscopia, los hallazgos de IHQ, las características del tumor (localización, tamaño, estadio TNM, histopatología), los antecedentes personales de CCR u otro cáncer asociado a SL (tabla 7).

Tabla 7. Características de los pacientes basadas en el motivo del diagnóstico de SLL.

	Criterios de Amsterdam o Bethesda n=121	Cribado universal para SL n=39
Edad media al diagnóstico de CCR (DE), años	51,6 (13,7)	65,5* (10,1)
Sexo: mujeres, n (%)	47 (38,8)	19 (48,7)
Indicación para la colonoscopia, n (%)		
Síntomas	89 (87,3)	29 (87,9)
Cribado CCR	13 (12,7)	4 (12,1)
Inmuhistoquímica, n (%).		

Pérdida de expresión de:		
MLH1 y PMS2	57 (47,1)	20 (51,3)
MSH2 y MSH6	30 (24,8)	13 (33,3)
MSH6	16 (13,2)	4 (10,2)
PMS2	13 (10,8)	1 (2,6)
IHQ no disponible; IMS-H	5 (4,1)	1 (2,6)
Localización de CCR, n (%)		
Colon derecho	66 (60,6)	23 (63,9)
Colon izquierdo y recto	43 (39,4)	13 (36,1)
Tamaño CCR. Mediana (rango), cm	5,88 (4,9-6,8)	4,5 (3,7-5,2)
CCR: TNM, n (%)		
Estadio I y II	62 (51,2)	19 (48,7)
Histología, n (%)		
Pobre diferenciación	25 (20,7)	8 (20,5)
Infiltración linfocítica	30 (24,8)	7 (17,9)
Tumor mucinoso	36 (29,8)	10 (25,6)
Infiltración vascular	17 (14)	1 (2,6)
Antecedentes personales, n (%)		
CCR u otras neoplasias asociadas a SL	11 (9,1)	1 (2,6)
CCR sincrónico y / o metacrónico	6 (5)	1 (2,6)
Otras neoplasias (no-CCR) asociadas a SL	5 (4,1)	0 (0)
Antecedentes familiares de CCR, n (%)	69 (57)	11 (28,2)*

*p < 0,05

- **Caracterización de los pacientes con SLL en base a la edad del diagnóstico del CCR y la historia familiar de neoplasias asociadas a SL:**

- Pacientes con SLL diagnosticados de CCR antes de los 50 años y/o antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL versus pacientes con SLL diagnosticados con una edad de 50 años o superior y sin la presencia de antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL.

Este segundo análisis tampoco reveló diferencias significativas entre los dos grupos con respecto al sexo, motivo de indicación de colonoscopia, IHQ, características del tumor (ubicación, tamaño, estadio TNM, histología) o antecedentes personales de CCR u otras neoplasias distintas a CCR, asociadas a SL (Tabla 8).

Tabla 8. Características de los pacientes según la edad en el diagnóstico de CCR y los antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL.

	CCR diagnosticado antes de los 50 años y/o antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL n=128	CCR diagnosticado \geq 50 años y ausencia de antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL n=32
Edad media al diagnóstico de CCR (DE), años	52,05 (14)	65,71* (9)

Sexo: mujeres, n (%)	52 (40,6)	14 (43,7)
Indicación para la colonoscopia, n (%)		
Síntomas	100 (92,6)	18 (66,7)
Cribado CCR	8 (7,4)	9 (33,3)
Inmunoquímica, n (%).		
Pérdida de expresión de:		
MLH1 y PMS2	58 (45,3)	19 (59,3)
MSH2 y MSH6	34 (26,5)	9 (28,1)
MSH6	18 (14,1)	2 (6,3)
PMS2	12 (9,4)	2 (6,3)
IHQ no disponible; IMS-H	6 (4,7)	0 (0)
Localización de CCR, n (%)		
Colon derecho	71 (61,7)	18 (60)
Colon izquierdo y recto	44 (38,3)	12 (40)
Tamaño CCR.		
Mediana (rango), cm	5,97 (5-6,9)	3,98 (3,1-4,8)
CCR: TNM, n (%)		
Estadio I y II	63 (49,2)	18 (56,2)
Histología, n (%)		
Pobre diferenciación	27 (21,1)	6 (18,7)
Infiltración linfocítica	27 (21,1)	10 (31,3)
Tumor mucinoso	33 (25,8)	13 (40,6)
Infiltración vascular	15 (11,7)	3 (9,4)

*p < 0,05

5.2. RIESGO FAMILIAR DE CCR Y OTRAS NEOPLASIAS ASOCIADAS AL SÍNDROME DE LYNCH

5.2.1. Características clínicas y patológicas entre pacientes con SL y SLL

Para este análisis se incluyeron los 160 pacientes diagnosticados de CCR que cumplían criterios diagnósticos de SLL y 286 pacientes con SL diagnosticados de CCR. Las diferencias demográficas, clínicas e histopatológicas entre ambas poblaciones se muestran en la tabla 9.

En este análisis, se observó una edad al diagnóstico de CCR más temprana en el grupo de pacientes con SL (SL 48,1 (DE 12,9) versus SLL 54,9 (DE 14,2); $p = 0,01$). También se observó un mayor porcentaje de pacientes que cumplían criterios de Amsterdam y/o Bethesda (Amsterdam I y II presentes en el 72,1% en el grupo de SL frente un 11,2% en el grupo de SLL, ($p < 0,001$); criterios revisados de Bethesda presentes en el 84,2% en el grupo de SL, frente a un 64,4% en el grupo de SLL, $p < 0,001$).

Respecto al estudio de la expresión de proteínas de los genes MMR mediante IHQ, la pérdida de expresión de MLH1 y PMS2 fue más frecuente entre los pacientes con SLL (34,3% entre los pacientes con SL versus 48,1% entre los pacientes con SLL). Por otra parte, entre los pacientes con SL, el hallazgo más frecuente en la IHQ fue la pérdida de expresión de MSH2 y MSH6 (42,6% en SL versus 26,9% en SLL), siendo estas diferencias significativas en ambos casos. En relación con la pérdida de expresión de MSH6 y PMS2, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Por lo que concierne a la relación de mutaciones patogénicas identificadas dentro del grupo de pacientes con SL, observamos que un 35,3% tenían mutaciones en el gen *MLH1*, un 41,3% en *MSH2*, siendo menos frecuentes las mutaciones en el resto de los genes: 14,7% en *MSH6*, 5,2% en *PMS2* y 3,5% en *EPCAM*.

No encontramos diferencias significativas respecto a la localización de CCR, siendo más frecuente en ambos casos en el colon derecho, o el estadio TNM al

diagnóstico, observando que más de la mitad fueron diagnosticados en estadios más precoces.

Sin embargo, cuando analizamos las características histopatológicas del CCR, sí encontramos diferencias significativas en relación a un mayor porcentaje de infiltración linfocítica en el CCR de pacientes con SLL comparado con CCR de pacientes con SL (23,1% en SLL, frente a un 14,3% en SL, $p = 0,04$). No se observaron diferencias significativas respecto a la invasión vascular, grado de diferenciación o la presencia de tumor mucinoso (Tabla 9).

Por otra parte, también se observaron diferencias significativas en relación con un mayor porcentaje de antecedentes personales de CCR u otras neoplasias asociadas a SL. La presencia de CCR sincrónico se observó en un 9,1% de pacientes en el grupo de SL, frente a 1,3% en el grupo de SLL, ($p = 0,001$). Un 12,9% de pacientes en el grupo de SL desarrollaron CCR metacrónico, frente a un 3,1% de pacientes que lo desarrollaron en el grupo de SLL, ($p = 0,001$). Por último, un 29,4% de pacientes con SL tenían antecedentes de otros tumores asociados a la esfera de SL, frente a un 3,1% en el grupo de SLL, ($p < 0,001$) (Tabla 9).

Tabla 9. Características clínicas y patológicas de pacientes con SL y SLL

	SINDROME LYNCH N= 286	SINDROME LYNCH-LIKE N= 160
Sexo: mujeres, n (%)	132 (46,1)	66 (41,3)
Edad al diagnóstico de CCR, media (DE)	48,1 (SD 12,9)	54,9 (SD 14,2)*
Motivo de realización de IHQ, n (%)		
Criterios de Amsterdam I y II	206 (72,1)	18 (11,2)*
Criterios revisados de Bethesda	234 (84,2)	103 (64,4)*
Inmunohistoquímica, n (%)		

Pérdida de expresión de:		
MLH1 y PMS2	98 (34,3)	77 (48,1)*
MSH2 y MSH6	122 (42,6)	43 (26,9)*
MSH6	40 (14)	20 (12,5)
PMS2	18 (6,3)	14 (8,8)
IHQ no disponible; IMS-H	8 (2,8)	6 (3,7)
Gen mutado, n (%)		
<i>MLH1</i>	101 (35,3)	
<i>MSH2</i>	118 (41,3)	
<i>MSH6</i>	42 (14,7)	
<i>PMS2</i>	15 (5,2)	
<i>EPCAM</i>	10 (3,5)	
CCR: localización, n (%)		
Colon derecho	165 (62,7)	89 (61,4)
Colon izquierdo y recto	98 (37,3)	56 (38,6)
CCR: TNM, n (%)		
Estadio I y II	159 (55,6)	80 (60,1)
Histología, n (%)		
Pobre diferenciación	50 (17,5)	33 (20,6)
Infiltración linfocítica	41 (14,3)	37 (23,1)*
Tumor mucinoso	88 (30,8)	46 (28,7)
Infiltración vascular	35 (12,2)	18 (11,3)
Antecedente personal, n (%)		
CCR sincrónico y/o metacrónico	63 (22)	7 (4,4)*
Tumores no-CCR, asociados a SL	84 (29,4)	5 (3,1)*

*p < 0,05

5.2.2. Riesgo familiar de CCR y otras neoplasias asociadas a SL entre FPG de pacientes con SL y SLL

Con respecto al análisis del riesgo familiar de desarrollo de CCR u otras neoplasias asociadas con SL, de los 286 pacientes con SL y CCR incluimos información sobre familiares de primer grado de 205 pacientes, de los cuales sí disponíamos de la información completa sobre la edad y los antecedentes de neoplasias. Respecto al grupo de SLL, del total de 160 pacientes con SLL, pudimos obtener información completa de los familiares de primer grado de 131 pacientes. Finalmente, en el grupo de pacientes con SL incluimos información sobre 1.205 familiares de primer grado y en el grupo de SLL incluimos un total de 698 familiares de primer grado. Figura 13.

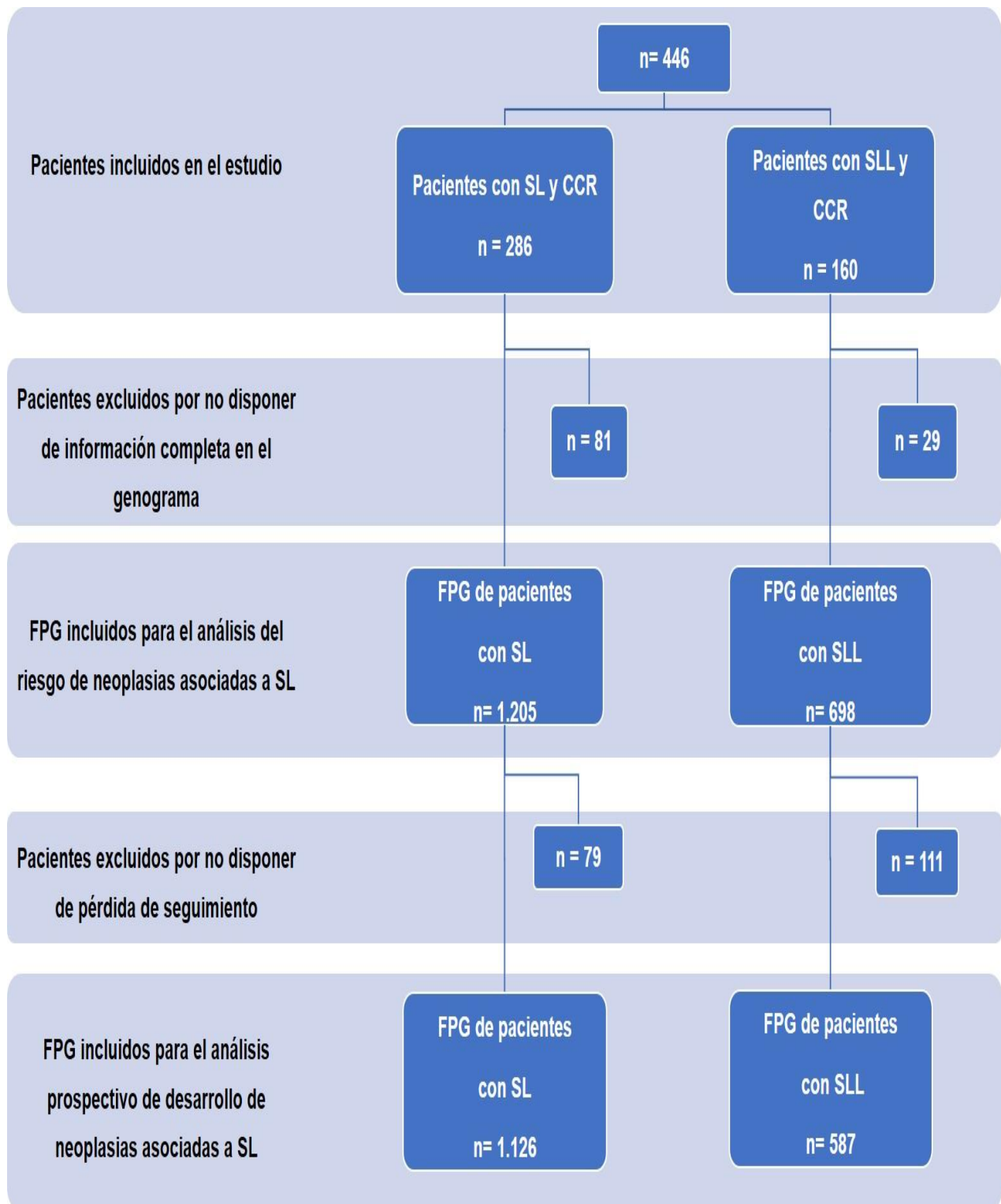


Figura 13. Diagrama de flujo de pacientes incluidos en el análisis del riesgo de desarrollo de neoplasias asociadas a SL.

Cuando analizamos la tasa de incidencia estandarizada (TIE) para CCR entre ambos grupos, encontramos una TIE más alta para CCR entre familiares de pacientes con SL comparado con la presentada entre los familiares de pacientes con SLL: TIE para CCR en SL 4,25; (IC 95%, 3,67-4,90) versus TIE para CCR en SLL de 2,08; (IC 95%, 1,56-2,71); $p < 0,001$). El riesgo de desarrollo de otras neoplasias asociadas con SL también fue mayor entre familiares de pacientes con SL comparado con la presentada entre los familiares de pacientes con SLL: TIE en el grupo de SL, de otras neoplasias asociadas con SL de 5,01; (IC 95%, 4,26-5,84) versus TIE en el grupo de SLL de 2,04; (IC 95%, 1,44-2,80); $p < 0,001$). Tabla 10.

Tabla 10. Tasa de incidencia estandarizada de CCR u otras neoplasias asociadas a SL entre los FPG de pacientes con SLL y SL.

	<u>SL / n= 1205</u>		<u>SLL / n= 698</u>		
	No. de tumores	TIE (IC 95%)	No. de tumores	TIE (IC 95%)	Valor p
CCR	191	4,25 (3,67-4,90)	54	2,08 (1,56-2,71)	0,0000
Otros tumores asociados a SL	161	5,01 (4,26-5,84)	38	2,04 (1,44-2,80)	0,0000
TOTAL	352	4,57 (4,10-5,07)	92	2,06 (1,66-2,53)	0,0000

5.2.3. Riesgo de desarrollo de CCR u otros tumores asociados a SL

Posteriormente se llevó a cabo el seguimiento prospectivo de nuevos casos de CCR u otras neoplasias asociadas a SL, en el período de tiempo que comprende desde el momento en el que se diagnosticó el CCR en los pacientes con SL o SLL, hasta el final de seguimiento, a finales de Julio de 2019. Se incluyeron los nuevos casos de estos tumores en los pacientes con SL y SLL y los aparecidos entre sus FPG.

La mediana de tiempo de seguimiento fue de 3 años (rango intercuartílico de 1-6). De un total de 1126 personas incluidas en el grupo de pacientes con SL y FPG, se observó el desarrollo de 22 casos de CCR (1,9%), frente 3 casos (0,50%) de un total de 587 personas incluidas en el grupo de pacientes con SLL y FPG. Respecto el resto de las neoplasias asociadas a SL, en el grupo de pacientes con SL y sus familiares, se observaron 23 casos (2%), frente 2 nuevos casos en el grupo de SLL y familiares (0,3%). Tabla 11. En la figura 14, se representa el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en el que se aprecia una mayor incidencia acumulada de neoplasias asociadas a SL entre los pacientes con SL y sus familiares ($p = 0.0001$).

Tabla 11. Desarrollo de nuevos casos de neoplasias asociadas a SL, entre pacientes con SL y SLL y FPG.

	SL n= 1126	SLL n= 587	Valor p
CCR, n (%)	22 (1,9)	3 (0,5)	0,019
Otras neoplasias asociadas a SL, n (%)	23 (2)	2 (0,3)	0,006
TOTAL, n (%)	45 (3,9)	5 (0,8)	0,000

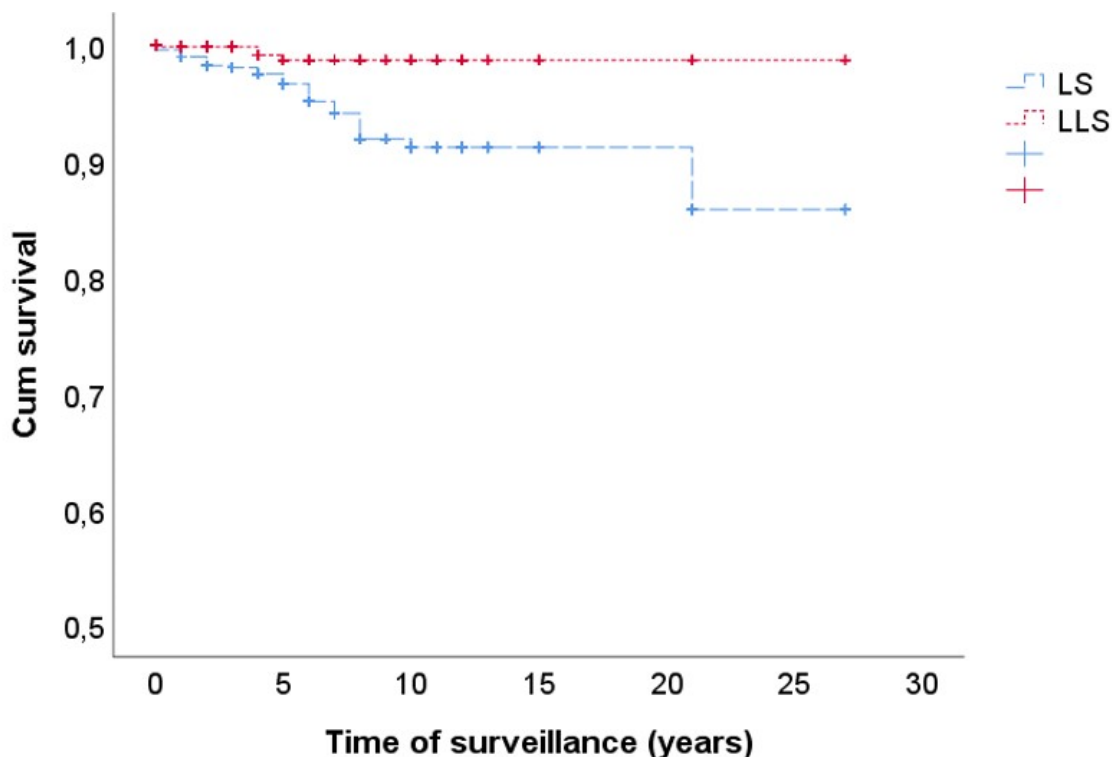


Figura 14. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de neoplasias asociadas a SL entre los pacientes con SL y sus familiares ($p = 0,0001$).

5.2.4. Neoplasias asociadas a SL (no-CCR) en los pacientes con SL y SLL y sus familiares de primer grado

Por último, se analizaron todas las neoplasias asociadas a SL, diferentes al CCR, observadas tanto en el análisis retrospectivo como en el prospectivo, entre los pacientes con SL, SLL y sus FPG. Tabla 12. Así, se observaron diferencias significativas en relación con las neoplasias de endometrio, que fueron superiores en el grupo de pacientes con SL y sus FPG comparado con el grupo de SLL y sus FPG (48,4% vs 20%; $p = 0.001$). Por contra, la frecuencia de neoplasias pancreáticas fue significativamente superior en el grupo de SLL (3.3% en el grupo de SL vs 15.0% en

el grupo de SLL; $p = 0.003$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en relación con el resto de neoplasias asociadas a SL.

Tabla 12. Neoplasias asociadas a SL (no-CCR) en los pacientes con SL y SLL y sus familiares de primer grado.

	Pacientes con SL y FPG	Pacientes con SLL y FPG	
Localización de los tumores	N=184	N=40	Valor P
Ovario	20 (10.9%)	5 (12.5%)	n.s.
Endometrio	89 (48.4%)	8 (20.0%)	0.001
Páncreas	6 (3.3%)	6 (15.0%)	0.003
Estómago	37 (20.1%)	11 (27.5%)	n.s.
Tracto urinario	10 (5.4%)	4 (10%)	n.s.
Piel	3 (1.6%)	2 (5%)	n.s.
Intestino Delgado	5 (2.7%)	0 (0%)	n.s.
Cerebro	6 (3.3%)	2 (5%)	n.s.
Tracto biliar	8 (4.3%)	2 (5%)	n.s.

DISCUSSION

6. DISCUSION

La implementación de cribado universal para la detección de SL (86), ha dado lugar a la presencia de un incremento de pacientes con tumores con IMS o pérdida de expresión de las proteínas de los genes reparadores del ADN en la IHQ. Estos pacientes denominados SLL no presentan ni hipermetilación en *MLH1* ni mutación en *BRAF V600E*, ni mutación germinal patogénica u otras causas que justifiquen la pérdida de expresión de los genes reparadores del ADN mediante los métodos diagnósticos disponibles en nuestra práctica clínica (89). No obstante, antes de evaluar la patogenia del tumor, es prioritario en primer lugar excluir la presencia de falsos positivos de IMS o pérdida de expresión en la IHQ, habiéndose descrito hasta un 19% de falsos positivos en el estudio mediante IMS o IHQ (123).

Desde un punto de vista clínico, los pacientes con SLL parecen constituir un grupo heterogéneo de pacientes entre los cuales podríamos distinguir dos subconjuntos diferentes. El primero estaría representado por aquellos pacientes en los cuales las características clínicas sugieren una alta sospecha de origen hereditario, pero en los que la alteración genética no se consigue identificar con los protocolos diagnósticos convencionales. Estos pacientes probablemente tengan un riesgo incrementado de CCR para ellos y sus FPG. Por otra parte, el segundo grupo de pacientes incluiría a una proporción significativa de pacientes con SLL que no tienen antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL y en los cuales, la única sospecha de SL es la presencia de IMS o la pérdida de expresión de las proteínas del sistema MMR. En este último grupo, la presencia de una afectación somática en los dos alelos de alguno de los genes del sistema MMR podría ser la causa del fenotipo que presenta IMS. Por tanto, en este grupo el origen de tumor sería esporádico y probablemente no sería necesario aplicar a estos pacientes ni a sus familiares las estrictas medidas de vigilancia que se llevan a cabo entre los pacientes con SL.

En los últimos años, se ha propuesto que los métodos diagnósticos actuales deberían ser complementados con algoritmos que integren otros datos moleculares del tumor, que permitan realizar un diagnóstico diferencial entre los casos de SLL con origen esporádico frente aquellos con origen hereditario (115). En este contexto, diferentes autores han propuesto la investigación de mutaciones somáticas en los genes del sistema MMR y en otros genes que pudieran explicar aquellos casos de CCR esporádico entre los pacientes con SLL. Así, estudios preliminares han encontrado una frecuencia de mutaciones somáticas en pacientes con SLL que oscila entre 22%-69% (115,123–126). Sin embargo, esta aproximación diagnóstica no se encuentra implementada en los algoritmos de práctica clínica habitual, debido por una parte a las discrepancias respecto al análisis apropiado sobre mutaciones somáticas y la ausencia de estudios clínicos de validación que confirmen el origen esporádico durante el seguimiento de estos pacientes y sus familiares. Asimismo, la necesidad de tecnología de secuenciadores de nueva generación, el elevado coste de estos métodos diagnósticos y las dificultades de aplicar esta tecnología en las muestras de parafina, son algunas de las barreras con las que nos encontramos a la hora de implementar un adecuado protocolo diagnóstico que clasifique a los pacientes con SLL como esporádicos o como casos probablemente hereditarios.

En este trabajo, se analiza una de las cohortes publicadas (127) más amplias de pacientes con SLL.

6.1. CARACTERIZACIÓN DEL SÍNDROME DE LYNCH-LIKE

Con la finalidad de identificar posibles características clínico-epidemiológicas, moleculares o patológicas que permitan diferenciar el posible origen hereditario del esporádico, se analizaron las diferencias entre los pacientes con SLL y SL incluidos en el estudio.

6.1.1. Edad al diagnóstico de CCR

Por una parte, se observó en los pacientes con SL una edad media al diagnóstico de CCR significativamente menor respecto a la presentada por los pacientes con SLL (48,1 vs 54,9 años). Estos resultados son similares a los descritos en estudios previos. Así, en un estudio previo realizado en la cohorte EPICOLON I y II (114), que incluía un menor número de pacientes con SL y SLL, la edad media al diagnóstico del CCR fue similar a la observada en este estudio, siendo más precoz entre los pacientes con SL ($48,5 \pm 14,1$ años), comparado con la presentada por los pacientes con SLL ($53,7 \pm 16,8$ años). La edad media al diagnóstico de CCR se ha mantenido sin cambios, a pesar del incremento de pacientes incluidos en la cohorte actual, EPICOLON III.

Sin embargo, no existen estudios previos que comparen las características clínico-epidemiológicas o histopatológicas del CCR de los pacientes con SLL en base a diferentes criterios clínicos, con la finalidad de poder discernir el origen del tumor.

Por tanto, en primer lugar, cuando analizamos los pacientes SLL de nuestra cohorte clasificados en 2 subgrupos atendiendo a si el diagnóstico se ha realizado a través de los criterios de Amsterdam y/o Bethesda, o a través del cribado universal de SL, se observaron diferencias significativas entre ambos en relación con la edad media al diagnóstico de CCR (mayor en el grupo del cribado universal para SL 65,5 vs 51,6 años. Tabla 7). No obstante, este resultado es previsible, puesto que la edad precoz al diagnóstico de CCR es una de las definiciones que incluyen los criterios de Amsterdam y/o Bethesda.

En el estudio de Mesenkamp et al (125), analizó un grupo de pacientes con CCR o carcinoma de endometrio que mostraba pérdida de expresión de los genes MMR. Posteriormente llevaron a cabo el estudio de mutaciones en línea germinal para diferenciar los pacientes con SL y SLL. Dentro del grupo de pacientes que

mostraba pérdida de expresión en MLH1, la presencia de hipermetilación del promotor del gen MLH1, permitió excluir los casos esporádicos. La edad media al diagnóstico de CCR o carcinoma de endometrio fue similar entre los pacientes con SL y SLL (41 años en SL con mutación en MLH1 vs 47 años en el grupo de SLL y pérdida de expresión de MLH1; 42 años en SL con mutación en MSH2 vs 45 años en el grupo de SLL y pérdida de expresión de MSH2). A continuación, entre los pacientes con criterios de SLL que mostraban pérdida de expresión en MLH1 y MSH2, identificaron la presencia de doble mutación somática y pérdida de heterocigosidad en el 50% de los pacientes. Al comparar la edad media al diagnóstico de CCR o carcinoma de endometrio en este grupo de pacientes, con la mostrada entre los pacientes con SL y la mostrada en el grupo de pacientes con CCR esporádico (pacientes con pérdida de expresión en MLH1 e hipermetilación del promotor del gen MLH1), observaron que en los pacientes con SLL y doble mutación somática, la edad media al diagnóstico de los tumores no fue significativamente superior a la presentada en los pacientes con SL y mutación en MLH1 y MSH2, aunque sí fue significativamente menor que la presentada por los pacientes con CCR esporádico (con presencia de hipermetilación del promotor del gen MLH1).

En el estudio realizado por Pearlman et al (128), analizan las características clínicas de los CCR de pacientes con SL y pacientes con doble mutación somática en el sistema MMR de dos cohortes diferentes (cohorte de Ohio en la que incluyeron 134 pacientes con SL y 76 pacientes con doble mutación somática en el sistema MMR; cohorte de Islandia: 23 pacientes con SL vs 16). Aunque en la cohorte de Islandia no observaron diferencias en relación a la edad media al diagnóstico del CCR, sí se observaron diferencias significativas en la cohorte de Ohio (SL: 58.8 vs 52.4, $p=1.68 \times 10^{-3}$), y aunque en ambos casos sigue siendo una edad más precoz al diagnóstico comparada con la descrita en la población general (129–131), estos resultados y los observados en estudios previos, ponen de manifiesto la utilidad de la edad al diagnóstico de CCR como un posible factor predictivo de posible origen hereditario, como se refleja en el análisis realizado en este estudio.

6.1.2. Análisis de IHQ

En relación con el análisis de la expresión de las proteínas de los genes MMR mediante IHQ, observamos diferencias significativas entre los pacientes con SL y SLL. Así, entre los pacientes con SL, casi la mitad muestran pérdida de expresión de MSH2 y MSH6, seguido de pérdida de expresión de MLH1 y PMS2. Por el contrario, entre los pacientes con SLL casi la mitad muestra pérdida de expresión en MLH1 y PMS2, seguido de aproximadamente una cuarta parte de los pacientes con SLL que mostraba pérdida de expresión de MSH2 y MSH6. En estudios previos (66–69,125,128,132,133) en los que se analiza los tumores que muestran pérdida de expresión de los genes MMR, se observan resultados similares en aquellos pacientes en los que se confirmó SL, en los cuales, el hallazgo más frecuente fue la pérdida de expresión del gen MSH2 y seguido en segundo lugar por pérdida de expresión en MLH1. Asimismo, estos estudios también reflejan resultados similares a los observados en nuestra cohorte de pacientes con SLL.

En el estudio de Pearlman et al (128) se observó que la pérdida de expresión de MLH1/PMS2 se asociaba a una alta probabilidad de la presencia de doble mutación somática entre aquellos pacientes con CCR que mostraban defectos en el sistema MMR, mientras que la pérdida de expresión aislada de MSH6 o PMS2, era predictiva de la presencia de SL.

Estudios previos (123–126), han mostrado que en aquellos pacientes con SLL y pérdida de expresión en MLH1 y PMS2 el escenario más común es una mutación somática del gen *MLH1* (delección, desplazamiento de marco, inserción o duplicación) asociada con la pérdida de heterocigosidad del otro alelo *MLH1*. Por otra parte, en aquellos pacientes con SLL y pérdida de expresión en MSH2 y MSH6, el escenario más común es la presencia de mutación somática bialélica del gen *MSH2* con pérdida infrecuente de heterocigosidad de *MSH2*. Por tanto, las mutaciones somáticas en genes MMR son probablemente eventos esporádicos. Sin embargo, se debe tener en cuenta la posibilidad (aunque infrecuente) de que estas

mutaciones bialélicas somáticas sean secundarias a otros defectos genéticos de la línea germinal (como por ejemplo en MUTYH) (134–136).

Respecto al estudio de IHQ, entre ambos subgrupos de pacientes con SLL confeccionados en base al motivo de diagnóstico de SLL (Amsterdam y/o Bethesda vs cribado universal SL), como en base a la edad de diagnóstico de CCR y/o antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL, no se observaron diferencias significativas entre ambos subgrupos. Casi la mitad mostraban pérdida de expresión en MLH1 y PMS2. No obstante, en el subgrupo de pacientes con una edad al diagnóstico de CCR superior a 50 años y/o sin presencia de antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL, el porcentaje de pacientes que mostraba pérdida de expresión de MLH1 y PMS2, fue casi un 15% superior. Por tanto, este hallazgo refuerza el hecho de que la edad al diagnóstico de CCR y la ausencia de antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL, representan factores relevantes a la hora de determinar el posible origen del tumor y por tanto, poder adaptar las recomendaciones de seguimiento al paciente y sus familiares.

En relación con la pérdida de expresión aislada de MSH6 y PMS2, en nuestra cohorte se observó un menor porcentaje de pacientes que la presentasen. Cabe destacar, que en este estudio se han incluido solamente pacientes con SL y SLL con CCR. Como se ha descrito previamente el riesgo de desarrollo de CCR es más elevado en los portadores de mutaciones en MLH1 o MSH2 en comparación con MSH6 o PMS2 (66,137–141). En la serie de Møller et al (137), la incidencia acumulada de CCR a los 70 años fue de 46%, 35%, 20% y 10% para los pacientes portadores de mutación en MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, respectivamente.

Entre los pacientes con SLL se observó un mayor porcentaje de pacientes que mostraban esta pérdida de expresión entre aquellos pacientes con diagnóstico de SLL secundario a cumplimiento de criterios de Amsterdam o Bethesda (13,2% mostraba pérdida de expresión de MSH6 y 10,8% de PMS2, vs 10,2% con pérdida de expresión de MSH6 y 2,6% de PMS2, entre los pacientes con SLL diagnosticados por cribado universal para SL). De manera similar, se observaron resultados parecidos en el subgrupo de pacientes con SLL agrupados en base a la edad de

diagnóstico de CCR e historia familiar de neoplasias asociadas a SL (14,8% mostraba pérdida de expresión de MSH6 y 9,8% de PMS2 en el subgrupo de pacientes con diagnóstico de CCR antes de los 50 años y/o antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL, vs 6,3% con pérdida de expresión de MSH6 y 6,3% de PMS2, entre el subgrupo de pacientes con SLL que no cumplían estos criterios).

Al comparar estos resultados con los observados en los estudios publicados, observamos en relación con la pérdida de expresión aislada de PMS2 resultados más heterogéneos, siendo en algunos estudios más frecuente esta pérdida en la población de pacientes con SLL (114,133), pero en otros estudios predomina en los pacientes con SL (125,132).

No obstante, en relación con la pérdida aislada de expresión en MSH6, se observan resultados homogéneos (125,132,133) siendo más frecuente esta pérdida de expresión entre los pacientes con SL. Así, en el estudio de Mas-Moya et al (133), en el que analizaron las características de CCR de pacientes con SL y SLL, ninguno de los pacientes con SLL mostró pérdida aislada de expresión en MSH6. En nuestra cohorte, se observó una mayor diferencia en relación con la pérdida de expresión aislada en MSH6 entre aquellos pacientes diagnosticados de CCR antes de los 50 años y/o presencia de antecedentes de neoplasias asociadas a SL. Dado que en el análisis realizado en base a la historia familiar (Amsterdam/Bethesda vs cribado universal SL) las diferencias no fueron tan amplias, sugiere que la edad al diagnóstico de CCR antes de los 50 años, podría ser el criterio clínico de mayor utilidad para seleccionar pacientes con SLL con posible origen hereditario.

Por tanto, en general la pérdida de expresión en MSH6 y PMS2 se observa más frecuentemente entre los pacientes con SL. No obstante, aunque las diferencias entre los subgrupos de SLL confeccionados, no fueron significativas, se observa un mayor porcentaje de pacientes que muestran pérdida de expresión en MSH6 y PMS2 entre aquellos pacientes diagnosticados por el cumplimiento de los criterios de Amsterdam y/o Bethesda o con una edad precoz al diagnóstico de CCR o historia familiar de neoplasias asociadas a SL. Por otra parte, aunque el número de pacientes incluidos en esta cohorte es muy superior comparado con los estudios

mencionados anteriormente, cabe tener en cuenta que el número de pacientes que muestran pérdida de expresión en MSH6 y PMS2 es menor. Por tanto, un estudio con un mayor volumen de pacientes permitiría validar la relevancia de este hallazgo en la IHQ con el fin de determinar el posible origen hereditario del tumor.

6.1.3. Características del CCR

6.1.3.1. Localización

En nuestra cohorte no se observaron diferencias entre SL y SLL en relación a la localización del CCR. En ambos grupos, alrededor del 60% de los pacientes la neoplasia colónica se diagnosticó en colon derecho. Lo mismo ocurre entre los subgrupos de pacientes con SLL confeccionados en base al motivo de diagnóstico de SLL (Amsterdam y/o Bethesda vs cribado universal SL), como en base a la edad de diagnóstico de CCR y/o antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL, observando porcentajes muy similares entre ambos subgrupos. Estos datos son muy similares a los descritos en estudios previos (114,123,125,128). Así, en el estudio realizado por Rodríguez-Soler et al (114), en el 56,3% de pacientes con SL, la neoplasia colónica se localizaba en colon derecho vs 55,8% en SLL y 26,9% en el grupo de CCR esporádico (constituido por pacientes con CCR sin IMS, o con pérdida de expresión de MLH1 secundaria a hipermetilación del promotor de MLH1).

La localización proximal del CCR se ha definido como un hallazgo común en el SL (142,143). Así, previo al establecimiento de la recomendación del cribado universal para identificar a los pacientes con SL (86) se diseñaron diferentes modelos matemáticos, como son: PREDICT, MSPath, MMRpro, MMRpredict y PREMM1,2,6, con el objetivo de facilitar la identificación de estos pacientes mediante la predicción del riesgo de ser portador de una mutación en alguno de los genes reparadores del ADN basándose en la historia personal y familiar de cáncer (143–146). Algunos de estos modelos determinan la localización proximal del CCR como una de las variables de riesgo para la identificación de pacientes con SL. En este sentido, diversos estudios publicados, han observado que los CCR que se

desarrollan a través de la vía de la IMS, sean esporádicos o hereditarios, comparten determinadas características, como la localización en el colon derecho de la neoplasia en estos casos. Así, en el estudio de Jass et al (44), el porcentaje de neoplasias en colon derecho entre las neoplasias con alteraciones en el sistema MMR fue superior a las neoplasias colónicas que no presentan IMS (74,1% en los pacientes con IMS vs 28,6% en pacientes sin IMS; $p = 0.001$). Sin embargo, Hartman et al (147) llevaron a cabo un estudio en el que analizaron las características histopatológicas de pacientes con presencia de IMS en el CCR. Se compararon las características de aquellos pacientes con CCR e IMS con origen esporádico (presencia de mutación en *BRAF V600E* o hipermetilación del promotor de *MLH1*) frente a las presentadas por el grupo de pacientes con CCR e IMS (definido como SL y/o probable SL). Observaron que, aunque en ambos grupos la localización en colon derecho era más frecuente (68% en el grupo de SL y/o probable SL vs 92% en el grupo esporádico), los CCR con IMS que se localizaban en colon izquierdo estaban más frecuentemente asociados al grupo de SL y/o probable SL (32% vs 8% en el grupo de CCR esporádico). Este hallazgo pone de manifiesto las limitaciones de modelos como MSPath y PREDICT para seleccionar los pacientes con SL, debido a la dependencia de estos modelos por la localización proximal de la neoplasia colónica como uno de los criterios que determinan dicho riesgo. Por tanto, aunque clásicamente se ha asociado al SL con predilección por la localización en colon derecho, también puede observarse en colon izquierdo o recto. Así, en el estudio de Lin et al (148), se observó un mayor porcentaje de neoplasias en recto entre aquellos pacientes con SL y mutación en *MSH2* (8% *MLH1* vs. 28% *MSH2*; $P = 0.01$).

6.1.3.2. Estadiaje

Como se observa en este estudio, las neoplasias colónicas asociadas a alteración en el sistema MMR se diagnostican en estadios menos avanzados en más de la mitad de los casos. Así, en el SL el porcentaje de pacientes diagnosticados en estadio I y II fue ligeramente inferior, de 55,6% vs 60,1% en el SLL. Al analizar los

subgrupos de SLL en base a la historia familiar y edad al diagnóstico de CCR, observamos resultados muy similares entre los subgrupos. Entre los pacientes con SLL diagnosticados por el cumplimiento de criterios de Amsterdam o Bethesda, el 51,2% el CCR se diagnosticó en el estadio I y II, siendo este porcentaje del 48,7% entre los pacientes con SLL diagnosticados por cribado universal para SL. Mientras que, en el otro subgrupo, la neoplasia colónica fue diagnosticada en estadio I y II en el 49,2% de los SLL con diagnóstico de CCR antes de los 50 años y/o historia familiar de neoplasias asociadas a SL vs 56,2% diagnosticado en estos estadios entre los SLL que no cumplían estos requisitos.

En general, se ha observado que los pacientes con CCR secundarios a defectos en el sistema MMR, presentan mejor pronóstico y supervivencia que el resto de los CCR (50). Los tumores con IMS invaden con mayor profundidad la pared del colon, pero, en cambio, se diagnostican en estadios menos avanzados, siendo menos frecuente la presencia de metástasis ganglionares o a distancia (50–54). En el estudio de Gryfe et al (50), analizaban una cohorte de pacientes con diagnóstico de CCR a una edad inferior a 50 años, observando la presencia de IMS en el 17%. La presencia de IMS estuvo significativamente asociada con un estadio más precoz del cáncer (cociente de riesgo, 0,42; [IC95%, 0.27-0.67]; P <0.001). Además, independientemente de la profundidad de la invasión tumoral, los CCR con IMS tenían una menor probabilidad de metástasis a los ganglios linfáticos regionales u órganos distantes, lo que conlleva una mejoría de la supervivencia del tumor. Estos autores, alegaban que este incremento en la supervivencia de los pacientes con IMS, podría estar relacionado con los tipos de mutaciones o los mecanismos genéticos involucrados. En estos casos, se observó una menor frecuencia de mutaciones de los genes *APC* y *p53* (149) y mayor frecuencia de mutaciones de los genes *β-catenina (CTNNB1)* (150,151) y del receptor tipo II del factor de crecimiento transformante β (152).

6.1.3.3. Características histopatológicas

a) Grado de diferenciación

No se observaron diferencias significativas en relación con el grado de diferenciación entre pacientes SL y SLL, siendo el porcentaje de pacientes con CCR poco diferenciados ligeramente superior en el grupo de SLL. Al analizar los subgrupos de pacientes con SLL en base a la historia familiar o la edad al diagnóstico de CCR, tampoco observamos diferencias significativas.

Estos resultados son muy similares a los observados en el estudio de Hemminger et al (132), en el cual, un 15% de los pacientes con SL presentaba pobre grado de diferenciación y/o histología medular vs 19% en los pacientes con SLL en los que confirmaron la presencia de doble mutación somática. Sin embargo, aunque clásicamente se ha asociado la presencia de CCR con pobre grado de diferenciación a los tumores con defectos en el sistema MMR (44,46) independientemente del origen hereditario o esporádico, observamos resultados discrepantes en los diversos estudios que analizan las características histopatológicas de CCR entre los pacientes con SL y SLL. Así, en el estudio de Rodríguez-Soler et al (114), el porcentaje de pacientes con SL que presentaban bajo grado de diferenciación en el CCR fue superior en el grupo de SL (25%), frente al presentado en el grupo de pacientes con SLL (4,9%) y el grupo de CCR esporádico (8,3%). Por contra, en el estudio de Mas-Moya et al (133) aunque las diferencias no fueron significativas, se observó mayor porcentaje de pacientes que presentaban pobre grado de diferenciación en el grupo de pacientes con SLL y CCR esporádico (29% de pacientes con SL presentaban pobre grado de diferenciación vs 44% en los pacientes con SLL y 44% en la población con CCR esporádico). A diferencia del estudio previo mencionado de Rodríguez-Soler et al (114), en este estudio, el grupo que definen como CCR esporádico estaba constituido por pacientes en cuya neoplasia colónica se observó pérdida de expresión en *MLH1* secundaria a hipermetilación del promotor de *MLH1* o mutación en el gen *BRAF V600E*. Por tanto, aunque en estos casos el origen de la neoplasia es esporádica, tiene en común con los otros grupos analizados la presencia de alteración del sistema MMR, dando lugar igualmente a la presencia de IMS. Por otra parte, analizando con más detalle el grupo de pacientes con SL, la mitad de ellos mostraba pérdida de expresión del gen

MSH2 (50%), seguido de pérdida de expresión en MLH1 (12%), y en el grupo de SLL el 44% de los pacientes mostraba pérdida de expresión del gen MSH2, seguido de pérdida de expresión en MLH1 (38%). Este dato, de predominio de pacientes en el grupo de SL con pérdida de expresión en MSH2, podría ser la causa de este menor porcentaje de pacientes que muestran CCR poco diferenciados, como así se observó en el estudio previo de Wright et al (47). En dicho estudio, analizaron las características histopatológicas entre los CCR que mostraban pérdida de expresión de MLH1 y MSH2, observando un mayor porcentaje de pacientes que mostraban pobre grado de diferenciación (70%) entre los que mostraban pérdida de expresión de MLH1, comparado con el mostrado en el grupo con pérdida de expresión de MSH2 (22,2%).

En resumen, debido a que la presencia de CCR con pobre grado de diferenciación se ha asociado a característica común en los CCR con defectos en el sistema MMR, este dato de forma aislada no parece ser suficiente para discriminar el origen del tumor.

b) Componente mucinoso

La prevalencia de carcinomas colorrectales mucinosos entre todos los carcinomas colorrectales esporádicos es variable, oscilando en el mundo occidental entre el 11 y el 19% (153–156).

Ogino et al (48), analizaron las características de CCR mucinosos frente los que no presentaban estas características, observando con mayor frecuencia la presencia de mutaciones en *BRAF*, *IMS* y pérdida de MLH1 entre los CCR mucinosos.

Como se comentaba anteriormente, es frecuente entre los CCR que se desarrollan a través de la vía de la IMS la presencia de componente mucinoso (46).

En la cohorte incluida en este estudio, no se observaron diferencias entre los pacientes con SL (30,8%) y SLL (28,7%). Lo mismo ocurrió cuando se analizó a los pacientes con SLL en base a los criterios del motivo del diagnóstico de SLL (29,8% en el grupo diagnosticado por el cumplimiento de los criterios de Amsterdam y/o

Bethesda vs 25,6% en el grupo de cribado universal). Sin embargo, al comparar los subgrupos de SLL en base a la edad al diagnóstico de CCR y/o presencia de historia familiar de neoplasias asociadas a SL, aunque las diferencias no resultaron significativas, sí destaca la presencia de mayor componente mucinoso entre los pacientes con SLL con diagnóstico de CCR a una edad superior a 50 años o ausencia de antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL (25,8% en el grupo de SLL con neoplasias colónicas diagnosticadas antes de los 50 años y/o antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL vs 40,6%).

En general, observamos en los diferentes estudios (114,132,133) la presencia de componente mucinoso en el CCR en pacientes con SL y SLL en alrededor de 25-55% de los pacientes. Este porcentaje es superior a las series publicadas de CCR mucinoso esporádico (entre el 11 y el 19%). Sin embargo, curiosamente, al desglosar la población de pacientes con SLL de la cohorte de este estudio en base a los criterios de la presencia de historia familiar de neoplasias asociadas a SL o la edad al diagnóstico del CCR, el mayor porcentaje de pacientes con componente mucinoso se observó entre los pacientes con SLL con menor sospecha de origen hereditario del CCR, en base a los criterios de selección. Por tanto, aunque la presencia de componente mucinoso en el CCR se ha asociado a CCR con alteraciones en el sistema MMR, no parece ser un criterio útil, de forma aislada para determinar el origen del tumor.

c) Infiltración linfocítica

Otra de las características comunes descritas asociadas a las neoplasias colónicas que se desarrollan a través de la vía de la IMS, es la presencia frecuente de infiltración linfocitaria peri e intratumoral (45–49).

En este estudio se observó una diferencia significativa en relación con la infiltración linfocítica, siendo mayor entre el grupo con SLL respecto al grupo con SL (14,3% en SL vs 23,1% en SLL). Sin embargo, en relación con el análisis de los subgrupos de pacientes con SLL, no se observaron diferencias significativas. Cuando el criterio de selección era el motivo de diagnóstico de SLL, el porcentaje de

pacientes con infiltración linfocítica fue mayor entre los pacientes diagnosticados en base a la presencia de criterios de Amsterdam y/o Bethesda (24,8%) frente a los pacientes diagnosticados por la realización del cribado universal para el SL (17,9%). Sin embargo, al seleccionar a los pacientes en base a la edad del diagnóstico del CCR y/o la historia familiar de neoplasias asociadas a SL el porcentaje de pacientes con infiltración linfocítica fue mayor en el subgrupo sin antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL y con diagnóstico de CCR a una edad superior a 50 años (31,3% vs 21,1%).

En el estudio de Jass et al (44), la presencia de infiltración linfocítica fue una variable discriminante de presencia de fenotipo asociado a alteración en el sistema MMR (29,6% vs 14,3% entre los CCR sin inestabilidad de microsatélites). Hemminger et al (132), comparó la presencia de infiltración linfocítica en los pacientes con SL y SLL, sin observar diferencias relevantes (75% en los pacientes con SL vs 81% en los pacientes con SLL con presencia de mutación doble somática). Sin embargo, existen otros estudios que muestran resultados heterogéneos en relación con la presencia de infiltración linfocítica en el tumor. Así, en el estudio de Rodríguez-Soler et al (114), no se observaron diferencias significativas (25% de pacientes con SL presentaba infiltración linfocítica vs 28,6% en el grupo de SLL y un 29,2% en el grupo de CCR esporádico). Por otra parte, en el estudio de Mas-Moya et al (133), el porcentaje de pacientes con infiltración linfocítica fue mayor (81%) en el grupo de CCR esporádico con alteración en el sistema MMR (pérdida de expresión de MLH1 secundaria a hipermetilación de su promotor o mutación en *BRAF V600E*) comparado con el presentado en los grupos de pacientes con SL (50%) y SLL (50%).

En resumen, observamos en este estudio, resultados similares a los descritos en la serie previa de Rodríguez-Soler et al (114), a pesar de incrementar la inclusión de pacientes en la cohorte EPICOLON III, con porcentajes de pacientes con presencia de infiltración linfocítica en la neoplasia colónica entre 14-23%. Este porcentaje difiere bastante de los porcentajes de entre 50-81% descrito en otras series (132,133). Además, se observa de nuevo que al subclasificar a los pacientes

con SLL en base a la edad al diagnóstico del CCR o la historia familiar de neoplasias asociadas a SL, el grupo de pacientes que agrupa la presencia de un mayor porcentaje de CCR con infiltración linfocítica es el de pacientes con edad al diagnóstico de CCR superior a 50 años y/o ausencia de antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL.

Sin embargo, a la hora de interpretar estos resultados, se debe tener en cuenta la posible disparidad entre los centros a la hora de determinar el concepto de infiltración linfocítica. En la cohorte EPICOLON, la infiltración linfocítica se realizó en base a una evaluación morfológica, pero no se realizó inmunohistoquímica que permita la cuantificación de los mismos.

Por el contrario, en el estudio de Mas-Moya et al (133), sí definen la presencia de infiltración linfocítica en el tumor mediante la presencia de 5 o más linfocitos por campo de gran aumento. Asimismo, en el estudio de Hemminger et al (132), la presencia de infiltración linfocítica en el CCR fue establecida en dos grados. Así, el grado 1+ estaba definido por la presencia de 1-2 linfocitos por campo de gran aumento y el grado 2+, por la presencia de ≥ 3 linfocitos por campo de gran aumento.

Por tanto, para poder establecer conclusiones en relación con el papel de la presencia de infiltración linfocítica como una herramienta útil a la hora de discriminar el origen del CCR en los pacientes con SLL en base a los criterios clínicos mencionados, sería necesario diseñar un estudio enfocado con esta finalidad. En este sentido, sería de utilidad referir las muestras a un único centro con patólogos expertos en esta patología, para así, reducir la variabilidad interobservador.

d) Infiltración vascular

La presencia de infiltración vascular por la neoplasia colónica no mostró diferencias entre los pacientes con SL (12,2%) comparado con los pacientes con SLL (11,3%). Sin embargo, al analizar las características de los pacientes con SLL seleccionados en base al motivo del diagnóstico de SLL y la edad al diagnóstico de SLL y/o presencia de antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL, se

observaron diferencias, que aunque no fueron significativas, muy probablemente por el escaso tamaño muestral, mostraban la característica común de presentar un mayor porcentaje de pacientes con infiltración vascular entre aquellos pacientes con SLL que fueron diagnosticados por el cumplimiento de los criterios de Amsterdam y/o Bethesda (14% vs 2,6% en el grupo de cribado universal para SL). Entre los subgrupos de pacientes con SLL seleccionados en base la edad más precoz al diagnóstico de CCR y/o presencia de antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL se observaron porcentajes muy similares (11,7% vs 9,4% entre los que no cumplían estos criterios).

En los estudios mencionados anteriormente (114,132,133) que comparaban las características histopatológicas de los CCR de pacientes con SL vs SLL, no hacen referencia específica a la presencia de infiltración vascular. No obstante, sí existen diversos estudios que analizan la presencia de invasión venosa extramural entre CCR con presencia de IMS frente CCR sin IMS. Así, en el estudio de Wright et al (51), observaron menor presencia de infiltración venosa entre los pacientes que presentaban IMS (14,6% vs 32%). Se observaron resultados similares en el estudio de Gafâ et al (52), observando también diferencias significativas en relación a la baja incidencia de invasión venosa extramural entre los pacientes en cuyo CCR se observaba IMS (4,5% vs 23,8%). Sin embargo, en el estudio de Gryfe et al (50), no se observaron diferencias en relación a la infiltración venosa entre ambos grupos.

Por tanto, de nuevo se observa un menor porcentaje de infiltración vascular entre los pacientes con SLL cuyos criterios de selección sugerían más probablemente un origen esporádico (edad más avanzada al diagnóstico de CCR o menor probabilidad de presentar antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL). Aunque estas diferencias no resultaron significativas, sería preciso realizar estudios con un mayor número de pacientes incluidos para definir la relevancia de esta característica histológica entre los pacientes con SLL.

6.1.4. Antecedentes personales o familiares de neoplasias asociadas a SL

Respecto a la historia personal de CCR (sincrónicos o metacrónicos) u otros tumores asociados a SL, se observó un aumento significativo, del porcentaje de estos tumores entre pacientes con SL con respecto al grupo de pacientes con SLL (22% en SL vs 4,4% en SLL). Este hallazgo es similar al de otros estudios (114,123,128,133), donde se observa una tendencia a la presencia de un mayor porcentaje de estas neoplasias entre los pacientes con SL.

En el estudio de Rodriguez-Soler et al (114), se observaron resultados similares, con predominio de CCR sincrónico o metacrónico entre los pacientes con SL (CCR sincrónico (12,5% en SL vs 9,5% en SLL vs 5,6% en CCR esporádico); CCR metacrónico (12,5% en SL vs 0% en SLL vs 1,2% en CCR esporádico).

En relación a la presencia de antecedentes personales de otras neoplasias asociadas a SL diferentes a CCR, en este estudio también se observó un aumento significativo, del porcentaje de estos tumores entre los pacientes con SL con respecto al grupo de pacientes con SLL (29,4% vs 3,1%). En el estudio de Rodriguez-Soler et al (114), también se observaron diferencias significativas en relación a la presencia de neoplasias asociadas a SL (diferentes a CCR) entre los pacientes con SL (43,8%) comparado con los pacientes con SLL (11,6%). Asimismo, al comparar la presencia de estas neoplasias entre los pacientes con SLL con los pacientes con CCR esporádico, también se observaron diferencias significativas (11,6% vs 3,3%). Aunque el porcentaje observado en este estudio es superior al observado en el estudio actual, sí mantiene en común la mayor frecuencia de estas neoplasias entre los pacientes con SL.

En el estudio de Mas-Moya et al (133), la presencia de neoplasias asociadas a SL se observó de manera significativa superior entre los pacientes con SL (38% vs 7% en SLL, vs 8% en CCR esporádico). Por último, en el estudio de Haraldsdottir et al (123), ningún paciente con SLL presentó otras neoplasias asociadas a SL, aunque el número de pacientes con SLL incluidos era también escaso (n=22).

Dentro del grupo de pacientes con SLL, se observaron diferencias significativas en relación a un mayor porcentaje de antecedentes familiares de CCR

en el grupo de pacientes con SLL diagnosticados por el cumplimiento de criterios de Amsterdam o Bethesda (57% vs 28,2%). Por otra parte, aunque también se observaron diferencias respecto a un mayor porcentaje de antecedentes personales de CCR u otras neoplasias asociadas a SL en el grupo de pacientes con SLL diagnosticados por el cumplimiento de criterios de Amsterdam o Bethesda (9,1% vs 2,6%), éstas no fueron significativas, probablemente debido al escaso número de casos incluidos. Esta diferencia observada, se explica probablemente por un mayor reclutamiento de casos hereditarios secundario al cumplimiento de los criterios de Amsterdam o Bethesda.

Respecto al subgrupo de pacientes con SLL confeccionado en base a la edad al diagnóstico de CCR y/o presencia de historia familiar de neoplasias asociadas a SL no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (antecedentes personales de CCR u otras neoplasias asociadas a SL: 7,8% en el grupo de pacientes con SLL con diagnóstico de CCR antes de los 50 años y/o antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL vs 6,2%).

En general, se observa un predominio de la presencia de neoplasias asociadas a SL entre los pacientes con SL, siendo los porcentajes menores entre los pacientes con SLL. Estos datos sugieren una menor probabilidad de desarrollo de este tipo de neoplasias en los pacientes con SLL comparado con los pacientes con SL, probablemente porque entre los pacientes con SLL, existe un porcentaje de pacientes en los cuales el origen del CCR es esporádico, como se comentaba anteriormente.

6.2. RIESGO FAMILIAR DE CCR Y OTRAS NEOPLASIAS ASOCIADAS AL SÍNDROME DE LYNCH

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis del riesgo familiar de desarrollo de neoplasias asociadas a SL, para determinar las medidas de vigilancia apropiadas en los pacientes con SLL y sus familiares.

Para ello se ha incluido una amplia cohorte de pacientes con SL y SLL diagnosticados de CCR, y sus familiares de primer grado. El principal hallazgo de este estudio es la presencia de un riesgo incrementado de CCR u otras neoplasias asociadas a SL entre los familiares de pacientes con SLL, que se muestra menor que aquel presentado por las familias de pacientes con SL, pero superior respecto al riesgo presentado por la población general, calculado en base a las tasas estándar obtenidas de los registros regionales españoles (122).

Los pacientes con SLL representan actualmente un gran reto en relación al riesgo de desarrollo de neoplasias y las medidas de vigilancia adecuadas. En este sentido, tan sólo existen dos estudios que analicen el riesgo de los pacientes con SLL y sus familiares de desarrollo de neoplasias asociadas a SL (114,157). Los resultados observados en este estudio son similares a los descritos en esos dos estudios previos, en los cuales se observó un riesgo incrementado de desarrollo de estas neoplasias entre los pacientes con SLL. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de realizar medidas de vigilancia a los pacientes con SLL y sus familiares, al menos hasta poder identificar el mecanismo patogénico del tumor.

En el estudio realizado por Win et al. (157) analizaron el riesgo de desarrollo de CCR entre los FPG en base a los subtipos moleculares de CCR y las características histopatológicas del CCR. Para ello, incluyeron una cohorte con 33.496 FPG de 4.853 casos de CCR incidentes. Posteriormente, clasificaron a los FPG en cuatro grupos: 28.156 FPG de 4.095 CCR sin alteraciones en el sistema MMR, 2.302 FPG de 301 CCR con pérdida de expresión en *MLH1* secundaria a metilación en *MLH1* y/o mutación en *BRAF V600E*, 1.799 FPG de 271 CCR con sospecha de síndrome de Lynch (SLL) y 1.239 FPG de 186 CCR en pacientes con SL. Se observó un riesgo incrementado de CCR entre los familiares de pacientes

con SLL, aunque inferior al presentado entre los familiares de pacientes con SL. Sin embargo, en este estudio las características epidemiológicas e histopatológicas sí resultaron ser de ayuda a la hora de estratificar el riesgo de desarrollo de neoplasias entre los familiares de pacientes con SLL y SL e identificar qué casos tienen más probabilidades de ser secundarios a predisposición genética. En este sentido, observaron entre los familiares de pacientes con SLL y SL un riesgo incrementado de desarrollo de CCR en aquellos pacientes con SLL y SL con CCR diagnosticados antes de los 50 años, con localización de la neoplasia en colon proximal o si dichas neoplasias presentaban cualquiera de los siguientes signos: margen tumoral expansivo, linfocitos peritumorales, linfocitos intratumorales o sincrónicos CRC.

En nuestro estudio, no se llevó a cabo un análisis del riesgo de desarrollo de CCR u otras neoplasias asociadas a SL entre los FPG en base a las características clínicas o histopatológicas, puesto que el objetivo era determinar el riesgo asociado. Sin embargo, un estudio diseñado con tal fin, podría determinar la importancia de estas variables a la hora de determinar el riesgo familiar de desarrollo de estas neoplasias y por tanto su implicación en las medidas de vigilancia.

Por otra parte, respecto el análisis de los tipos de neoplasias (diferentes al CCR), asociadas a SL, se observaron diferencias relevantes con relación a un mayor porcentaje de neoplasias de endometrio entre los pacientes con SL y sus FPG (48,4% vs 20% en el grupo de SLL y FPG; $P = 0,001$). Por el contrario, las neoplasias pancreáticas fueron más frecuentes en el grupo de pacientes con SLL y sus FPG (3,3% en el grupo de SL y FPG vs 15% en el grupo de SLL y FPG; $P = 0,003$). No se observaron diferencias significativas en el resto de las neoplasias asociadas a SL. En general, son pocos los estudios publicados que comparen los tipos de neoplasias asociadas a SL entre los pacientes con SL y SLL, o con doble mutación somática en los genes MMR (114,128). Por tanto, sería necesario ampliar el estudio enfocado a analizar diferencias en relación con el tipo de neoplasia asociada a SL entre ambas poblaciones.

Por último, se analizó la incidencia de neoplasias asociadas a SL entre pacientes con SL y SLL y sus familiares, observando muy pocos casos de desarrollo de este tipo de neoplasias en el grupo de SLL, comparado con el grupo de SL, desde el diagnóstico del caso índice. La hipótesis más probable es que todos los SL tienen un origen hereditario, mientras que la proporción de pacientes con origen hereditario del tumor en el grupo de SLL probablemente es menor. Además, se debe tener en cuenta el corto período de seguimiento en este estudio, que podría explicar esta diferencia. Además, es posible que en las personas que puedan tener una predisposición genética conocida el seguimiento sea más estrecho e informen acerca de una historia familiar más completa de cáncer en comparación con aquellos en los que no ha sido posible identificar un mecanismo hereditario. Asimismo, en los pacientes con SLL y sus familiares, al no poder identificar la mutación patogénica, este hecho puede influir en la percepción del riesgo de desarrollo de neoplasias asociadas a SL y por tanto, en la adherencia a los programas de vigilancia (158). Por tanto, en este supuesto, habrá datos de diagnóstico de cáncer más completos informados en el SL.

Por este motivo, se necesitará un tiempo de seguimiento más prolongado en nuestra cohorte para poder extraer conclusiones que permitan extrapolar recomendaciones adecuadas respecto a las medidas de vigilancia para la prevención de desarrollo de neoplasias asociadas a SL en los pacientes con SLL y sus familiares.

6.3. CONCLUSIONES CARACTERIZACIÓN DEL SÍNDROME DE LYNCH-LIKE

En resumen, encontramos que aquellos casos en los que se sospechaba un origen hereditario debido a la presencia de historia familiar, edad joven al diagnóstico, y/o cumplimiento de criterios de Amsterdam o Bethesda, son en general, similares a los casos en los que se sospecha origen esporádico, en base a las características clínicas, moleculares e histopatológicas de estos subgrupos.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, aunque las características histológicas mencionadas anteriormente, se han asociado clásicamente a las presentadas en los CCR de SL, como se comentaba previamente, no son exclusivas de pacientes con SL, sino que también están presentes en pacientes con alteraciones del sistema MMR, aunque la alteración sea secundaria a mutaciones somáticas. No obstante, existen diversos estudios enfocados a analizar las características clínico-epidemiológicas e histopatológicas de los CCR asociados a SL frente a los CCR esporádicos con IMS (mutación en *BRAF V600E* /hipermetilación del promotor *MLH1*) que ponen de manifiesto resultados contradictorios. Por una parte, Young et al (55), sí identificó diferencias entre estos dos grupos, siendo más frecuente la presencia de pobre grado de diferenciación, componente mucinoso y localización proximal entre los CCR esporádicos con IMS. Jass et al (159), también observaron entre los CCR esporádicos con IMS un mayor porcentaje de neoplasias heterogéneas con componente mucinoso, mientras que en los CCR en los pacientes con SL era más frecuente la presencia peritumoral de reacción linfocítica tipo Crohn. Sin embargo, existen otros estudios que no evidencian diferencias entre CCR asociados a SL frente a los CCR esporádicos con IMS (147,160,161).

Como se comentaba anteriormente, la implementación del cribado universal para SL ha dado lugar a una mayor detección de pacientes que cumplen los criterios de SLL, lo que ha incrementado en los últimos años el interés en el estudio de características clínico-epidemiológicas e histopatológicas que sean de utilidad para establecer el origen del tumor. Sin embargo, los estudios previos realizados con esta finalidad en los que comparan las características entre pacientes con SL y SLL, no observaron diferencias relevantes, siendo los porcentajes entre ambos grupos muy similares (114,132,133,157).

Así, en el estudio de Hemminger et al. (132), no observaron diferencias en relación con las características histopatológicas, que permitiesen diferenciar las neoplasias de los pacientes con SLL con mutación doble somática (69% de los pacientes con SLL) de las de los pacientes con SL. Estos autores alegaban que el

hecho de que las características histológicas sean similares entre ambos grupos podría ser debido a un proceso en la oncogénesis similar que afecta a la función del sistema MMR. Como se comentaba previamente, diversos estudios han puesto de manifiesto características comunes en los CCR que se desarrollan a través de la vía de la IMS, sean esporádicos o hereditarios (44,45,54,55,46–53).

Haraldsdottir et al (123), informaron que los tumores con doble mutación somática en los genes MMR también presentan el fenotipo hipermutado (>12 mutaciones/megabase), característico de los tumores con IMS secundaria a la pérdida de la función del sistema MMR.

Además, se ha observado que en los tumores con doble mutación somática en los genes MMR, al igual que en los pacientes con SL, las neoplasias colorrectales se desarrollan a través de la vía convencional del adenoma y no por la vía serrada (133,162). Por lo tanto, estos CCR probablemente surgen de adenomas tubulares o tubulovelloso convencionales que adquieren mutaciones bialélicas somáticas en los genes MMR.

Por tanto, los diferentes estudios enfocados a analizar las características histopatológicas en los tumores de pacientes con SLL, no han observado diferencias significativas en relación con las características clínico-epidemiológicas ni histopatológicas entre CCR de pacientes con SL y SLL. Estos estudios evidencian la ausencia de valor de estas características a la hora de discriminar entre pacientes con SL y SLL (114,123,125,132,133), al igual que se ha observado en el presente estudio.

No obstante, cabe destacar que el presente estudio es el primero diseñado con la finalidad de identificar posibles características clínico-epidemiológicas o histopatológicas entre los pacientes con SLL en función de criterios clínicos que hacen sospechar un posible origen hereditario o esporádico. En conclusión, observamos al analizar los 2 subgrupos confeccionados en los pacientes con SLL características muy similares, siendo estos resultados acordes con la mayoría de los estudios publicados.

Los resultados en el análisis mediante IHQ no demostraron diferencias significativas. Sin embargo, la pérdida aislada de expresión en MSH6 más frecuentemente asociada a los pacientes con SL, fue superior sobre todo entre los pacientes con SLL diagnosticados de CCR antes de los 50 años y/o presencia de antecedentes de neoplasias asociadas a SL, lo que sugiere estos criterios clínicos, como de utilidad para seleccionar pacientes con SLL con posible origen hereditario.

Por otra parte, al analizar las características histopatológicas de la neoplasia colónica, en los dos subgrupos de pacientes con SLL con sospecha de posible origen hereditario en base al cumplimiento de los criterios de Amsterdam o Bethesda, o la edad al diagnóstico de CCR e historia familiar de neoplasias asociadas a SL, los resultados obtenidos no reproducen de manera homogénea los descritos en la literatura. Así, el subgrupo de pacientes con SLL con mayor sospecha de origen esporádico (CCR diagnosticado a partir de los 50 años y/o sin antecedentes familiares de neoplasias asociadas a SL), curiosamente es el que más se asemeja a las características histopatológicas clásicamente asociadas a los pacientes con SL.

En contra, en el subgrupo de pacientes con SLL entre los que se estimaba reclutar un mayor porcentaje de casos probablemente hereditarios en base al cumplimiento de los criterios clínicos de Amsterdam o Bethesda se observó una mayor proporción de pacientes con infiltración linfocítica y componente mucinoso. No obstante, también se observó en este subgrupo un mayor porcentaje de infiltración vascular, en contra de lo descrito en las series mencionadas en SL y CCR con IMS.

Por tanto, en este estudio, no se han identificado características histopatológicas que sean de utilidad para discriminar el posible origen del tumor. No obstante, como se mencionaba anteriormente la presencia de infiltración linfocítica o componente mucinoso entre los pacientes que cumplen criterios de Amsterdam o Bethesda, se perfila como posible marcador para seleccionar a los pacientes con características histopatológicas más similares a las presentadas por los pacientes con SL. Sin embargo, sería necesaria ampliar la muestra y definir mejor los criterios

histopatológicos para evaluar el papel de estas características para definir el origen del tumor.

Por tanto, como se comentaba anteriormente estos resultados son similares a los descritos en estudios previos en los que no identificaron características clínico-epidemiológicas o histopatológicas en los pacientes con SLL que fueran de utilidad para diferenciar entre el origen hereditario o esporádico del tumor (127,132,133). No obstante, en el estudio de Win et al (157), se observó un mayor riesgo de CCR para los familiares de primer grado de pacientes con SLL cuando los casos de CCR fueron diagnosticados antes de los 50 años, tenían localización proximal o si dichas neoplasias presentaban cualquiera de los siguientes criterios: margen tumoral expansivo, linfocitos peritumorales, linfocitos infiltrantes en las neoplasias, o CCR sincrónico. Por tanto, es posible que la edad precoz al diagnóstico de CCR, la presencia de antecedentes familiares o personales de neoplasias asociadas a SL y la presencia de las características histopatológicas mencionadas, aumenten la posibilidad de que exista un mecanismo genético responsable de la neoplasia.

Por todo ello, mientras no se establezcan herramientas diagnósticas que permitan determinar con seguridad el origen del tumor, se debería integrar estos resultados en la práctica clínica. Así, sobre todo entre aquellos pacientes con SLL que presenten antecedentes familiares de CCR y/o antecedentes personales de desarrollo de otras neoplasias asociadas a SL, se debería recomendar medidas de vigilancia similares a las establecidas en el SL.

Dada la evidencia actual de la ausencia de valor de los criterios epidemiológicos, clínicos o histopatológicos para establecer claramente la patogenia del tumor en los pacientes con SLL, Hampel et al (115), propusieron que los métodos diagnósticos actuales deberían mejorarse mediante el empleo de secuenciadores de nueva generación. Estos permiten obtener millones de secuencias de ADN a una velocidad sin precedentes y a un coste cada vez más reducido. Esta herramienta diagnóstica, ofrecería, por tanto, un mayor rendimiento en la detección de casos hereditarios y esporádicos cuando no se encuentra mutación en línea germinal. Sin

embargo, el uso de paneles multigen u otros métodos diagnósticos no han sido implementados de manera rutinaria en la mayoría de los centros debido a discrepancias respecto al análisis apropiado sobre mutaciones somáticas y sin la presencia de una metodología uniforme recomendada. Por otra parte, hay que tener en cuenta que la adición del estudio de mutaciones somáticas en los algoritmos diagnósticos del SL no ha sido validada en los estudios de investigación. Además, no se puede excluir la posible relación que pueda existir entre la presencia de mutaciones somáticas y la inactivación germinal de genes todavía desconocidos que puedan estar relacionados con la deficiencia en el sistema MMR (Fig.10), y sólo una aproximación al exoma germinal o una validación mediante un seguimiento clínico a largo plazo, podría finalmente confirmar el comportamiento esporádico de los tumores de pacientes con SLL con mutaciones somáticas. Por todo ello, la mayoría de los casos de SLL permanecen sin clasificar y a estos pacientes y sus familiares se les realiza un seguimiento heterogéneo.

En resumen, encontramos que no existen diferencias significativas clínico-epidemiológicas o histopatológicas que permitan diferenciar a los pacientes con SLL con origen esporádico o hereditario. Estos resultados apoyan que en ausencia de la presencia de datos moleculares o genéticos que nos permitan clasificar el origen del tumor en los pacientes con SLL, debemos realizar seguimiento homogéneo a este grupo de pacientes y sus FPG. Teniendo en cuenta que el riesgo de CCR entre los pacientes con SLL se encuentra entre aquel presentado en el SL y el presentado en el grupo esporádico (114), recomendamos cribado de CCR a los FPG con colonoscopias periódicas. Además, urge la necesidad de llevar a cabo estudios de validación con el objetivo de determinar si la historia familiar o la edad al diagnóstico de CCR podrían ser de ayuda para identificar casos que necesitan protocolos de vigilancia más o menos estrictos. Nuestros hallazgos además apoyan la necesidad de incrementar el estudio en la patogenia de CCR en este grupo de pacientes, que permitan implantar algoritmos de diagnósticos de casos con SLL que determinen el

origen hereditario o esporádico, y establecer así las medidas de vigilancia adecuadas.

6.4. Limitaciones /Fortalezas

Las principales limitaciones de este estudio son:

- La principal limitación de este estudio es precisamente la falta de información molecular respecto el estudio de mutaciones somáticas en los pacientes con SLL.
- El registro de las variables en el momento de la inclusión se realizó de forma retrospectiva.
- La interpretación de la infiltración linfocítica se realizó en base a una evaluación morfológica, en lugar de cuantificación mediante inmunohistoquímica, lo cual puede influir en la posible disparidad entre los centros a la hora de determinar el concepto de infiltración linfocítica.
- En relación a la caracterización clínico-epidemiológica e histopatológica en base a los subgrupos confeccionados, cabe destacar el escaso tamaño muestral en el subgrupo de pacientes con SLL diagnosticados mediante cribado universal y en el subgrupo de SLL con diagnóstico de CCR a una edad igual o superior a 50 años y sin antecedentes familiares de CCR, lo que limita los resultados obtenidos.
- Respecto al análisis del riesgo familiar de desarrollo de cáncer, cabe la posibilidad de sobreestimar o infradiagnosticar casos de tumores entre los familiares, ya que la información relativa a los antecedentes familiares de neoplasias no siempre era confirmada de manera objetiva mediante datos

clínicos e histopatológicos. Sin embargo, esta limitación puede tener un efecto escaso, ya que afectaría por igual a ambos grupos.

- Otra limitación de este estudio es la ausencia de un seguimiento homogéneo en los FPG de pacientes de SLL, entre los distintos centros participantes, pudiendo dar lugar a una menor vigilancia de FPG de pacientes con SLL, frente los familiares de pacientes con SL y podría explicar la presencia de menos casos de neoplasias asociadas a SL incidentes entre los familiares de pacientes con SLL.
- El período de seguimiento es corto. Sería de utilidad períodos de vigilancia más prolongados para establecer la incidencia de este tipo de neoplasias entre los familiares de pacientes de SLL y así definir la estrategia de vigilancia adecuada.

Por otra parte, cabe destacar como principal fortaleza, en primer lugar, que se trata del único estudio que analiza las diferencias clínico-epidemiológicas e histopatológicas del CCR entre pacientes con SLL, en base a diferentes criterios clínicos que seleccionan a estos pacientes entre aquellos con un posible origen hereditario o esporádico. En segundo lugar, cabe destacar el amplio número de pacientes incluidos en el registro nacional de pacientes con SL y SLL y familiares y la actualización periódica de la información relativa a los pacientes y sus familiares. Este enfoque proporciona solidez a nuestros datos en términos de aplicabilidad a la práctica clínica.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- Los criterios clínicos o patológicos no permiten discriminar el posible origen hereditario o esporádico en los pacientes con CCR.

- Los pacientes con SLL tienen características clínicas, demográficas y patológicas homogéneas, independientemente de los antecedentes familiares de CCR.

- Los FPG de los pacientes con SLL presentan un riesgo moderado de desarrollo de CCR y otras neoplasias asociadas a SL, lo que debe ser tenido en cuenta para determinar las medidas de vigilancia convenientes.

- Debemos realizar un seguimiento homogéneo a los pacientes con SLL y sus FPG, hasta disponer de métodos diagnósticos moleculares o genéticos que permitan conocer el mecanismo patogénico del tumor.

- Se recomienda al menos colonoscopia periódica y exploraciones ginecológicas, entre los FPG de los pacientes con SLL, dado el riesgo incrementado de desarrollo de neoplasias asociadas a SL.

- Es necesario aumentar el estudio de la patogénesis de CCR en estos pacientes y disponer de una metodología validada, que integre el estudio de mutaciones somáticas y de paneles genéticos que evalúen la presencia de mutaciones germinales en genes MMR u otros genes no identificados. Esta información debe ser complementada mediante estudios de vigilancia a largo plazo, para confirmar el posible origen esporádico en los casos que lo sugieren.
- Urge la necesidad de llevar a cabo estudios de validación con el objetivo de determinar si la historia familiar o la edad al diagnóstico de CCR podrían ser de ayuda para identificar casos que necesitan protocolos de vigilancia más o menos estrictos.

REFERENCIAS

8. REFERENCIAS:

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
2. *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th, Amin MB (Ed), Springer, New York 2017. p.269.
3. Rossi S, Baili P, Capocaccia R, Caldora M, Carrani E, Minicozzi P, et al. The EURO CARE-5 study on cancer survival in Europe 1999-2007: Database, quality checks and statistical analysis methods. *Eur J Cancer*. 2015 Oct;51(15):2104–19.
4. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993;329(27):1977–81.
5. Estrada RG, Spjut HJ. Hyperplastic polyps of the large bowel. *Am J Surg Pathol*. 1980 Apr;4(2):127–33.
6. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 1990;14(6):524–37.
7. SHINYA H, WOLFF WI. Morphology, Anatomic Distribution and Cancer Potential of Colonic Polyps. *Ann Surg*. 1979 Dec;190(6):679–83.
8. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182-188.
9. O'Brien MJ. Hyperplastic and serrated polyps of the colorectum. *Gastroenterol Clin North Am*. 2007;36(4):947-68.
10. Higuchi T, Sugihara K, Jass JR. Demographic and pathological

- characteristics of serrated polyps of colorectum. *Histopathology*. 2005 Jul;47(1):32–40.
11. Wong JJL, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*. 2007 Jan;56(1):140–8.
 12. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):113–30.
 13. Spring KJ, Zhao ZZ, Karamatic R, Walsh MD, Whitehall VLJ, Pike T, et al. High Prevalence of Sessile Serrated Adenomas With BRAF Mutations: A Prospective Study of Patients Undergoing Colonoscopy. *Gastroenterology*. 2006;131(5):1400–7.
 14. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, et al. BRAF Mutation Is Frequently Present in Sporadic Colorectal Cancer with Methylated hMLH1, but Not in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 1;10(1 I):191–5.
 15. Anderson JC. Pathogenesis and management of serrated polyps: Current status and future directions. *Gut Liver*. 2014 Nov 1;8(6):582–9.
 16. Guarinos C, Sánchez-Fortún C, Rodríguez-Soler M, Pérez-Carbonell L, Egoavil C, Juárez M, et al. Clinical subtypes and molecular characteristics of serrated polyposis syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jun;11(6):705–11.
 17. Minoo P, Moyer MP, Jass JR. Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumourigenesis. *J Pathol*. 2007 Jun;212(2):124–33.
 18. Crockett SD, Nagtegaal ID. Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*. 2019;157(4):949-966.e4.
 19. Jass JR, Sobin LH, Watanabe H. The World Health Organization's histologic

- classification of gastrointestinal tumors. A commentary on the second edition. *Cancer*. 1990 Nov 15;66(10):2162–7.
20. Heitman SJ, Ronksley PE, Hilsden RJ, Manns BJ, Rostom A, Hemmelgarn BR. Prevalence of Adenomas and Colorectal Cancer in Average Risk Individuals: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(12):1272-1278.
 21. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B, et al. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 1990;98(2):371–9.
 22. Costantini M, Sciallero S, Giannini A, Gatteschi B, Rinaldi P, Lanza G, et al. Interobserver agreement in the histologic diagnosis of colorectal polyps: The experience of the multicenter adenoma colorectal study (SMAC). *J Clin Epidemiol*. 2003 Mar 1;56(3):209–14.
 23. Komuta K, Batts K, Jessurun J, Snover D, Garcia-Aguilar J, Rothenberger D, et al. Interobserver variability in the pathological assessment of malignant colorectal polyps. *Br J Surg*. 2004 Nov;91(11):1479–84.
 24. Rex DK, Bond JH, Winawer S, Levin TR, Burt RW, Johnson DA, et al. Quality in the technical performance of colonoscopy and the continuous quality improvement process for colonoscopy: Recommendations of the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(6):1296-1308.
 25. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525–32.
 26. Muto T, Bussey HJR, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*. 1975;36(6):2251–70.

27. Korinek V, Barker N, Morin PJ, Van Wichen D, De Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC(-/-) colon carcinoma. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1784–7.
28. Lamlum H, Papadopoulou A, Ilyas M, Rowan A, Gillet C, Hanby A, et al. APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 29;97(5):2225–8.
29. McLellan EA, Owen RA, Stepniowska KA, Sheffield JP, Lemoine NR. High frequency of K-ras mutations in sporadic colorectal adenomas. *Gut*. 1993;34(3):392–6.
30. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759–67.
31. Boland CR, Sinicrope FA, Brenner DE, Carethers JM. Colorectal cancer prevention and treatment. *Gastroenterology*. 2000;118(2 SUPPL.).
32. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol*. 2001;3(4):433–8.
33. Ahnen DJ. The American College of gastroenterology emily couric lecture the adenoma-carcinoma sequence revisited: Has the era of genetic tailoring finally arrived?. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(2):190-198.
34. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6).
35. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*. 1998;58(15):3455–60.
36. Herman JG, Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349(21):2042-2054.
37. Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, et al. CpG

- island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1376–87.
38. Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2088–100.
 39. Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Spring KJ, Wynter CVA, Walsh MD, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*. 2004;53(8):1137–44.
 40. Jass JR, Baker K, Zlobec I, Higuchi T, Barker M, Buchanan D, et al. Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: Concept of a “fusion” pathway to colorectal cancer. *Histopathology*. 2006 Aug;49(2):121–31.
 41. Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1997 Aug 15;57(16):3370–4.
 42. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997 Mar 1;57(5):808–11.
 43. Aaltonen LA, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen H, Jass JR, Green JS, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res*. 1994 Apr 1;54(7):1645–8.
 44. Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut*. 1998;42(5):673–9.
 45. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2001 Jun 15;91(12):2417–22.

46. Jover, MD R, Alenda, MD C, Poveda, MD M, Peiró, MD G, Aranda, MD FI, Pérez-Mateo, MD M. Defective Mismatch-Repair Colorectal Cancer Clinicopathologic Characteristics and Usefulness of Immunohistochemical Analysis for Diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 2004 Mar 1;122(3):389–94.
47. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and Mismatch Repair Status of 458 Consecutive Colorectal Carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003 Nov;27(11):1393–406.
48. Ogino S, Brahmandam M, Cantor M, Namgyal C, Kawasaki T, Kirkner G, et al. Distinct molecular features of colorectal carcinoma with signet ring cell component and colorectal carcinoma with mucinous component. *Mod Pathol.* 2006 Jan;19(1):59–68.
49. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol.* 2001;158(2):527–35.
50. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000 Jan 13;342(2):69–77.
51. Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg.* 2000 Sep;87(9):1197–202.
52. Gafà R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, et al. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer.* 2000 Nov 15;89(10):2025–37.
53. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993;260(5109):816–9.
54. Feeley KM, Fullard JF, Heneghan MA, Smith T, Maher M, Murphy RP, et al. Microsatellite instability in sporadic colorectal carcinoma is not an indicator of

- prognosis. *J Pathol.* 1999 May;188(1):14–7.
55. Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, et al. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol.* 2001 Dec;159(6):2107–16.
 56. Zhao Y, Hu F, Wang F, Han B, Li D, Li X, et al. Meta-analysis of MSH6 gene mutation frequency in colorectal and endometrial cancers. *J Toxicol Environ Health A.* 2009;72(11–12):690–7.
 57. Moreira L, Balaguer F, Lindor N, De La Chapelle A, Hampel H, Aaltonen LA, et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2012 Oct 17;308(15):1555–65.
 58. Hawkins NJ, Bariol C, Ward RL. The serrated neoplasia pathway. *Pathology.* 2002 Dec;34(6):548–55.
 59. Bessa X, Ballesté B, Andreu M, Castells A, Bellosillo B, Balaguer F, et al. A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008 Feb;6(2):206–14.
 60. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espín E, et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene.* 2005 Jun 2;24(24):3995–8.
 61. Pérez-Carbonell L, Alenda C, Payá A, Castillejo A, Barberá VM, Guillén C, et al. Methylation analysis of MLH1 improves the selection of patients for genetic testing in Lynch syndrome. *J Mol Diagn.* 2010 Jul;12(4):498–504.
 62. Wahlberg S, Liu T, Lindblom P, Lindblom A. Various mutation screening techniques in the DNA mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1. *Genet Test.* 1999;3(3):259–64.

63. Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J cancer*. 2003 Feb 20;103(5):636–41.
64. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5783–8.
65. Lynch HT, De la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(10):919-932.
66. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology*. 2008 Aug;135(2):419–28.
67. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, White DM, Wagner A, Gomez Garcia EB, et al. Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Feb 3;102(3):193–201.
68. Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 1997 Oct;113(4):1146–58.
69. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med*. 2003 Apr 1;138(7):560–70.
70. Lichtenstein P, Holm N V., Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000 Jul 13;343(2):78–85.
71. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2044–58.

72. Armelao F, de Pretis G. Familial colorectal cancer: a review. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 28;20(28):9292–8.
73. Roos VH, Mangas-Sanjuan C, Rodriguez-Gironde M, Medina-Prado L, Steyerberg EW, Bossuyt PMM, et al. Effects of Family History on Relative and Absolute Risks for Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec 1;17(13):2657-2667.e9.
74. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: History, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009;76(1):1-18.
75. Koornstra JJ, Mourits MJ, Sijmons RH, Leliveld AM, Hollema H, Kleibeuker JH. Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome. *Lancet Oncol*. 2009 Apr;10(4):400–8.
76. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*. 1993;71(3):677–85.
77. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer*. 1999 Apr 12;81(2):214–8.
78. Møller P, Seppälä TT, Bernstein I, Holinski-Feder E, Sala P, Gareth Evans D, et al. Cancer risk and survival in path_MMR carriers by gene and gender up to 75 years of age: a report from the Prospective Lynch Syndrome Database. *Gut*. 2018;67(7):1306–16.
79. Piñol V, Castells A, Andreu M, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*. 2005 Apr 27;293(16):1986–94.
80. Vasen HFA, Mecklin JP, Meera Khan P, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*. 1991 May;34(5):424–5.

81. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1453-1456.
82. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(22):5248-5257.
83. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(23):1758-1762.
84. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Feb 18;96(4):261–8.
85. 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 May 5;352(18).
86. Boland CR, Shike M. Report From the Jerusalem Workshop on Lynch Syndrome-Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(7):2197.e1-2197.e7.
87. 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 Nov;103(11):2825–35; quiz 2836.

88. van Lier MGF, Leenen CHM, Wagner A, Ramsoekh D, Dubbink HJ, van den Ouweland AMW, et al. Yield of routine molecular analyses in colorectal cancer patients ≤ 70 years to detect underlying Lynch syndrome. *J Pathol.* 2012 Apr;226(5):764–74.
89. Pérez-Carbonell L, Ruiz-Ponte C, Guarinos C, Alenda C, Payá A, Brea A, et al. Comparison between universal molecular screening for Lynch syndrome and revised Bethesda guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer. *Gut.* 2012 Jun;61(6):865–72.
90. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med.* 2009 Jan;11(1):35–41.
91. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2014 Aug;109(8):1159–79.
92. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW, et al. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol.* 2015 Feb;110(2):223–62; quiz 263.
93. Mvundura M, Grosse SD, Hampel H, Palomaki GE. The cost-effectiveness of genetic testing strategies for Lynch syndrome among newly diagnosed patients with colorectal cancer. *Genet Med.* 2010 Feb;12(2):93–104.
94. Ladabaum U, Wang G, Terdiman J, Blanco A, Kuppermann M, Boland CR, et al. Strategies to identify the Lynch syndrome among patients with colorectal cancer: a cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med.* 2011;155(2):69–79.

95. Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, Hampel HL, Thibodeau SN. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med*. 2009 Jan;11(1):42–65.
96. Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, AktanCollan K, Aaltonen LA, Peltomäki P, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2000;118(5):829–34.
97. Burn J, Gerdes A-M, Macrae F, Mecklin J-P, Moeslein G, Olschwang S, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2011;378(9809):2081-2087.
98. Schmeler KM, Lynch HT, Chen L, Munsell MF, Soliman PT, Clark MB, et al. Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch syndrome. *N Engl J Med*. 2006 Jan 19;354(3):261–9.
99. Rubenstein JH, Enns R, Heidelbaugh J, Barkun A, Clinical Guidelines Committee. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Gastroenterology*. 2015 Sep;149(3):777–82; quiz e16-7.
100. Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut*. 2013 Jun;62(6):812–23.
101. Dove-Edwin I, Boks D, Goff S, Kenter GG, Carpenter R, Vasen HFA, et al. The outcome of endometrial carcinoma surveillance by ultrasound scan in women at risk of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma and familial colorectal carcinoma. *Cancer*. 2002 Mar 15;94(6):1708–12.
102. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ. American Cancer Society Guidelines for

- the Early Detection of Cancer, 2003. *CA Cancer J Clin.* 2003 Jan 1;53(1):27–43.
103. Renkonen-Sinisalo L, Sipponen P, Aarnio M, Julkunen R, Aaltonen LA, Sarna S, et al. No support for endoscopic surveillance for gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37(5):574–7.
104. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MWY, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol.* 2015 Jan 10;33(2):209–17.
105. Renkonen-Sinisalo L, Bützow R, Leminen A, Lehtovirta P, Mecklin JP, Järvinen HJ. Surveillance for endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer.* 2007 Feb 15;120(4):821–4.
106. Guarinos C, Castillejo A, Barberá V-M, Pérez-Carbonell L, Sánchez-Heras A-B, Segura A, et al. EPCAM germ line deletions as causes of Lynch syndrome in Spanish patients. *J Mol Diagn.* 2010 Nov;12(6):765–70.
107. Hitchins M, Williams R, Cheong K, Halani N, Lin VAP, Packham D, et al. MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2005 Nov;129(5):1392–9.
108. van der Klift H, Wijnen J, Wagner A, Verkuilen P, Tops C, Otway R, et al. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer.* 2005 Oct;44(2):123–38.
109. Lin JC, Jeong S, Liang G, Takai D, Fatemi M, Tsai YC, et al. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell.* 2007 Nov;12(5):432–44.

110. Chen J-M. The 10-Mb paracentric inversion of chromosome arm 2p in activating MSH2 and causing hereditary nonpolyposis colorectal cancer: re-annotation and mutational mechanisms. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Jun;47(6):543–5.
111. Rhees J, Arnold M, Boland CR. Inversion of exons 1-7 of the MSH2 gene is a frequent cause of unexplained Lynch syndrome in one local population. *Fam Cancer*. 2014 Jun;13(2):219–25.
112. Morak M, Koehler U, Schackert HK, Steinke V, Royer-Pokora B, Schulmann K, et al. Biallelic MLH1 SNP cDNA expression or constitutional promoter methylation can hide genomic rearrangements causing Lynch syndrome. *J Med Genet*. 2011 Aug;48(8):513–9.
113. Perera S, Mrkonjic M, Rawson JB, Bapat B. Functional effects of the MLH1-93G>A polymorphism on MLH1/EPM2AIP1 promoter activity. *Oncol Rep*. 2011 Mar;25(3):809–15.
114. Rodríguez-Soler M, Pérez-Carbonell L, Guarinos C, Zapater P, Castillejo A, Barberá VM, et al. Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation. *Gastroenterology*. 2013 May;144(5):926-932.e1; quiz e13-4.
115. Hampel H, Pearlman R, Beightol M, Zhao W, Jones D, Frankel WL, et al. Assessment of Tumor Sequencing as a Replacement for Lynch Syndrome Screening and Current Molecular Tests for Patients With Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2018;4(6):806–13.
116. Piñol V, Andreu M, Castells A, Payá A, Bessa X, Rodrigo J, et al. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicentre, prospective, nationwide study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Jan;16(1):39–45.
117. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic

- mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 2002 Dec;123(6):1804–11.
118. Xicola RM, Llor X, Pons E, Castells A, Alenda C, Piñol V, et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Feb 7;99(3):244–52.
119. Benlloch S, Payá A, Alenda C, Bessa X, Andreu M, Jover R, et al. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagn*. 2006 Nov;8(5):540–3.
120. Ou J, Niessen RC, Vonk J, Westers H, Hofstra RMW, Sijmons RH. A database to support the interpretation of human mismatch repair gene variants. *Hum Mutat*. 2008 Nov;29(11):1337–41.
121. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May 8;17(5):405–24.
122. Chirlaque-Lopez MD, Salmeron-Martinez D, Valera-Ninirola I et al. Incidencia de cancer en la Region de Murcia. *Direccion General de Salud Publica, Consejeria de Sanidad de la Region de Murcia*, 2007. *Murciasalud*. Disponible online: <https://www.murciasalud.es>.
123. Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J, Frankel WL, Pearlman R, de la Chapelle A, et al. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology*. 2014 Dec;147(6):1308-1316.e1.
124. Sourrouille I, Coulet F, Lefevre JH, Colas C, Eyries M, Svrcek M, et al. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam Cancer*. 2013 Mar;12(1):27–33.

125. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WAG, Goossens M, Ouchene H, Hendriks-Cornelissen SJB, et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology*. 2014 Mar;146(3):643-646.e8.
126. Geurts-Giele WRR, Leenen CHM, Dubbink HJ, Meijssen IC, Post E, Sleddens HFBM, et al. Somatic aberrations of mismatch repair genes as a cause of microsatellite-unstable cancers. *J Pathol*. 2014 Dec;234(4):548–59.
127. Picó MD, Castillejo A, Murcia Ó, Giner-Calabuig M, Alustiza M, Sánchez A, et al. Clinical and Pathological Characterization of Lynch-Like Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020 Feb;18(2):368-374.e1.
128. Pearlman R, Haraldsdottir S, de la Chapelle A, Jonasson JG, Liyanarachchi S, Frankel WL, et al. Clinical characteristics of patients with colorectal cancer with double somatic mismatch repair mutations compared with Lynch syndrome. *J Med Genet*. 2019 Jul;56(7):462–70.
129. Soc AC Color Cancer FActs Fig 2017-2019 Atlanta Am Cancer Soc 2017.
130. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1).
131. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490-1502.
132. Hemminger JA, Pearlman R, Haraldsdottir S, Knight D, Jonasson JG, Pritchard CC, et al. Histology of colorectal adenocarcinoma with double somatic mismatch-repair mutations is indistinguishable from those caused by Lynch syndrome. *Hum Pathol*. 2018;78:125–30.
133. Mas-Moya J, Dudley B, Brand RE, Thull D, Bahary N, Nikiforova MN, et al. Clinicopathological comparison of colorectal and endometrial carcinomas in patients with Lynch-like syndrome versus patients with Lynch syndrome. *Hum Pathol*. 2015 Nov;46(11):1616–25.

134. Castillejo A, Vargas G, Castillejo MI, Navarro M, Barberá VM, González S, et al. Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. *Eur J Cancer*. 2014;50(13):2241–50.
135. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, et al. Prevalence and spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations among patients with early-onset colorectal cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(4):464–71.
136. Morak M, Heidenreich B, Keller G, Hampel H, Laner A, De La Chapelle A, et al. Biallelic MUTYH mutations can mimic Lynch syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2014 Nov 5;22(11):1334–7.
137. Møller P, Seppälä T, Bernstein I, Holinski-Feder E, Sala P, Evans DG, et al. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database. *Gut*. 2017 Mar 1;66(3):464–72.
138. Møller P, Seppälä T, Bernstein I, Holinski-Feder E, Sala P, Evans DG, et al. Incidence of and survival after subsequent cancers in carriers of pathogenic MMR variants with previous cancer: a report from the prospective Lynch syndrome database. *Gut*. 2017 Sep 1;66(9):1657–64.
139. Plaschke J, Engel C, Krüger S, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Mangold E, et al. Lower incidence of colorectal cancer and later age of disease onset in 27 families with pathogenic MSH6 germline mutations compared with families with MLH1 or MSH2 mutations: The German hereditary nonpolyposis colorectal cancer consortium. *J Clin Oncol*. 2004;22(22):4486–94.
140. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA*. 2011 Jun 8;305(22):2304–10.
141. Kastrinos F, Stoffel EM, Balmaña J, Steyerberg EW, Mercado R, Syngal S.

- Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Aug;17(8):2044–51.
142. Bessa X, Alenda C, Paya A, Álvarez C, Iglesias M, Seoane A, et al. Validation microsatellite path score in a population-based cohort of patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Sep 1;29(25):3374–80.
143. Jenkins MA, Hayashi S, O’Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, et al. Pathology Features in Bethesda Guidelines Predict Colorectal Cancer Microsatellite Instability: A Population-Based Study. *Gastroenterology.* 2007;133(1):48–56.
144. Kastrinos F, Steyerberg EW, Mercado R, Balmaña J, Holter S, Gallinger S, et al. The PREMM1,2,6 model predicts risk of MLH1, MSH2, and MSH6 germline mutations based on cancer history. *Gastroenterology.* 2011;140(1):73-81.e5.
145. Chen S, Wang W, Lee S, Nafa K, Lee J, Romans K, et al. Prediction of germline mutations and cancer risk in the lynch syndrome. *J Am Med Assoc.* 2006 Sep 27;296(12):1479–87.
146. Hyde A, Fontaine D, Stuckless S, Green R, Pollett A, Simms M, et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol.* 2010 Dec;34(12):1820–9.
147. Hartman DJ, Brand RE, Hu H, Bahary N, Dudley B, Chiosea SI, et al. Lynch syndrome-associated colorectal carcinoma: Frequent involvement of the left colon and rectum and late-onset presentation supports a universal screening approach. *Hum Pathol.* 2013 Nov;44(11):2518–28.
148. Lin KM, Shashidharan M, Ternent CA, Thorson AG, Blatchford GJ, Christensen MA, et al. Colorectal and extracolonic cancer variations in MLH1/MSH2 hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds and the general population. *Dis Colon Rectum.* 1998 Apr;41(4):428–33.

149. Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, et al. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology*. 1996 Aug;111(2):307–17.
150. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1787–90.
151. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Mar 15;58(6):1130–4.
152. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. 1995;268(5215):1336–8.
153. Sundblad AS, Paz RA. Mucinous carcinomas of the colon and rectum and their relation to polyps. *Cancer*. 1982;50(11):2504-2509.
154. Symonds DA, Vickery AL. Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer*. 1976;37(4):1891-1900.
155. Umpleby HC, Ranson DL, Williamson RCN. Peculiarities of mucinous colorectal carcinoma. *Br J Surg*. 1985;72(9):715–8.
156. Enríquez JM, Díez M, Tobaruela E, Lozano O, Domínguez P, González A et al. Clinical, Histopathological, Cytogenetic and Prognostic Differences Between Mucinous and Nonmucinous Colorectal Adenocarcinomas. *Rev Esp Enferm Dig*. 1998 Aug;90(8):563-72.
157. Win AK, Buchanan DD, Rosty C, et al. Role of tumour molecular and pathology features to estimate colorectal cancer risk for first-degree relatives. *Gut*. 2015;64(1):101-110.
158. Katz LH, Burton-Chase AM, Advani S, Fellman B, Polivka KM, Yuan Y, et al.

- Screening adherence and cancer risk perceptions in colorectal cancer survivors with Lynch-like syndrome. *Clin Genet*. 2016 Mar 1;89(3):392–8.
159. Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J, Leggett BA. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *Eur J Cancer*. 2002;38(7):858–66.
160. Shia J, Ellis NA, Paty PB, Nash GM, Qin J, Offit K, et al. Value of Histopathology in Predicting Microsatellite Instability in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and Sporadic Colorectal Cancer. *Am J Surg Pathol*. 2003 Nov;27(11):1407–17.
161. Yearsley M, Hampel H, Lehman A, Nakagawa H, de la Chapelle A, Frankel WL. Histologic features distinguish microsatellite-high from microsatellite-low and microsatellite-stable colorectal carcinomas, but do not differentiate germline mutations from methylation of the MLH1 promoter. *Hum Pathol*. 2006 Jul;37(7):831–8.
162. Pai RK, Pai RK. A practical approach to the evaluation of gastrointestinal tract carcinomas for lynch syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(4):e17–34.

ANEXO I

ANEXO 1

Investigadores que han participado en el proyecto EPICOLON

Coordinadores del proyecto EPICOLON: Montserrat Andreu y Antoni Castells

Coordinadores del proyecto EPICOLON II: Xavier Llor, Rodrigo Jover, Montserrat Andreu, Antoni Castells y Ángel Carracedo (CeGen)

Participantes en el proyecto EPICOLON:

- Hospital 12 de Octubre, Madrid: Juan Diego Morillas (coordinador local), Inmaculada Salces, Raquel Muñoz, Marisa Manzano, Francisco Colina, Jose Díaz, Carolina Ibarrola, Guadalupe López, Alberto Ibáñez
- Hospital Clínic, Barcelona: Antoni Castells (coordinador local), Ariadna Sánchez, Virginia Piñol, Sergi Castellví-Bel, Francisco Rodríguez-Moranta, Francesc Balaguer, Antonio Soriano, Rosa Cuadrado, Maria Pellisé, Leticia Moreira, Rosa Miquel, J. Ignasi Elizalde, Josep M. Piqué.
- Hospital Clínico Universitario, Zaragoza: Ángel Lanas (coordinador local), Javier Alcedo, Javier Ortego
- Hospital Comarcal de l'Alt Penedès, Vilafranca del Penedès: Mercedes Martínez (coordinador local)
- Hospital Cristal Piñor, Complejo Hospitalario de Ourense: Joaquín Cubiella (coordinador local), Laura Rivas, M. Soledad Díez, Mercedes Salgado, Eloy Sánchez, Mariano Vega
- Hospital del Mar, Barcelona: Montserrat Andreu (coordinador local), Xavier Bessa, Cristina Alvarez-Urturi, Agustín Panadés, Asumpta Munné, Felipe Bory, Miguel Nieto, Agustín Seoane
- Hospital Donosti, San Sebastián: Luis Bujanda (coordinador local), Juan Ignacio Arenas, Isabel Montalvo, Julio Torrado, Ángel Cosme
- Hospital General Universitario de Alicante: Artemio Payá (coordinador local), Rodrigo Jover, Óscar Murcia, Mar Giner-Calabuig, Miren Alustiza, Cristina Alenda, Pedro Zapater.

- Hospital General Universitario de Elche: M^a Dolores Picó (coordinadora local), Ana Beatriz Sánchez-Heras, Adela Castillejo, Jose-Luis Soto, Víctor Barberá, Francisco Javier Lacueva.
- Hospital General de Granollers: Joaquim Rigau (coordinador local), Ángel Serrano, Anna Giménez
- Hospital General de Vic: Joan Saló (coordinador local), Eduard Batiste-Alentorn, Josefina Autonell, Ramon Barniol
- Hospital General Universitario de Guadalajara: Ana María García (coordinador local), Fernando Carballo, Antonio Bienvenido, Eduardo Sanz, Fernando González, Jaime Sánchez
- Hospital General Universitario de Valencia: Enrique Medina (coordinador local), Jaime Cuquerella, Pilar Canelles, Miguel Martorell, José Ángel García, Francisco Quiles, Elisa Orti
- Hospital do Meixoeiro, Vigo: Juan Clofent (coordinador local), Jaime Seoane, Antoni Tardío, Eugenia Sánchez
- Hospital Álvaro Cunqueiro de Vigo: Lucia Cid
- Hospital Donostia/Instituto Biodonostia. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Universidad del País Vasco (UPV/EHU). San Sebastián, Spain: Luis Bujanda (coordinador local)
- Hospital de l'Esperit Sant, Santa Coloma de Gramenet: Cristina Martín (coordinador local), Llúcia Titó, Sergio Ledesma, Miquel Torres
- Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona: Xavier Llor (coordinador local), Rosa M. Xicola, Marta Piñol, Mercè Rosinach, Anna Roca, Elisenda Pons, José M. Hernández, Miquel A. Gassull
- Hospital San Agustín, Avilés: José María Duque (coordinador local), Isabel García, Juan de la Vega, Manuel Crespo

- Hospital Universitari Mútua de Terrassa: Fernando Fernández-Bañares (coordinador local), Josep M. Viver, Antonio Salas, Jorge Espinós, Montserrat Forné, Maria Esteve
- Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell. Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa: Gemma Llorc, Carmen Yagüe
- Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida: Josep M. Reñé (coordinador local), Carmen Piñol, Juan Buenestado, Joan Viñas
- Hospital Universitario de Canarias: Enrique Quintero (coordinador local), Marta Carrillo-Palau, David Nicolás, Adolfo Parra, Antonio Martín
- Hospital Universitario La Fe, Valencia: Lidia Argüello (coordinador local), Marta Ponce, Vicente Pons, Virginia Pertejo, Teresa Sala
- Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba: Antonio Naranjo (coordinador local), María del Valle García, Patricia López, Fernando López, Rosa Ortega, Javier Briceño, Javier Padillo
- Fundació Hospital Son Llàtzer, Palma de Mallorca: Catalina Garau, Àngels Vilella (coordinador local), Carlos Dolz, Hernan Andreu
- Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla: Marta Garzon, Angeles Pizarro, Carmen Cordero (coordinador local), Carmen Reyes, Francisco José García, Álvaro Giráldez, Fernando Jiménez
- Institut Universitari Dexeus, Barcelona: María del Carmen Peña (coordinador local), Javier Nebreda, Antonio Juan-Creix, Javier Juan-Creix, Enrique Vidal, Ferran Gomá
- Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona: Teresa Ramon y Cajal, Alexandra Gisbert-Beamud
- Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona: Adriá López-Fernández, Judith Balmaña
- Hospital Universitario de Móstoles: Daniel Rodríguez-Alcalde
- Clínica Universitaria de Navarra: Maite Herraiz
- Hospital clínico de San Carlos, Madrid: Carmen Povés

- Hospital Santos Reyes, Aranda del Duero, Spain: Luís Hernández-Villalba

ADENDA:

ARTICULOS PUBLICADOS

Title: Clinical and Pathological Characterization of Lynch-Like Syndrome

Short title: Characterization of Lynch-Like Syndrome

AUTHORS:

Maria Dolores Picó (1); Adela Castillejo (2), Óscar Murcia (3); Mar Giner-Calabuig (3); Miren Alustiza (3); Ariadna Sánchez (4); Leticia Moreira (4); María Pellise (4); Antoni Castells (4), Marta Carrillo-Palau (5); Teresa Ramon y Cajal (6); Alexandra Gisbert-Beamud (6); Gemma Llort (7); Carmen Yagüe (7); Adriá López-Fernández (8); Cristina Alvarez-Urturi (9); Joaquin Cubiella (10); Laura Rivas (10); Daniel Rodríguez-Alcalde (11); Maite Herraiz (12); Catalina Garau (13); Carlos Dolz (13); Luis Bujanda (14); Lucia Cid (15); Carmen Povés (16); Marta Garzon (17); Inmaculada Salces (18); Marta Ponce (19); Luís Hernández-Villalba (20); Cristina Alenda (21), Francesc Balaguer (4), Jose-Luis Soto (2), Rodrigo Jover (3)

INSTITUTIONS:

1. Servicio de Medicina Digestiva, Hospital General Universitario de Elche, Elche, Alicante, Spain.
2. Unidad de Genética Molecular, Hospital General Universitario de Elche, Alicante, Spain.
3. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital General Universitario de Alicante, Instituto de Investigación Sanitaria ISABIAL. Alicante, Spain.
4. Unidad de gastroenterología, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, University of Barcelona, Barcelona, Spain.
5. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain.
6. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.
7. Servicio de Oncología Médica. Parc Taulí, Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell. Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa. Barcelona, Spain.
8. Unidad de Alto Riesgo y Prevención del Cáncer. Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.
9. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital del Mar, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain.
10. Departamento de gastroenterología, Complejo Hospitalario Universitario de Ourense, Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, CIBERehd, Ourense, Spain.

11. Sección de Aparato Digestivo. Hospital Universitario de Móstoles, Móstoles, Spain.
12. Departamento de Digestivo. Clínica Universitaria de Navarra, Navarra, Spain.
13. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital de Son Llàtzer, Palma de Mallorca, Spain
14. Hospital Donostia/Instituto Biodonostia. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Universidad del País Vasco (UPV/EHU). San Sebastián, Spain.
15. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital Álvaro Cunqueiro de Vigo, Vigo, Spain.
16. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital clínico de San Carlos, Madrid, Spain.
17. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.
18. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain.
19. Servicio de Medicina Digestiva. Hospital Universitari i Politècnic de la Fe, Valencia, Spain.
20. Sección de Aparato Digestivo. Hospital Santos Reyes, Aranda del Duero, Spain.
21. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital General Universitario de Alicante

Contributors: Study concept, design and drafting of the manuscript: MDP, AC, JLS, RJ. Acquisition of data: MDP, AC, OM, MG, MA, AS, LM, MP, AC, MCP, TRC, AGB, GL, CY, ALF, CAV, JC, LR, DRA, MH, CG, CD, LB, LC, CP, MG, IS, MP, LHV, CA, FB, JLS, RJ. Analysis, interpretation of data and statistical analysis: MDP, RJ. Critical revision of the article for important intellectual content and final approval of the article: all authors.

Word count: 2,692

Abstract word count: 311

Abbreviations used in this paper: LS, Lynch syndrome; LLS, Lynch-like syndrome; CRC, colorectal cancer; MMR, mismatch repair; MSI, microsatellite instability; IHC, immunohistochemistry; PCR, polymerase chain reaction.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Funding details: This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI08/0726, INT-09/208, PI11/2630, INT-12-078, INT13-196, PI14/01386, PI17/01756), Fundación de Investigación Biomédica de la Comunidad Valenciana– Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante Foundation (UGP-14-120, UGP-13-221, UGP-14-265), and the Asociación Española Contra el Cáncer (Fundación Científica GCB13131592CAST). Mar Giner-Calabuig received a predoctoral grant from Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana (VALi+d. EXP ACIF/2010/018, ACIF/2016/002). Miren Alustiza received a predoctoral grant from Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante ISABIAL. Oscar Murcia received a grant Rio-Hortega from Instituto de Salud Carlos III. Asociación para la Investigación en Gastroenterología de la Provincia de Alicante (AIGPA), a private association that promotes research in gastrointestinal diseases in Alicante, also supported the logistic aspects of the study, but declares no conflict of interest.

Abstract:

Background & Aims: Lynch syndrome is characterized by DNA mismatch repair (MMR) deficiency. Some patients with suspected Lynch syndrome have DNA MMR

deficiencies but no detectable mutations in genes that encode MMR proteins—this is called Lynch-like syndrome (LLS). There is no consensus on management of patients with LLS. We collected data from a large series of patients with LLS to identify clinical and pathology features.

Methods: We collected data from a nationwide-registry of patients with colorectal cancer (CRC) in Spain. We identified patients whose colorectal tumors had loss of MSH2, MSH6, PMS2, or MLH1 (based on immunohistochemistry), without the mutation encoding V600E in *BRAF* (detected by real-time PCR), and/or no methylation at *MLH1* (determined by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification), and no pathogenic mutations in MMR genes, *BRAF*, or *EPCAM* (determined by DNA sequencing). These patients were considered to have LLS. We collected data on demographic, clinical, and pathology features and family history of neoplasms. The χ^2 test was used to analyze the association between qualitative variables, followed by the Fisher exact test and the Student t test or the Mann-Whitney test for quantitative variables.

Results: We identified 160 patients with LLS; their mean age at diagnosis of CRC was 55 years and 66 patients were female (41%). The Amsterdam I and II criteria for Lynch syndrome were fulfilled by 11% of cases and the revised Bethesda guideline criteria by 65% of cases. Of the patients with LLS, 24% were identified in universal screening. There were no proportional differences in sex, indication for colonoscopy, immunohistochemistry, pathology findings, or personal history of

CRC or other Lynch syndrome-related tumors between patients who met the Amsterdam and/or Bethesda criteria for Lynch syndrome and patients identified in universal screening for Lynch syndrome, without a family history of CRC.

Conclusions: Patients with LLS have homogeneous clinical, demographic, and pathology characteristics, regardless of family history of CRC.

KEY WORDS: familial, colon tumor, risk, genetic, polyp

Background & Aims

Lynch syndrome (LS) is the most frequent cause of hereditary colorectal cancer (CRC). It is mainly characterized by a high risk of developing CRC and endometrial cancer, as well as other neoplasms, namely of the ovaries, urinary tract, stomach, small intestine, pancreas, biliary tract, skin, and brain.¹⁻³ LS is caused by germline mutations in one of the DNA mismatch repair (MMR) genes.⁴ The inactivation of these genes increases the rate of mutations during DNA synthesis, with an increase in structural anomalies that tend to appear in repetitive DNA sequences. This characteristic is called microsatellite instability (MSI) and is observed in more than 95% of tumors in patients with CRC or other tumors associated with LS.⁵ The presence of MSI suggests a defect in the MMR genes; however, its specificity is low because it also occurs in approximately 15% of sporadic CRC cases, usually due to hypermethylation of the promoter region of the *MLH1* gene in the tumor

tissue.⁶ Immunohistochemistry (IHC) with antibodies against MMR proteins can be useful to identify MMR if there is loss of expression of these proteins.⁷

However, in an increasing number of cases, the presence of MSI or loss of immunochemical expression of MMR genes is found, but the presence of germline pathogenic mutations in these genes could not be found. These patients are considered to have "probably non-sporadic" MMR-defective CRC or Lynch-like syndrome (LLS), which represents approximately 30% of all patients with unstable tumors.⁸ A previous study from our group showed that these cases and their first degree relatives show a risk of CRC that is in between that found in relatives of LS patients and sporadic cases. This result suggests that these LLS patients are probably a heterogeneous group that includes patients with an unidentified hereditary syndrome, as well as sporadic cases. Testing for somatic mutations in MMR genes has been proposed for differential diagnosis between hereditary and sporadic cases; however, this testing is not widely performed and there is no consensus about management of LLS cases or follow-up of patients and their relatives.^{9, 10}

The aim of this study was to describe the clinical and pathological features of a large nation-wide series of LLS patients, and to analyze whether patients with a suspected hereditary or sporadic origin show any different clinical or pathological characteristics.

Methods

Patient Data

Data were extracted from a descriptive, observational, multicenter, nationwide registry (EPICOLON-III) on familial CRC, involving 25 Spanish hospitals. Patients with CRC were included when their tumors showed immunohistochemical loss of MSH2, MSH6, PMS2, or loss of MLH1 with BRAF-wild type and/or no *MLH1* methylation, and in whom germline mutations could not be found in these genes or in *EPCAM*. Immunohistochemical study of the tumors was performed because of fulfillment of Amsterdam criteria and/or revised Bethesda Guidelines,¹¹ or because of universal molecular screening for LS.¹² In these cases, the fulfillment of Amsterdam criteria and/or revised Bethesda Guidelines was also reviewed. Patients were investigated according to common protocols¹³ and in all cases the family history was collected through the realization of pedigrees that included at least one generation backward and forward to the index case.

These patients were included in the national registry EPICOLON-III (www.epicolon.es); demographic, clinical, and pathological variables were registered, as well as family history of neoplasms.

MSI, IHC Staining, and Detection of Germline Mutations

MSI and/or IHC analysis was performed in all patients. Although IHC was not performed for 6 patients, we confirmed their inclusion because of the presence

of high MSI. MSI status was analyzed using multiplex polymerase chain reaction (PCR) patterns at the following monomorphic repetitive markers: BAT26, BAT25, NR21, NR24m and NR27.^{14, 15} Amplicon detection and analysis were performed using an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, and Genotyper software (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), respectively. A diagnosis of MSI was considered positive when two or more markers showed an altered pattern. IHC analysis of MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 was performed in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue, as previously described.¹⁶

In patients with a loss of MLH1, methylation of *MLH1* and/or somatic *BRAF* mutation status was analyzed. *MLH1* methylation analysis was performed using methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) according to the manufacturer's protocol using the SALSA MS-MLPA Kit ME011 Mismatch Repair Genes (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).¹⁷ The V600E *BRAF* mutation was detected using specific TaqMan probes in real-time PCR (ABI Prism 7500; Applied Biosystems, Foster City, CA) and allelic discrimination software as described previously.¹⁸

Germline mutation analysis was performed in accordance with the results of IHC analysis as described previously.⁸ Patients with loss of MSH2 expression with no detected mutation were analyzed for *EPCAM* rearrangements using MLPA according to the manufacturer's recommended protocol. DNA sequencing was performed to characterize the deletion breakpoints.¹⁹ Large rearrangements (deletions and insertions) were tested using MLPA according to the manufacturer's

protocol. The results of genetic analysis were interpreted based on the ACMG Recommendations for Standards for Interpretation of Sequence Variations (2000) and the InSIGHT database.²⁰

Statistical Analysis

The statistical analysis was carried out using the SPSS program (SPSS 19.0, Chicago, IL, USA). Regarding the descriptive analysis, the qualitative variables are presented as percentages. Continuous quantitative variables are described as the mean and standard deviation or the median and interquartile range, depending on whether or not they follow a normal distribution. The χ^2 test was used to analyze the association between qualitative variables, followed by Fisher exact test and the Student t test or the Mann-Whitney test for quantitative variables, according to whether or not the variables followed a normal distribution. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

We included 160 patients diagnosed with CRC who met the diagnostic criteria for LLS. The characteristics of patients with LLS are shown in **Table 1**. Mean age at diagnosis of CRC was 54.9 years (SD 14.2) and 53 patients (33%) were younger than 50 years old at diagnosis; 41.2% of patients were female. The majority of cases were diagnosed because of symptoms (87.4%). The most frequent IHC finding was lack of MLH1/PMS2 expression in 50% of cases, followed by lack of

MSH2/MSH6 expression (27.9%). Isolated loss of MSH6 (13%) or PMS2 (9.1%) was less frequent. Regarding family history, 64.4% of cases fulfilled revised Bethesda guidelines and 11.2% fulfilled Amsterdam criteria for LS diagnosis. Fifty percent of patients reported any family history of CRC, and 38.7% reported a family history of another LS-related cancer. In 24.4% of cases, IHC of MMR proteins was performed in the context of universal LS screening. Five patients (3.1%) developed a second CRC within a median of 7 years (SD 3.9 years), 16.8% had a previous history of non-CRC tumors, and 3.1% had a previous history of other non-CRC LS-related neoplasms.

With the aim of identifying whether there was any difference between LLS patients with suspected hereditary origin and those with probable sporadic origin, an analysis was performed comparing LLS patients who met the Amsterdam and/or Bethesda criteria with those who did not meet these criteria and in whom the diagnosis was made due to the realization of universal screening for LS diagnosis. The only differences we found were related to the definition of cases, with a mean age at CRC diagnosis of 65.5 years (SD 10.1) in patients diagnosed by universal screening versus 51.6 years (SD 13.7) in patients who fulfilled Amsterdam and/or Bethesda criteria ($p = 0.02$). Additionally, 57% of patients that met Amsterdam and/or Bethesda criteria reported a family history of CRC, versus 28% of patients identified through universal LS screening ($p < 0.001$). No statistical differences were observed between the two groups with respect to sex, indication for colonoscopy, IHC findings, tumor characteristics (location, size, TNM stage,

pathology), personal history of CRC or other LS-associated cancer, or family history of non-colorectal cancer associated with LS (**Table 2**).

A second analysis compared patient characteristics based on their age at CRC diagnosis (<50 years of age) and/or the presence of a family history of tumors associated with LS versus those patients with diagnosis of CRC at ≥50 years of age and lack of family history of LS-associated tumors. This analysis also did not reveal any significant differences between the two groups regarding sex, vital status, indication for colonoscopy, IHC, tumor characteristics (location, size, TNM stage, histology), or personal history of CRC or other LS-associated cancer (**Table 3**). Also here, the only differences found were related to the selection criteria.

DISCUSSION

In this study, which includes the largest published cohort of patients with LLS, we describe clinical and pathological characteristics of these patients. We found that cases with suspected hereditary origin due to family history, young age at diagnosis, and/or fulfillment of Amsterdam or Bethesda criteria are similar to cases with suspected sporadic origin with respect to clinical, molecular, and pathological characteristics. These results support that, in the absence of a molecular marker able to differentiate both groups, these patients should be managed homogeneously.

The implementation of universal LS screening has led to an increase in the percentage of tumors that exhibit MSI or loss of expression of the MMR proteins, but lack any germline pathogenic mutation or other cause of MMR deficiency.⁸ This

situation, called LLS or MMR tumors of unknown origin, is associated with uncertainty regarding preventive management of patients and their relatives, because there is no consensus about whether it should be considered a likely hereditary or sporadic condition. There are different mechanisms that may cause this phenotype (**Figure 1**). The first potential cause is the presence of atypical germline alterations in MMR genes (regulatory regions, inversions, or translocations), or cryptic mutations (not detected with current methods) that could provoke somatic alteration of the remaining MMR allele. This group of patients actually have unidentified LS. Another possible cause is the presence of germline alterations in other genes (e.g., *MUTYH*, *POLD1*, *POLE*) that could also alter the MMR system. Finally, we can also observe sporadic tumors with biallelic MMR alterations secondary to somatic alterations in cancer genes (tumor suppressor genes, oncogenes, repair genes), somatic biallelic alterations in MMR genes, or a combination of both findings.

Clinically, patients with LLS are probably represented by at least two different subsets. The first group includes cases in which the clinical characteristics strongly suggest a hereditary origin, but in which the genetic defect has not yet been identified through routine protocols. These patients probably have an undiagnosed hereditary condition with high risk of CRC for them and their first-degree relatives. The second subset includes a significant proportion of families with LLS who do not have a history of cancer and for whom the only element leading to suspicion of LS is the presence of MSI or the loss of expression of some of the MMR proteins. In this latter group, a double somatic mutation in MMR genes is probably the

underlying cause of the MSI phenotype. This second group of patients has sporadic tumors and specific preventive measures are not necessary for them or their relatives.

It has been proposed that current LS diagnostic strategy should be complemented with algorithms that integrate other molecular data from the tumors, allowing differential diagnosis between LLS cases of sporadic versus hereditary origin.²¹ In that sense, different authors have proposed the investigation of somatic mutations in MMR genes and other genes that might explain sporadic CRC cases with LLS. Preliminary studies found a frequency of somatic mutations in LLS patients that ranges between 22%-69%²²⁻²⁴.

Studies that used these somatic mutations to classify LLS patients as hereditary or sporadic also did not find any clinical or pathological characteristics that were able to differentiate between the two populations. In a recently published study by Hemminger et al.,²⁵ the presence of double somatic mutation in the MMR was observed in 69% of patients with unexplained MMR deficiency who lacked MLH1 methylation and germline mutation. They analyzed whether histomorphology could distinguish patients with double somatic mutations from those with LS, but no significant differences in histologic features were found between tumors in LS patients and tumors with double somatic mutations. This similar tumor histology might be secondary to a similar underlying oncogenesis involving defective MMR function, leading to a hypermutated phenotype. Also, in a previous study, Mas-Moya et al.²⁶ compared clinicopathological differences in CRCs between patients

with LS and a group of 21 patients with LLS. Curiously, they found a higher percentage of CRC in the right colon in LLS patients than in LS patients (93% versus 45%; $P < 0.002$); however, there were no significant differences related to tumor stage, tumor grade, tumor size, tumor-infiltrating lymphocytes, Crohn-like lymphocytic reaction, mucinous differentiation, signet ring cell differentiation, or medullary differentiation. Finally, Hampel et al.²¹ proposed that current LS diagnostic strategy should be improved with universal up-front tumor sequencing, obtaining better performance in the detection of LS cases and differentiation between hereditary and sporadic cases when no germline mutation is found.

However, the use of multigene panel testing or other tools for diagnosis has not yet been routinely implemented in the majority of centers due to discrepancies about the appropriate somatic gene analysis, with no specific methodology uniformly recommended. Also, the high cost of this approach, the need of next-generation sequencing technology, and the difficulties of applying this technology in paraffin samples are barriers to the implementation of this diagnostic tool for the adequate classification of LLS patients as sporadic or likely hereditary cases. Moreover, the addition of somatic mutations to the diagnostic algorithm of LS has not yet been validated in research studies. Finally, a relationship between these somatic mutations and germline inactivation of still unknown genes related to MMR deficiency has not yet been fully ruled out (**Figure1**), and only a germline exome approach or a clinical follow-up validation could finally confirm the sporadic behavior of these LLS tumors with somatic mutations. For these reasons, the

majority of LLS cases remain unclassified and patients and their relatives are followed heterogeneously. If we consider LLS patients as a group, the risk of CRC in patients and their first-degree relatives lies between the risk found in LS syndrome and the risk of sporadic CRC; the incidence of CRC is significantly lower in families of patients with LLS than in families with confirmed LS, but is higher than in families with sporadic CRC,¹⁰ and because of that, some preventive measures should be guaranteed in this population.

The main limitation of this study is precisely the lack of molecular information about somatic mutations in the LLS cases; however, we would like to perform a clinical description of these cases pointing out the difficulties of classifying them based only on clinical characteristics. Our study underlines the lack of value of clinical criteria for classification of this heterogeneous group of patients. Moreover, as previously noted, there is not a validated methodology for detecting true somatic mutations and some consensus between experts is needed in order to adequately classify these cases as truly sporadic or probably hereditary. In contrast, the main strength of our study is the large number of patients included in a nationwide registry of hereditary CRC cases, which allows adequate and uniform classification of cases and the possibility of establishing cohort studies that will provide more information about this subset of patients.

In summary, we found that there are no clinical or pathological features differentiating tumors with a suspected hereditary or sporadic origin. These data support that, in the absence of any molecular or genetic tool to assist in the

classification of this group of patients, we should consider them a homogeneous group, applying preventive measures with periodic colonoscopies for patients and their relatives. Given that, as a group, the risk of CRC in first-degree relatives of patients with LLS is in between of that found in LS and sporadic cases¹⁰, we can recommend screening for first-degree relatives, at least in the limit of that recommended for LS, with colonoscopy every 3 years. Moreover, validation studies should be approved that aim to determine whether family history or age at CRC diagnosis might be helpful for identifying cases needing a more or less intensive surveillance protocol. Our findings also support the need to increase the study of CRC pathogenesis in these patients, as well as the appropriate way to identify cases as truly hereditary or sporadic.

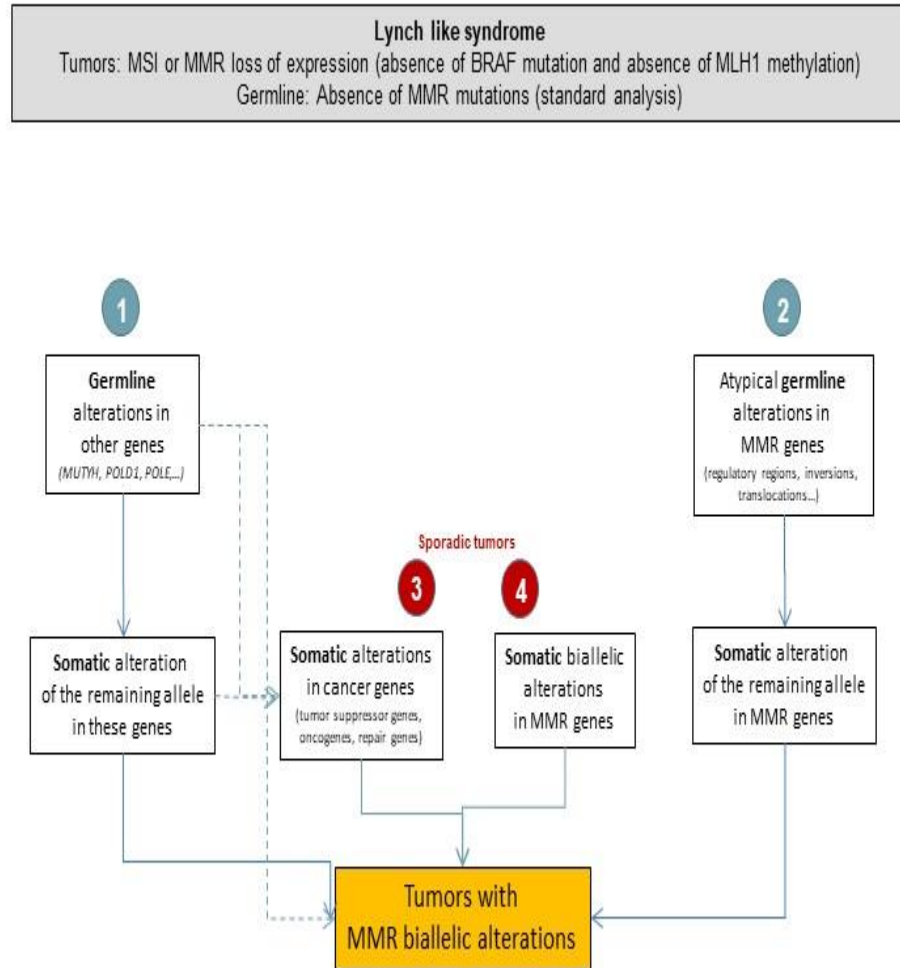


Figure 1. Potential mechanisms for Lynch-like syndrome

REFERENCES

1. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81:214-8.
2. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-32.
3. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:677-85.
4. Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* 2011;305:2304-10.
5. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994;54:1645-8.
6. Wheeler JM, Bodmer WF, Mortensen NJ. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut* 2000;47:148-53.
7. Pinol 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;293:1986-94.
8. Perez-Carbonell L, Ruiz-Ponte C, Guarinos C, et al. Comparison between universal molecular screening for Lynch syndrome and revised Bethesda

guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer.

Gut 2012;61:865-72.

9. Lynch HT, Boland CR, Rodriguez-Bigas MA, et al. Who should be sent for genetic testing in hereditary colorectal cancer syndromes? J Clin Oncol 2007;25:3534-42.

10. Rodriguez-Soler M, Perez-Carbonell L, Guarinos C, et al. Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation. Gastroenterology 2013;144:926-932 e1; quiz e13-4.

11. 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;96:261-8.

12. Boland CR, Shike M. Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Gastroenterology 2010;138:2197 e1-7.

13. Andreu García M, Marzo M, Mascort J, et al. Prevention of colorectal cancer. Gastroenterol Hepatol 2009;32:137-9.

14. Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. Gastroenterology 2002;123:1804-11.

15. Xicola RM, Llor X, Pons E, et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. J Natl Cancer Inst 2007;99:244-52.

16. Jover R, Paya A, Alenda C, et al. Defective mismatch-repair colorectal cancer: clinicopathologic characteristics and usefulness of immunohistochemical analysis for diagnosis. *Am J Clin Pathol* 2004;122:389-94.
17. Perez-Carbonell L, Alenda C, Paya A, et al. Methylation analysis of MLH1 improves the selection of patients for genetic testing in Lynch syndrome. *J Mol Diagn* 2010;12:498-504.
18. Benlloch S, Paya A, Alenda C, et al. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagn* 2006;8:540-3.
19. van der Klift H, Wijnen J, Wagner A, et al. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005;44:123-38.
20. Ou J, Niessen RC, Vonk J, et al. A database to support the interpretation of human mismatch repair gene variants. *Hum Mutat* 2008;29:1337-41.
21. Hampel H, Pearlman R, Beightol M, et al. Assessment of Tumor Sequencing as a Replacement for Lynch Syndrome Screening and Current Molecular Tests for Patients With Colorectal Cancer. *JAMA Oncol* 2018;4:806-813.
22. Sourrouille I, Coulet F, Lefevre JH, et al. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam Cancer* 2013;12:27-33.
23. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WA, et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* 2014;146:643-646 e8.

24. Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J, et al. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology* 2014;147:1308-1316 e1.
25. Hemminger JA, Pearlman R, Haraldsdottir S, et al. Histology of colorectal adenocarcinoma with double somatic mismatch-repair mutations is indistinguishable from those caused by Lynch syndrome. *Hum Pathol* 2018;78:125-130.
26. Mas-Moya J, Dudley B, Brand RE, et al. Clinicopathological comparison of colorectal and endometrial carcinomas in patients with Lynch-like syndrome versus patients with Lynch syndrome. *Hum Pathol* 2015;46:1616-25.

Table 1. Characteristics of Patients With LLS

Lynch-like syndrome	n=160
Female sex, n (%)	66 (41.3)
Mean age (SD)	63.5 (14.4)
Mean age at CRC diagnosis (SD)	54.9 (14.2)
Indication for colonoscopy, n (%)	
Symptoms	118 (87.4)
CRC screening	17 (12.6)
Immunohistochemistry, n (%)	
Loss of MLH1 and PMS2	77 (48.1%)
Loss of MSH2 and MSH6	43 (26.9%)

Isolated loss of MSH6	20 (12.5%)
Isolated loss of PMS2	14 (8.8%)
IHC non-available; MSI-H	6 (3.7%)
Reason for IHC, n (%)	
Amsterdam I and II criteria	18 (11.2)
Revised Bethesda guidelines	103 (64.4)
Universal screening	39 (24.4)
Location, n (%)	
Right colon	89 (61.4)
Left colon and rectum	56 (38.6)
Median tumor size (range), cm	5 (0.6-30)
Histology, n (%)	
Poor differentiation	33 (20.6)
Lymphocytic infiltration	37 (23.1)
Mucinous tumor	46 (28.7)
Vascular invasion	18 (11.3)
Metachronous CRC, n (%)	5 (3.1)
Personal history of non-CRC tumors, n (%)	27 (16.8)
Personal history of non-CRC LS-associated tumors, n (%)	5 (3.1)
Family history of CRC, n (%)	80 (50)

SD, standard deviation; CRC, colorectal cancer; LS, Lynch syndrome.

Table 2. Patient Characteristics Based on Reason for LLS Diagnosis

	Amsterdam or Bethesda Guidelines n=121	Universal Screening of LS n=39
Median age at CRC diagnosis (SD), years	51.6 (13.7)	65.5* (10.1)
Female sex, n (%)	47 (38.8)	19 (48.7)
Indication for colonoscopy, n (%)		
Symptomatic	89 (87.3)	29 (87.9)
CRC screening	13 (12.7)	4 (12.1)
Immunohistochemistry, n (%)		
MLH1 and PMS2	57 (49.1)	20 (52.6)
MSH2 and MSH6	30 (25.9)	13 (34.2)
MSH6	16 (13.8)	4 (10.5)
PMS2	13 (11.2)	1 (2.6)
Location, n (%)		
Right colon	66 (60.6)	23 (63.9)
Rectum and left colon	43 (39.4)	13 (36.1)
Median tumor size (range), cm	5.88 (4.9-6.8)	4.5 (3.7-5.2)
Histology, n (%)		
Poor differentiation	25 (20.7)	8 (20.5)
Lymphocytic infiltration	30 (24.8)	7 (17.9)

Mucinous	36 (29.8)	10 (25.6)
Vascular infiltration	17 (14)	1 (2.6)
Personal history, n (%)		
CRC or other LS-associated cancer	11 (9.1)	1 (2.6)
Metachronous CRC	4 (3.3)	1 (2.6)
Synchronous CRC	2 (1.7)	0 (0)
Non-CRC LS tumor	5 (4.1)	0 (0)
Family history of CRC, n (%)	69 (57)	11 (28.2)*

*p < 0.05

Table 3. Patient Characteristics Based on Age at CRC Diagnosis and Family History of LS-Associated Neoplasms

	CRC diagnosed under 50 years and/or family history of LS-related cancer n=128	CRC diagnosed \geq 50 years and no family history of LS-related cancer n=32
Median age at CRC diagnosis (SD), years	52.05 (14)	65.71* (9)
Female sex, n (%)	52 (40.6)	14 (43.7)
Indication for colonoscopy, n (%)		
Symptomatic	100 (92.6)	18 (66.7)
CRC screening	8 (7.4)	9 (33.3)
Immunohistochemistry, n (%)		
MLH1 and PMS2	58 (47.5)	19 (59.3)
MSH2 and MSH6	34 (27.9)	9 (28.1)
MSH6	18 (14.8)	2 (6.3)
PMS2	12 (9.8)	2 (6.3)
Location, n (%)		
Right colon	71 (61.7)	18 (60)
Rectum and left colon	44 (38.3)	12 (40)
Median tumor size (range), cm	5.97 (5-6.9)	3.98 (3.1-4.8)









Histology, n (%)		
Poor differentiation	27 (21.1)	6 (18.7)
Lymphocytic infiltration	27 (21.1)	10 (31.3)
Mucinous	33 (25.8)	13 (40.6)
Vascular infiltration	15 (11.7)	3 (9.4)

p < 0.05



Article

Risk of Cancer in Family Members of Patients with Lynch-Like Syndrome

María Dolores Picó ¹, Ana Beatriz Sánchez-Heras ², Adela Castillejo ³ , Mar Giner-Calabuig ⁴ , Miren Alustiza ⁴, Ariadna Sánchez ⁵, Leticia Moreira ⁵, María Pellise ⁵, Antoni Castells ⁵, Gemma Llorc ⁶, Carmen Yagüe ⁶, Teresa Ramon y Cajal ⁷, Alexandra Gisbert-Beamud ⁷, Joaquín Cubiella ⁸ , Laura Rivas ⁸, Maite Herraiz ⁹ , Catalina Garau ¹⁰, Inmaculada Salces ¹¹ , Marta Carrillo-Palau ¹², Luis Bujanda ¹³, Adriá López-Fernández ¹⁴, Cristina Alvarez-Urturi ¹⁵, María Jesús López ¹⁶, Cristina Alenda ¹⁷ , Pedro Zapater ¹⁸ , Francisco Javier Lacueva ¹⁹, Francesc Balaguer ⁵, Jose-Luis Soto ³, Óscar Murcia ^{4,*} and Rodrigo Jover ^{4,*} 

¹ Servicio de Medicina Digestiva, Hospital General Universitario de Elche, Elche, 03203 Alicante, Spain; madopisa@hotmail.com

² Servicio de Oncología Médica, Hospital General Universitario de Elche, Elche, 03203 Alicante, Spain; zrtbns@gmail.com

³ Unidad de Genética Molecular, Hospital General Universitario de Elche, 03203 Alicante, Spain; castillejo.ade@gmail.com (A.C.); sotomartinez.jl@gmail.com (J.-L.S.)

⁴ Servicio de Medicina Digestiva, Hospital General Universitario de Alicante, Instituto de Investigación Sanitaria ISABIAL, 03010 Alicante, Spain; maretagc@gmail.com (M.G.-C.); mirenalustiza92@gmail.com (M.A.)

⁵ Servicio de Medicina Digestiva, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd. University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; asanchezg@clinic.cat (A.S.); LMOREIRA@clinic.cat (L.M.); mpellise@clinic.cat (M.P.); CASTELLS@clinic.cat (A.C.); fprunes@clinic.cat (F.B.)

⁶ Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell, Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa, 08208 Barcelona, Spain; lllortgemma@gmail.com (G.L.); cyague@cst.cat (C.Y.)

⁷ Servicio de Medicina Digestiva, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; tramon@santpau.cat (T.R.yC.); AGisbert@santpau.cat (A.G.-B.)

⁸ Servicio de Medicina Digestiva, Complejo Hospitalario Universitario de Ourense, Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, CIBERehd, 32005 Ourense, Spain; joaquinacubiella@gmail.com (J.C.); Laura.Rivas.Moral@sergas.es (L.R.)

⁹ Servicio de Medicina Digestiva, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Navarra, Spain; mherraizb@unav.es

¹⁰ Servicio de Medicina Digestiva, Hospital de Son Llàtzer, 07198 Palma de Mallorca, Spain; cgarau@hsl.es

¹¹ Servicio de Medicina Digestiva, Hospital 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain; isalces@live.com

¹² Servicio de Medicina Digestiva, Hospital Universitario de Canarias, 38320 Tenerife, Spain; martacarry@yahoo.es

¹³ Servicio de Medicina Digestiva, Hospital Donostia/Instituto Biodonostia, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Universidad del País Vasco (UPV/EHU), 20014 San Sebastián, Spain; luis.bujandafernandezdepierola@osakidetza.eus

¹⁴ Unidad de Alto Riesgo y Prevención del Cáncer, Hospital Universitario Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain; adlopez@vhio.net

¹⁵ Servicio de Medicina Digestiva, Hospital del Mar, 08003 Barcelona, Spain; ACAvarez@parcdesalutmar.cat

¹⁶ Servicio de Medicina Digestiva, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008 Santandercity, Spain; mariajesuslopez33@gmail.com

¹⁷ Servicio de Anatomía Patológica, Hospital General Universitario de Alicante, Instituto de Investigación Sanitaria ISABIAL, 03010 Alicante, Spain; alenda.cris@gmail.com

¹⁸ Servicio de Farmacología Clínica, Hospital General Universitario de Alicante, ISABIAL, CIBERehd, IDiBE, UMH, 03010 Alicante, Spain; zapater.p@gmail.com

¹⁹ Servicio de Cirugía general, Hospital General Universitario de Elche, Elche, 03203 Alicante, Spain; fj.lacueva@umh.es

* Correspondence: omp_89@hotmail.com (Ó.M.); rodrigojover@gmail.com or jover_rod@gva.es (R.J.); Fax: +34-965-933-468 (Ó.M. & R.J.)

Received: 11 July 2020; Accepted: 5 August 2020; Published: 9 August 2020



Abstract: Lynch syndrome (LS) is a common cause of hereditary colorectal cancer (CRC). Some CRC patients develop mismatch repair deficiency without germline pathogenic mutation, known as Lynch-like syndrome (LLS). We compared the risk of CRC in first-degree relatives (FDRs) in LLS and LS patients. LLS was diagnosed when tumors showed immunohistochemical loss of MSH2, MSH6, and PMS2; or loss of MLH1 with *BRAF* wild type; and/or no *MLH1* methylation and absence of pathogenic mutation in these genes. CRC and other LS-related neoplasms were followed in patients diagnosed with LS and LLS and among their FDRs. Standardized incidence ratios (SIRs) were calculated for CRC and other neoplasms associated with LS among FDRs of LS and LLS patients. In total, 205 LS (1205 FDRs) and 131 LLS families (698 FDRs) had complete pedigrees. FDRs of patients with LLS had a high incidence of CRC (SIR, 2.08; 95% confidence interval (CI), 1.56–2.71), which was significantly lower than that in FDRs of patients with LS (SIR, 4.25; 95% CI, 3.67–4.90; $p < 0.001$). The risk of developing other neoplasms associated with LS also increased among FDR of LLS patients (SIR, 2.04; 95% CI, 1.44–2.80) but was lower than that among FDR of patients with LS (SIR, 5.01, 95% CI, 4.26–5.84; $p < 0.001$). FDRs with LLS have an increased risk of developing CRC as well as LS-related neoplasms, although this risk is lower than that of families with LS. Thus, their management should take into account this increased risk.

Keywords: colorectal cancer; risk; genetic; surveillance

1. Introduction

Lynch syndrome (LS) is the most frequent cause of hereditary colorectal cancer (CRC) [1]. It is characterized by the presence of pathogenic mutations in DNA mismatch (MMR) repair genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) or *EpCAM* (epithelial cell adhesion molecule), with an autosomal dominant inheritance [2]. It is mainly characterized by the high risk of developing CRC and endometrial cancer, as well as other neoplasms, namely of the ovaries, urinary tract, stomach, small intestine, pancreas, biliary tract, skin, and brain. Implementation of Jerusalem guidelines, which recommend conducting MMR proteins immunohistochemistry (IHC) in all CRC or endometrial cancers in patients younger than 70 years old [3] or universal screening, has increased the number of patients diagnosed with LS but has also revealed a large number of patients (~30%) who present with tumor microsatellite instability (MSI) or loss-of-expression MMR proteins but without evidence of germline pathogenic mutation in these genes [4]. This condition is known as Lynch-like syndrome (LLS). In this context, it is important to adequately address the existence of variants of unknown significance (VUS) following international guidelines for classification [5–8]. Inadequately classified VUS in MMR genes could also be a cause of LLS.

Currently, it is unclear what should be the type of follow-up in these patients and their relatives. A previous study by our group [9] showed that the risk of CRC was lower in families of patients with LLS compared to the relatives of patients with LS but was higher than that found in relatives of patients with sporadic cases. No increase in the risk of LS-related neoplasms was found in this cohort. However, this study had some limitations, mainly the low number of families with LLS cases, which may have led to selection bias in the cohort.

The goal of this study was to evaluate, in a large cohort, the risk of developing CRC and other LS-related neoplasms among the family members of patients diagnosed with LLS compared with a cohort of LS families. We also compared the clinical and pathological characteristics of CRC patients with LS and LLS.

2. Material and Methods

2.1. Patients and Data Collection

Data were extracted from a descriptive, observational, multicenter, nationwide registry (EPICOLON III) on familial CRC, involving 25 Spanish hospitals [10]. We studied a cohort of patients with CRC and LS (with confirmed germline pathogenic mutation in mismatch repair (MMR) genes) and patients with CRC and LLS. LLS is defined by the presence of high MSI (MSI-H) and/or loss of expression of MMR proteins as determined by immunohistochemistry in CRC patients, without *MLH1* promoter hypermethylation or evidence of germline pathogenic mutation in the DNA MMR genes or epithelial cell adhesion molecule (*EpCAM*). IHC and/or MSI study of the tumors was performed because of fulfillment of Amsterdam criteria and/or revised Bethesda guidelines [11], or because of universal molecular screening for LS [3]. Patients were investigated according to common protocols [12], and were included since November 2017. If any pathogenic mutation in MMR genes was found, genetic testing was expanded among the first-degree relatives (FDRs) of the index case. We followed up with these patients and their relatives until July 2019, with the purpose of learning about new cases of CRC and other LS-associated tumors between these patients and their relatives.

Data on demographic variables, study of CRC, and family history were obtained from the national registry EPICOLON III (www.epicolon.es). All colorectal carcinomas were analyzed for grade, location, Tumor, lymph Nodes, Metastasis (TNM) stage, and for histopathologic features, such as mucinous cell histology, vascular invasion, and tumor-infiltrating lymphocytes, based on morphologic assessment. In all cases, the family history was collected through the cancer pedigrees that included at least one generation backward and forward to the index case, as previously described [9]. All of the patients provided written informed consent. The study was approved by the institutional review boards of the participating hospitals (date: 23 June 2013, ethic code: PI2013073).

2.2. MSI, IHC Staining, and Detection of Germline Mutations

MSI and/or IHC analysis was performed in all the CRC patients included in this cohort. MSI status [13,14] and IHC analysis of *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2* was performed in formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue, as previously described [15]. In patients with loss of *MLH1*, the methylation of *MLH1* and/or somatic V600E *BRAF* mutation status was analyzed. *MLH1* methylation analysis was performed using methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) using the SALSA MS-MLPA kit ME011 Mismatch Repair Genes (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) [16]. The V600E *BRAF* mutation was detected by real-time PCR (ABI Prism 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using specific TaqMan probes and allelic discrimination software as previously described [17].

Germline mutation analysis was performed in accordance with the results of IHC analysis as previously described [4]. The selection of patients and genes for germline mutation analysis was based on IHC and MSI results. Accordingly, *MLH1* and *MSH2* mutational analysis was performed in all tumors with *MLH1* and *MSH2*-negative staining. *MSH6* germline analysis was done in patients with an isolated lack of *MSH6* expression or combined lack of *MSH2* and *MSH6* not showing *MSH2* mutation. Genetic testing for *PMS2* was performed in an isolated loss of *PMS2* expression tumors. Patients with loss of *MSH2* expression with no mutation detected were analyzed for *EpCAM* rearrangements. In patients showing MSI and whose IHC analysis could not be performed, genetic testing of all four MMR genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2*) was carried out. DNA sequencing was performed to characterize the deletion breakpoints. Germline mutation studies were performed on genomic DNA isolated from peripheral blood leucocytes or from non-tumor colon tissues. Detection of point mutations was conducted using PCR and direct sequencing of the whole coding sequence and intron-exon boundaries of each gene. Large rearrangements (deletions and insertions) were tested by MLPA (MLPA Kits P003: *MLH1-MSH2*; P248 (*MLH1-MSH2* confirmation), P008 (*PMS2-MSH6*), and P072 (*EpCAM*) MRC-HOLLAND, Amsterdam, The Netherlands) following the manufacturer's

protocol. Large rearrangements (deletions and insertions) were tested using MLPA according to the manufacturer's protocol. The results of the genetic analysis were interpreted based on the ACMG Recommendations for Standards for Interpretation of Sequence Variations (2000) and the InSIGHT database [5,7].

2.3. Calculation of Standardized Incidence Ratio

To analyze the family risk of developing CRC or other tumors associated with LS, we included information relative to the FDRs of patients with CRC and LS, regardless of whether or not they were carriers of the mutation, or LLS only in cases with complete pedigrees and information about the ages of all family members, including relatives without cancer. We calculated the standardized incidence ratio (SIR) as the ratio of the observed to expected number of cases diagnosed in the families at the time of inclusion in the EPICOLON III cohort. The expected number of cases was calculated as the sum of the products of the number of person-years for each 5-year age/sex group and the corresponding age/sex-specific incidence rates in Spanish regional registries [18]. The confidence limits were based on Byar's approximation of the exact Poisson distribution, which is accurate even with small numbers [19]. The index case was excluded for the analysis of family history at the time of diagnosis.

We also prospectively analyzed the risk of developing CRC or other neoplasms associated with LS during follow-up in family members of patients with LS and LLS. We considered as LS-related tumors those from the endometrium, ovaries, urinary tract, stomach, small intestine, pancreas, biliary tract, skin, and brain. We followed up with new cases of these tumors in the index patients and their FDRs that appeared since the moment of diagnosis of the index case until July 2019. We included information regarding FDRs who had complete information about the surveillance of FDRs (age, history of neoplasia), excluding the rest due to the absence of information.

The pedigrees were updated by asking patients and/or relatives about new cases of cancer after diagnosis of the index case. We included the index case for this analysis, and the appearance of metachronous CRC or a new case of non-colorectal LS-related tumor in the index case was considered a new case in the family.

2.4. Statistical Analysis

Regarding the descriptive analysis, the qualitative variables are presented as percentages. The continuous quantitative variables are described from the mean and the standard deviation (SD) or from the median and the interquartile range (IQR), depending on whether or not they followed a normal distribution. For analysis of the association between qualitative variables, the chi-square test was used, followed by the Fisher's exact test and the Student's *t*-test or the Mann-Whitney U test for the quantitative variables. For the contrast of the hypotheses described above, a confidence level (p) < 0.05 was used. The incidence rates of new cases of affected family members of CRC and of non-colonic neoplasms associated with LS were calculated. Next, the incidence rates of CRC or other neoplasms associated with LS were standardized by sex and age using the indirect method. The follow-up times (person-year) for each family member at risk were calculated from 20 years of age to the time of diagnosis of the earliest cancer, age at death, or end of follow-up. The SIR was calculated from the quotient between the observed cases and those expected among the relatives. The number of expected cases was calculated from the sum of the follow-up times (person-year) for age groups with a 5-year interval, and by sex and the corresponding standard incidence rate. Statistical analysis was performed with SPSS software (SPSS 19.0, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Clinical and Pathology Differences in CRC between LS and LLS

Through July 2019, we included 160 patients diagnosed with CRC who met the diagnostic criteria of LLS and 286 patients diagnosed with CRC and LS. A flow chart of patients and FDR included can be

seen in Figure 1. The characteristics of both populations are shown in Table 1. Patients with LS were younger at diagnosis of CRC (LS, 48.1 (SD 12.9) vs. LLS, 54.9 (SD 14.2); $p = 0.01$). We also observed significant differences regarding a higher percentage of patients in the LS group who met the criteria of Amsterdam and/or Bethesda (Amsterdam I and II present in 72.1% in the LS group vs. 11.2% in the LLS group, $p = 0.00$; Bethesda guidelines: 84.2% in the LS group vs. 64.4% in the LLS group; $p = 0.00$). Patients with LLS showed more frequently loss of MLH1/PMS2 expression than LS patients (48.1% vs. 34.3%; $p = 0.004$) and less frequently loss of MSH2/MSH6 (26.9% vs. 42.6%; $p = 0.001$). Regarding patients with LS, 35.3% presented with a mutation in *MLH1*, 41.3% in *MSH2*, 14.7% in *MSH6*, 5.2% in *PMS2*, and 3.5% in *EpCAM*.

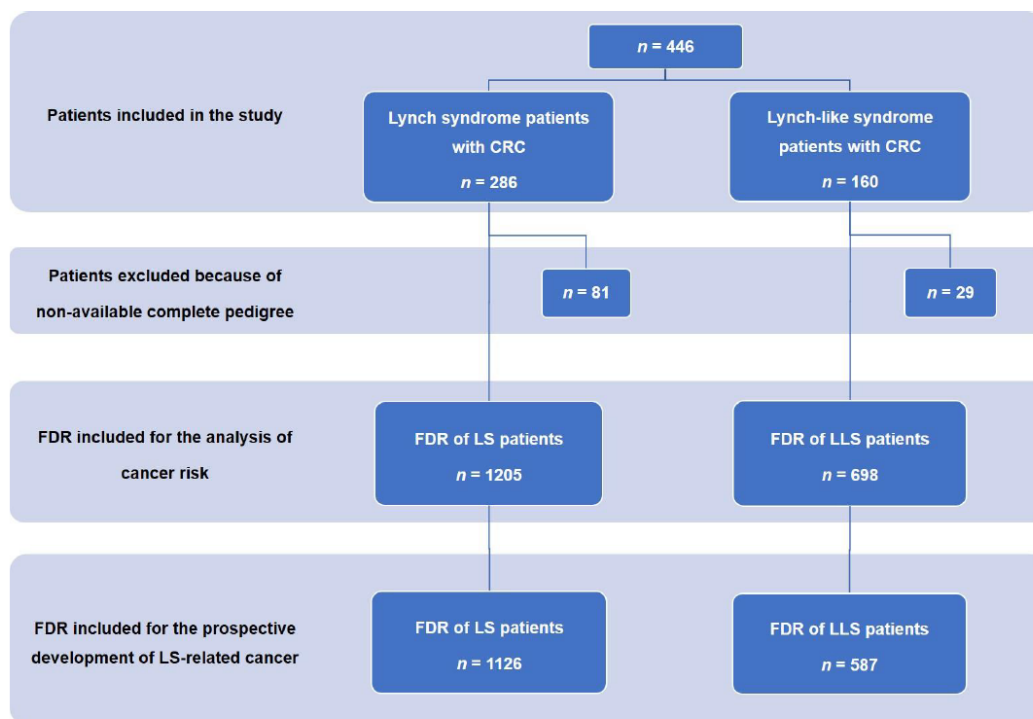


Figure 1. Flow diagram of patients and FDR included. FDR, first-degree relatives; LS, Lynch syndrome; LLS, Lynch-like syndrome; CRC, colorectal cancer.

We did not find relevant differences regarding the location of the CRC or TNM stage, but when we analyzed the pathology features, we only found a higher percentage of lymphocytic infiltration in the CRC of patients with LLS compared to patients with LS (23.1% in LLS vs. 14.3% in LS, $p = 0.04$). However, we did not find relevant differences regarding vascular invasion, grade of differentiation, or the presence of mucinous tumor (Table 1). On the other hand, significant differences were also observed in relation to the personal history of CRC or other neoplasms associated with LS. Synchronous CRC was present in the LS group in 9.1% of them and in the LLS group was present in 1.3% ($p = 0.001$). Metachronous CRC developed in 12.9% of the LS group versus 3.1% of the LLS group ($p = 0.001$), and 29.4% of patients in the LS group had a personal history of other tumors associated with LS compared to 3.1% of patients in the LLS group ($p = 0.00$; Table 1). Examples of the pedigrees of LS and LLS families can be found in Figure 2.

Table 1. Characteristics of patients with LS and LLS.

Characteristics of Patients	LS, n = 286	LLS, n = 160
Female sex	132 (46.1%)	66 (41.3%)
Age at CRC diagnosis, median (SD)	48.1 (SD 12.9)	54.9 (SD 14.2) *
Reason for IHC		
Amsterdam I and II criteria	206 (72.1%)	18 (11.2%) *
Revised Bethesda guidelines	234 (84.2%)	103 (64.4%) *
Immunohistochemistry (IHC), n (%)		
Loss of MLH1 and PMS2	98 (34.3)	77 (48.1) *
Loss of MSH2 and MSH6	122 (42.6)	43 (26.9) *
Isolated loss of MSH6	40 (14)	20 (12.5)
Isolated loss of PMS2	18 (6.3)	14 (8.8)
IHC non-available; MSI-H	8 (2.8)	6 (3.7)
Location		
Right colon	165 (62.7%)	89 (61.4%)
Left colon and rectum	98 (37.3%)	56 (38.6%)
TNM		
Stage I and II	159 (55.6%)	80 (60.1%)
Histology		
Poor differentiation	50 (17.5%)	33 (20.6%)
Lymphocytic infiltration	41 (14.3%)	37 (23.1%) *
Mucinous tumor	88 (30.8%)	46 (28.7%)
Vascular invasion	35 (12.2%)	18 (11.3%)
Personal history		
metachronous CRC	37 (12.9%)	5 (3.1%) *
synchronous CRC	26 (9.1%)	2 (1.3%) *
non-CRC LS tumor	84 (29.4%)	5 (3.1%) *

* $p < 0.05$. SD, standard deviation; CRC, colorectal cancer; LS, Lynch syndrome; LLS, Lynch-like syndrome; MSI-H, microsatellite instability-high, TNM, Tumor, lymph Nodes, Metastasis

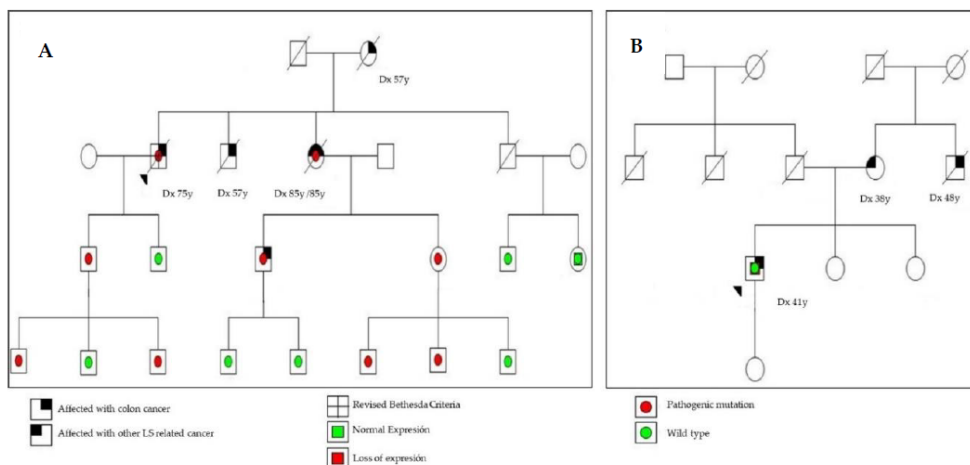


Figure 2. Examples of pedigrees of Lynch syndrome (A) and Lynch-like syndrome (B) families. LS, Lynch syndrome; Dx, diagnosis, Y, years.

3.2. Risk of CRC in FDRs of LS and LLS Patients

As previously explained in the methods section, for the analysis of family risk of developing CRC or other neoplasms associated with LS, only families with complete information on age and history of neoplasms were included. A total of 205 out of 286 families with LS were included. Regarding LLS patients, this information was obtained in 131 out of 160 families. Finally, a total of 1903 FDRs were included, namely, 1205 in the LS group and 698 in the LLS group (Figure 1). When we analyzed the SIR for CRC between both groups, there was an increased risk of CRC in both LS and LLS families, with the SIR being significantly higher for the relatives of patients with LS compared to those of patients with LLS (SIR for CRC in LS, 4.25; 95% confidence interval (CI), 3.67–4.90 vs. SIR for CRC in LLS, 2.08; 95% CI, 1.56–2.71; $p < 0.001$). The same was observed for LS-associated neoplasms (other than CRC); in both cases, there was an increased risk of these neoplasms, which was also higher in LS (SIR, 5.01; 95% CI, 4.26–5.84) than in LLS (SIR, 2.04; 95% CI, 1.44–2.80; $p < 0.001$) (Table 2). The location of non-CRC neoplasms can be seen in Table 3, a higher frequency of endometrial cancer was detected in LS families (48.4% in LS group vs. 20.0% in the LLS group; $p = 0.001$). However, the frequency of pancreatic neoplasms was higher in the LLS group (3.3% in LS group vs. 15.0% in the LLS group; $p = 0.003$).

Table 2. SIR of CRC or other neoplasms associated with LS in first-degree relatives of patients with LLS compared with FDR of patient with LS.

Neoplasms Associated with LS	LS <i>n</i> = 1205		LLS <i>n</i> = 698		<i>p</i> Value
	Number of Tumors	SIR (95% CI)	Number of Tumors	SIR (95% CI)	
CRC	191	4.25 (3.67–4.90)	54	2.08 (1.56–2.71)	0.0000
Non-CRC LS-associated tumor	161	5.01 (4.26–5.84)	38	2.04 (1.44–2.80)	0.0000
TOTAL	352	4.57 (4.10–5.07)	92	2.06 (1.66–2.53)	0.0000

$p < 0.05$. SIR, standardized incidence ratio; LS, Lynch syndrome; LLS, Lynch-like syndrome; CRC, colorectal cancer; CI, confidence interval; FDR, first-degree relatives.

Table 3. Non-CRC LS-associated tumors in LS and LLS patients and their FDR.

Location of the Tumors	LS Families	LLS Families	<i>p</i> Value
	Number of Tumors: 184	Number of Tumors: 40	
Ovary	20 (10.9%)	5 (12.5%)	n.s.
Endometrium	89 (48.4%)	8 (20.0%)	0.001
Pancreas	6 (3.3%)	6 (15.0%)	0.003
Stomach	37 (20.1%)	11 (27.5%)	n.s.
Urinary tract	10 (5.4%)	4 (10%)	n.s.
Skin	3 (1.6%)	2 (5%)	n.s.
Small intestine	5 (2.7%)	0 (0%)	n.s.
Brain	6 (3.3%)	2 (5%)	n.s.
Biliary tract	8 (4.3%)	2 (5%)	n.s.

$p < 0.05$. LS, Lynch syndrome; LLS, Lynch-like syndrome; CRC, colorectal cancer; n.s., no significant.

We also conducted a prospective follow-up from the diagnosis of patients with LS or LLS analyzing the new cases of CRC or other neoplasms associated with LS with a median of 3 years (IQR, 1–6) of prospective follow-up. In this analysis, we included information regarding LS patients and their FDRs, and LLS patients and their FDRs. From a total of 1126 FDR of LS patients, 22 cases of CRC (1.9%) were observed during follow-up in front of only 3 cases (0.50%) of the total 587 patients in the group of LLS and FDRs. On the other hand, there were 23 cases that developed other neoplasms associated with LS (2%) during the follow-up between LS patients and their FDRs compared to two new cases in the group of LLS patients and their FDRs (0.3%) (Table 4). Figure 3 shows the Kaplan–Meier chart of this prospective follow-up, showing that LS families had a higher incidence of new cases of LS-related cancers than LLS families (log rank, 0.0001).

Table 4. Prospective appearance of new cases of cancer between LS patients and their FDR and LLS patients and their FDR.

Neoplasms Associated with LS	LS <i>n</i> = 1126 No. of Tumors	LLS <i>n</i> = 587 No. of Tumors	<i>p</i> Value
CRC	22 (1.9%)	3 (0.5%)	0.019
Non-CRC	23 (2%)	2 (0.3%)	0.006
LS-associated tumor	45 (3.9%)	5 (0.8%)	0.000
TOTAL	45 (3.9%)	5 (0.8%)	0.000

p < 0.05. LS, Lynch syndrome; LLS, Lynch-like syndrome; CRC, colorectal cancer; FDR, first-degree relatives.

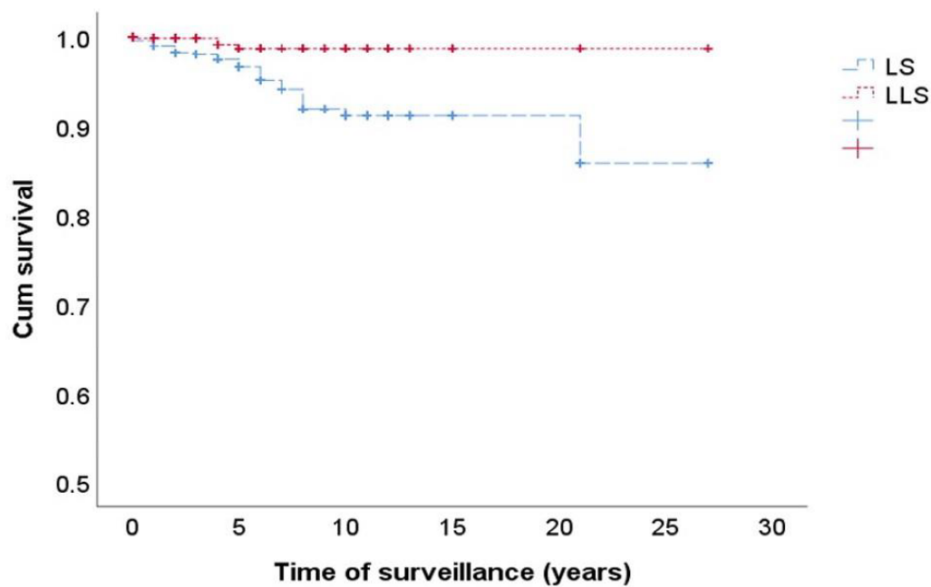


Figure 3. Kaplan–Meier curve showing the risk incidence of CRC and other LS-associated tumors during follow-up in the FDRs of patients with LS and LLS. Log Rank, *p* = 0.000.

4. Discussion

The primary finding of this study was the increased risk of CRC among FDRs of patients with LLS, which was lower than that found for LS families but significantly higher than expected. In addition, the risk of LS-related cancer was also increased in LLS families. Our results confirm previous preliminary results, extending the risk of cancer to LS-related neoplasms, and highlights the need for specific surveillance for these patients and their FDRs. These results also emphasize the need for molecular tools that distinguish between truly hereditary and sporadic cases of LLS.

With the implementation of universal tumor screening for LS in all patients with CRC [3], an increase in the number of patients with LLS has been shown. These patients represent a heterogeneous population where sporadic and truly LS cases are mixed [10]. This fact makes the adequate follow-up of these patients and their FDR difficult as, in the majority of cases, they are not appropriately diagnosed and classified. There are different explanations for the finding of LLS [10]. The first potential explanation that should be ruled out is false-positive cases of MSI or IHC. In cases of LLS, the reassurance of these results and performance of both is mandatory, and it has been described that up to 19% of cases are due to false-positive screening results [20]. Additionally, VUS in MMR genes should be adequately addressed. A major challenge in the diagnosis and management of LLS is the frequent occurrence of VUS in these genes. Depending on the gene, about 1/5th to 1/3rd of DNA

sequence variants identified during the course of LS clinical testing are of uncertain significance [21]. Recently, the International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors (InSiGHT) developed criteria for the interpretation of the MMR gene variants, with the aim to improve the clinical utility of genetic testing for LS. Adequate classification of VUS following the InSiGHT criteria is another important step in the correct diagnosis of LLS cases [7]. Once confirmed that this is an LLS case, there are two possibilities: Cases can be due to germline mutations that have not been detected, or can be sporadic cases due to biallelic somatic inactivation of MMR genes or other genes related to the MMR system. This inactivation can be induced by double hit somatic mutations in these genes, inactivation due to loss of heterozygosity, or a combination of both. Additionally, mosaicism in MMR genes can be a potential cause for that inactivation. Different authors have proposed the investigation of double somatic mutations in MMR and other genes that could explain sporadic CRC cases with LLS, and findings of somatic mutations have been found in a variable proportion of cases, ranging from 22% to 69% [20,22–25]. Although, in recent years, there has been an increase in the use of multigene panel testing in LLS, the best diagnostic strategy to perform in patients with LLS has not been established, with no specific methodology uniformly recommended. Moreover, the addition of somatic mutations to the diagnostic algorithm of LS has not been validated in research studies. Finally, a relationship between these somatic mutations and germline inactivation of still unknown genes related to MMR deficiency has not yet been fully ruled out, and only a germline exome approach or a clinical follow-up validation will confirm the sporadic behavior of these LLS tumors with somatic mutations [10].

Additionally, as previously reported, there are no clinical or histopathological characteristics that can help differentiate between potentially hereditary or sporadic cases [10,26]; neither family history nor age at diagnosis can differentiate between cases, and with no accepted and validated molecular tool for making this distinction, LLS patients and families must be managed as a group. Moreover, in previous studies that also used somatic mutations to classify LLS patients as hereditary or sporadic, authors did not find any clinical or pathological characteristics that were able to differentiate between the two populations [27,28].

In this study, which included a large cohort of patients with LS and LLS diagnosed with CRC, we compared the clinical and molecular characteristics of these patients. Significant differences were observed regarding the age of CRC diagnosis, which was higher in patients with LLS, whereas a higher percentage of compliance of Amsterdam and Bethesda criteria was observed in patients with LS. It is worth mentioning, with respect to the histological characteristics, that a greater significant percentage of lymphocytic infiltration occurred in patients with LLS, although this finding has been described as a typical characteristic of MMR-deficient tumors, irrespective of their hereditary or sporadic origin. In addition, the increase in metachronous and synchronous CRC present in patients with LS was also significant, as well as the development of other malignancies associated with LS. On the other hand, as mentioned above, although the risk of CRC or other neoplasms associated with LS among family members of patients with LLS was increased, it was still lower than the risk presented by family members of patients with LS. Similar results were observed in the study previously conducted by Rodriguez-Soler [9] and also by Win et al. [29]. Our results support establishing surveillance for the FDRs of patients with LLS. Cancers found in this follow-up were significantly more frequent in LS than in LLS families; however, the increased risk found in LLS still justifies this surveillance.

The main limitation of this study is the lack of molecular information about somatic mutations in the LLS cases. Therefore, a more accurate estimate of cancer risk cannot be performed among the subgroups of LLS, namely patients with putative germline mutations that cannot be detected due to the limitations of the technology and those with the presence of somatic biallelic inactivation and probably sporadic origin. Other limitations of our study were the possibility of underreporting or misreporting cancers because our information was not always confirmed with objective clinical and pathologic data. However, we believe this limitation is minor because it would affect the LLS group to the same extent as the other groups. Another limitation of our study was the lack of a homogeneous follow-up for FDRs of patients with LLS between the participant centers, which could have led to

less follow-up for LLS than LS patients and could potentially explain the reduction in the number of incident cases between LLS families. Furthermore, the prospective follow-up time was too short, and longer periods could better demonstrate the efficacy of surveillance in these LLS families. It is also possible that the lack of a clear diagnosis decreased the adherence to follow-up in the LLS families [30]. On the other hand, the strength of our study was the large cohort of LS and LLS patients and families with carefully updated pedigrees. This approach provided robustness to our data in terms of potential applicability to general practice.

In summary, in this large cohort study, we confirmed that the FDRs of patients with LLS have a higher risk of developing CRC and other LS-related neoplasms, although this risk was significantly lower than that found in LS families. These results highlight the need to develop molecular tools able to clearly separate truly hereditary from sporadic cases. Meanwhile, LLS should be considered a high-risk disease and patients and their FDRs should be followed up accordingly. Thus, because, as a group, the risk of CRC in FDR of patients with LLS was higher than expected, we recommend screening for these relatives, as well as gynecological examination, until the hereditary origin of the tumor can be effectively ruled out.

5. Conclusions

First-degree relatives of Lynch-like syndrome have an increased risk of developing LS-related neoplasms. These data support the need for applying preventive measures for these patients and their relatives.

Author Contributions: Study concept, design and drafting of the manuscript: M.D.P., A.C. (Adela Castillejo), J.-L.S., R.J. Acquisition of data: M.D.P., A.B.S.-H., A.C. (Adela Castillejo), Ó.M., M.G.-C., M.A., A.S., L.M., M.P., A.C. (Antoni Castells), G.L., C.Y., T.R.yC., A.G.-B., J.C., L.R., M.H., C.G., I.S., M.C.-P., L.B., A.L.-F., C.A.-U., M.J.L., C.A., P.Z., F.J.L., F.B., J.-L.S., R.J. Analysis, interpretation of data, and statistical analysis: M.D.P., R.J. Critical revision of the article for important intellectual content: all authors. All authors had read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI08/0726, INT-09/208, PI11/2630, INT-12-078, INT13-196, PI14/01386, PI17/01756), Fundación de Investigación Biomédica de la Comunidad Valenciana–Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante Foundation (UGP-14-120, UGP-13-221, UGP-14-265), and the Asociación Española Contra el Cáncer (Fundación Científica GCB13131592CAST). Mar Giner-Calabuig received a pre-doctoral grant from Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana (VALi+d. EXP ACIF/2010/018, ACIF/2016/002). Miren Alustiza received a pre-doctoral grant from Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante ISABIAL. Oscar Murcia received a grant Río-Hortega from Instituto de Salud Carlos III. Asociación para la Investigación en Gastroenterología de la Provincia de Alicante (AIGPA), a private association that promotes research in gastrointestinal diseases in Alicante, also supported the logistical aspects of the study. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results

Conflicts of Interest: The authors declare that no competing interests exist.

Abbreviations

CI	confidence interval
CRC	colorectal cancer
FDR	first-degree relatives
IHC	Immunohistochemistry
IQR	interquartile range
LLS	Lynch-like syndrome
LS	Lynch syndrome
MMR	mismatch repair
MSI	microsatellite instability
SD	standard deviation
SIR	standardized incidence ratios
TNM	Tumor, lymph Nodes, Metastasis

References

1. Lynch, H.; De La Chapelle, A. Hereditary Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 919–932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bonadona, V.; Bonaiti, B.; Olschwang, S.; Grandjouan, S.; Huiart, L.; Longy, M.; Guimbaud, R.; Buecher, B.; Bignon, Y.-J.; Caron, O.; et al. Cancer Risks Associated With Germline Mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 Genes in Lynch Syndrome. *JAMA* **2011**, *305*, 2304–2310. [[CrossRef](#)]
3. Boland, C.R.; Shike, M. Report From the Jerusalem Workshop on Lynch Syndrome-Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **2010**, *138*, 2197.e1–2197.e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Perez-Carbonell, L.; Ruiz-Ponte, C.; Guarinos, C.; Alenda, C.; Payá, A.; Brea, A.; Egoavil, C.M.; Castillejo, A.; Bessa, X.; Xicola, R.M.; et al. Comparison between universal molecular screening for Lynch syndrome and revised Bethesda guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer. *Gut* **2011**, *61*, 865–872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ou, J.; Niessen, R.C.; Vonk, J.; Westers, H.; Hofstra, R.M.; Sijmons, R.H. A database to support the interpretation of human mismatch repair gene variants. *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 1337–1341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Plon, S.E.; Eccles, D.M.; Easton, D.; Foulkes, W.D.; Genuardi, M.; Greenblatt, M.S.; Hogervorst, F.B.; Hoogerbrugge, N.; Spurdle, A.; Tavtigian, S.V.; et al. Sequence variant classification and reporting: Recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 1282–1291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Thompson, B.A.; Insight, O.B.O.; Spurdle, A.; Plazzer, J.-P.; Greenblatt, M.S.; Akagi, K.; Al-Mulla, F.; Bapat, B.; Bernstein, I.; Capella, G.; et al. Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat. Genet.* **2013**, *46*, 107–115. [[CrossRef](#)]
8. Tricarico, R.; Kasela, M.; Mareni, C.; Thompson, B.A.; Drouet, A.; Staderini, L.; Gorelli, G.; Crucianelli, F.; Ingrosso, V.; Kantelinen, J.; et al. Assessment of the InSiGHT Interpretation Criteria for the Clinical Classification of 24MLH1andMSH2Gene Variants. *Hum. Mutat.* **2016**, *38*, 64–77. [[CrossRef](#)]
9. Rodríguez-Soler, M.; Pérez-Carbonell, L.; Guarinos, C.; Zapater, P.; Castillejo, A.; Barbera, V.M.; Juarez, M.; Bessa, X.; Xicola, R.M.; Clofent, J.; et al. Risk of Cancer in Cases of Suspected Lynch Syndrome Without Germline Mutation. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 926–932.e1. [[CrossRef](#)]
10. Picó, M.D.; Castillejo, A.; Murcia, O.; Giner-Calabuig, M.; Alustiza, M.; Sánchez, A.; Moreira, L.; Pellise, M.; Castells, A.; Carrillo-Palau, M.; et al. Clinical and Pathological Characterization of Lynch-Like Syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *18*, 368–374.e1. [[CrossRef](#)]
11. Umar, A.; Boland, C.R.; Terdiman, J.P.; Syngal, S.; Chapelle, A.D.L.; Rüschoff, J.; Fishel, R.; Lindor, N.M.; Burgart, L.J.; Hamelin, R.; et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 261–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Garcia, M.A.; Marzo, M.; Mascort, J.; Quintero, E.; García-Alfonso, P.; López-Ibor, C.; Castells, A.; Segura, P.P. Prevención del cáncer colorrectal. *Gastroenterología y Hepatología* **2009**, *32*, 137–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Suraweera, N.; Duval, A.; Reperant, M.; Vaury, C.; Furlan, D.; Leroy, K.; Seruca, R.; Iacopetta, B.; Hamelin, R. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* **2002**, *123*, 1804–1811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Xicola, R.M.; Llor, X.; Pons, E.; Castells, A.; Alenda, C.; Piñol, V.; Andreu, M.; Castellvi-Bel, S.; Payá, A.; Jover, R.; et al. Performance of Different Microsatellite Marker Panels for Detection of Mismatch Repair-Deficient Colorectal Tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*, 244–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Jover, R.; Alenda, C.; Poveda, M.J.; Peiró, G.; López, F.I.A.; Pérez-Mateo, M.; Payá, A. Defective Mismatch-Repair Colorectal Cancer Clinicopathologic Characteristics and Usefulness of Immunohistochemical Analysis for Diagnosis. *Am. J. Clin. Pathol.* **2004**, *122*, 389–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Pérez-Carbonell, L.; Alenda, C.; Payá, A.; Castillejo, A.; Barberá, V.M.; Guillen, C.; Rojas, E.; Acame, N.; Gutiérrez-Aviñó, E.J.; Castells, A.; et al. Methylation Analysis of MLH1 Improves the Selection of Patients for Genetic Testing in Lynch Syndrome. *J. Mol. Diagn.* **2010**, *12*, 498–504. [[CrossRef](#)]
17. Benlloch, S.; Payá, A.; Alenda, C.; Bessa, X.; Andreu, M.; Jover, R.; Castells, A.; Llor, X.; Aranda, F.; Massutí, B. Detection of BRAF V600E Mutation in Colorectal Cancer. *J. Mol. Diagn.* **2006**, *8*, 540–543. [[CrossRef](#)]

18. Chirlaque-Lopez, M.D. Murciasalud. Available online: <https://www.murciasalud.es/> (accessed on 31 July 2019). (In Spanish)
19. Breslow, N.E.; Day, N.E. Statistical methods in cancer research. IARC Workshop 25–27 May 1983. *IARC Sci. Publ.* **1987**, *82*, 1–406.
20. Haraldsdottir, S.; Hampel, H.; Tomsic, J.; Frankel, W.L.; Pearlman, R.; De La Chapelle, A.; Pritchard, C.C. Colon and Endometrial Cancers With Mismatch Repair Deficiency Can Arise From Somatic, Rather Than Germline, Mutations. *Gastroenterology* **2014**, *147*, 1308–1316.e1. [[CrossRef](#)]
21. Sijmons, R.H.; Greenblatt, M.S.; Genuardi, M. Gene variants of unknown clinical significance in Lynch syndrome. An introduction for clinicians. *Fam. Cancer* **2013**, *12*, 181–187. [[CrossRef](#)]
22. Sourrouille, I.; Coulet, F.; Lefevre, J.H.; Colas, C.; Eyries, M.; Svrcek, M.; Bardier-Dupas, A.; Parc, Y.; Soubrier, F. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam. Cancer* **2012**, *12*, 27–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mensenkamp, A.R.; Vogelaar, I.; Van Zelst–Stams, W.A.; Goossens, M.; Ouchene, H.; Hendriks–Cornelissen, S.J.; Kwint, M.P.; Hoogerbrugge, N.; Nagtegaal, I.; Ligtenberg, M.J. Somatic Mutations in MLH1 and MSH2 Are a Frequent Cause of Mismatch-Repair Deficiency in Lynch Syndrome-Like Tumors. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 643–646.e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Geurts-Giele, W.R.; Leenen, C.H.; Dubbink, H.J.; Meijssen, I.C.; Post, E.; Sleddens, H.F.; Kuipers, E.J.; Goverde, A.; Ouweland, A.M.V.D.; Van Lier, M.G.; et al. Somatic aberrations of mismatch repair genes as a cause of microsatellite-unstable cancers. *J. Pathol.* **2014**, *234*, 548–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hampel, H.; Pearlman, R.; Beightol, M.; Zhao, W.J.; Jones, D.; Frankel, W.L.; Goodfellow, P.J.; Yilmaz, A.; Miller, K.; Bacher, J.; et al. Assessment of Tumor Sequencing as a Replacement for Lynch Syndrome Screening and Current Molecular Tests for Patients With Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* **2018**, *4*, 806–813. [[CrossRef](#)]
26. Pearlman, R.; Haraldsdottir, S.; De La Chapelle, A.; Jonasson, J.G.; Liyanarachchi, S.; Frankel, W.L.; Rafnar, T.; Stefansson, K.; Pritchard, C.C.; Hampel, H. Clinical characteristics of patients with colorectal cancer with double somatic mismatch repair mutations compared with Lynch syndrome. *J. Med. Genet.* **2019**, *56*, 462–470. [[CrossRef](#)]
27. Hemminger, J.A.; Pearlman, R.; Haraldsdottir, S.; Knight, D.; Jónasson, J.G.; Pritchard, C.C.; Hampel, H.; Frankel, W.L. Histology of colorectal adenocarcinoma with double somatic mismatch-repair mutations is indistinguishable from those caused by Lynch syndrome. *Hum. Pathol.* **2018**, *78*, 125–130. [[CrossRef](#)]
28. Mas-Moya, J.; Dudley, B.; Brand, R.E.; Thull, D.; Bahary, N.; Nikiforova, M.N.; Pai, R.K. Clinicopathological comparison of colorectal and endometrial carcinomas in patients with Lynch-like syndrome versus patients with Lynch syndrome. *Hum. Pathol.* **2015**, *46*, 1616–1625. [[CrossRef](#)]
29. Win, A.K.; Buchanan, D.D.; Rosty, C.; MacInnis, R.; Dowty, J.G.; Dite, G.; Giles, G.G.; Southey, M.C.; Young, J.P.; Clendenning, M.; et al. Role of tumour molecular and pathology features to estimate colorectal cancer risk for first-degree relatives. *Gut* **2014**, *64*, 101–110. [[CrossRef](#)]
30. Carayol, J.; Khat, M.; Maccario, J.; Bonaïti-Pellié, C. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: Current risks of colorectal cancer largely overestimated. *J. Med. Genet.* **2002**, *39*, 335–339. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).