



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA.

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CIENCIAS FORENSES.

“Genes de susceptibilidad al cáncer colorrectal hereditario: análisis en familias gallegas con poliposis colónica y sospecha de Síndrome de Lynch.”

NURIA GÓMEZ FERNÁNDEZ.

SANTIAGO DE COMPOSTELA. MAYO 2009.

El profesor Doctor Ángel Carracedo Álvarez, Catedrático de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, y la Doctora Clara Ruíz-Ponte, adjunto de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral: **“Genes de susceptibilidad al cáncer colorrectal hereditario: análisis en familias gallegas con poliposis colónica y sospecha de Síndrome de Lynch”** de la Licenciada en Biología Dña. Nuria Gómez Fernández ha sido realizada bajo su dirección, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el tribunal correspondiente.

Para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela a 8 de Mayo de 2009.

Fdo: Prof.Dr.Ángel Carracedo Álvarez.

Fdo: Dra.Clara Ruíz-Ponte

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA.
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CIENCIAS FORENSES.

“Genes de susceptibilidad al cáncer colorrectal hereditario: análisis en familias gallegas con poliposis colónica y sospecha de Síndrome de Lynch.”

Memoria que presenta, para optar al grado de Doctor,
Nuria Gómez Fernández
Santiago de Compostela, Mayo de 2009.

A mis padres, Zaira y David.

AGRADECIMIENTOS

El que esté escribiendo los agradecimientos implica que por fin he llegado al final del camino. Con esto se acaba una fase y comienza una nueva, no muy distinta, llena de ilusiones, esfuerzo, trabajo, incertidumbres y nuevas cosas que descubrir y aprender. Si me paro a pensar se me hace lejano el día en el que empecé con este trabajo y me da la sensación de que llevo toda una vida de dedicación exclusiva a ello, sin hacer nada más. Pero este largo camino no lo he recorrido sola sino arropada y empujada por mucha gente que hoy hace que mi sueño se haya podido hacer realidad.

Quería dar mi primer agradecimiento al Dr Ángel Carracedo. Un hombre humilde, campechano y lleno de ilusión que un día decidió darle una oportunidad a una recién licenciada en Biología cuyo sueño era dedicarse a la genética. **Gracias** Ángel por confiar en mí, por darme la oportunidad de formar parte del grupo de Medicina Xenómica y así poder conocer a cada uno de sus miembros.

Gracias a cada una de las personas que hacen de la FPGMX un centro de referencia de la genética española gracias por enseñarme que es la investigación y lo que implica que todo este trabajo algún día pueda aplicarse. De todos ellos espero llevarme un poco: De Pancho me llevo el amor por el conocimiento, de Luli el saber estar, de Celsa la alegría de vivir y la sonrisa que tanto necesito cada mañana, de Ana Ézara la fuerza de voluntad y la organización, de Jorge unos pocos conocimientos de informática, de Ana FM la capacidad de decisión, de Bea Quintáns la palabra MLPA, de Xavi la palabra SNP y estudio de asociación, de Patri la simpatía, de Rosa mil y un *papers* y de Tere la capacidad de trabajo. **Gracias** a todos ellos y espero que ellos también se lleven algo de mí.

Gracias Dra Ana Vega, por abrirme los ojos en la oscuridad de la ciencia, por estar ahí cuando te necesité y por hacer que Manson forme parte de mi vida.

No quiero olvidarme de las chicas del Cegen, de Rosana y del ABI3730 (el 80% de mi tesis es tuya), de Rocío, Bego, Marta, Marghe, Carla, Noa, la Dra. Silvia, María G, de la voz dulce y suave de Susi, Menchu, Xulio, Carolina y de mis compañeros de Legal. Pero sobre todo no quiero dar las **gracias** de un modo más especial a Alejandro Brea (mi informático de tesis) y a mis técnicos María, Olga y Eva, las chicas que han tirado de mi trabajo como si fuese el suyo propio y de las que he aprendido como debe de ser una profesional en el laboratorio.

Es fundamental el hacer una especial mención a la hora del café. Agradecerle los maravillosos momentos que me ha dado rodeada de los que ya considero mis amigos, porque a lo largo de estos cuatro años me lo han demostrado: Dr Pablo Raña, ese compañero de comidas biológicas y filósofo de la vida. A su esposa Lucia (Lu) y a las niñas *datamanger* del Servicio de Oncología (Rosa y Noelia). A mi compañera de viajes y fatigas Ana Blanco. A esa mujer mínima en cuerpo pero máxima en corazón, Pili. Al chico más bueno del mundo, Dr Papi Gesteira. A mi veterinaria particular, Laura. A mi venezolano preferido, William. A mi tocaya la Dra Naveran y a "la chica de Madrid-Chantada" asentada en Galicia, Marta Cortón.

Gracias a Ceres, esa chica de la Coru que desprende don de palabra, elegancia, hermosura, alegría, tesón e inteligencia por donde va. Ceres es el fiel reflejo de que el discípulo siempre supera al maestro. **Gracias** a ella y a Juan, por ser mis amigos y por haberme

enseñado muchas cosas más allá de la ciencia, como es el darlo todo sin esperar nada a cambio y las ganas de triunfar en la vida.

Sin ella no soy nada. Es el paño de mis lágrimas, el hombro en el que me apoyo, el refugio cuando en mi mente hay tormenta, mi compañera de piso y mi amiga. Llegó de Burgos para estudiar Biología y desde el día que la conocí ya nunca más nos separamos. **Gracias** por existir María.

A ese chico de nombre de comic, a mi médico personal, al actor de teatro, a ese pequeño gran hombre que un día quiso ser astronauta. **Gracias** Galo.

A mis amigos de la carrera, esos biólogos que también intentan sobrevivir: Luis, Raquel, María Alba, Merce, Sergio e Isma. **Gracias**

A mis amigas de la infancia: Lourdes, Lorelay, Carmen, Ana y María José, a las que considero como hermanas, o al menos sus hijos me llaman tía. **Gracias** por hacer que mi vida sea normal, por apoyarme de esa forma que tan solo vosotras sabéis y por tener la palabra adecuada en el momento oportuno.

A mi mejor amigo, mi alma gemela, mi yo en chico, el que siempre confía en mí y me empuja a conseguir mis sueños, el que nunca me falla, el que aunque lejos lo siento cerca. **Gracias** Sechu.

Qué decir de la Dra Ruiz Ponte. Clara has sido mi brújula en toda esta travesía. Es mi mentora, consejera y la responsable de que todo este trabajo exista. Ha sido duro, Clara, pero lo hemos conseguido. **Gracias** porque sin ti hoy todo esto no sería posible.

Quiero dar las más grandes **gracias** a mi familia. A mis padres por ser mi gran apoyo económico-moral y por hacerme tal como soy. A mi padre por darme la llave maestra que abre todas las puertas y ventanas y que nunca las cierra. A mi madre, la que me enseñó que en la vida uno ha de luchar por lo que quiere y que con tesón y esfuerzo todo es posible. A mi hermana Zaira fiel reflejo del tesón, porque el empuje que me da es directamente proporcional a la cantidad de espacio que ocupa en mi vida. A mis abuelos por demostrarme cada día que haga lo que haga siempre estarán orgullosos de mí.

Y por último quiero darle las **gracias** a mi niño, a mi punto de equilibrio. **Gracias** David por estar a mi lado todos estos años, por tu apoyo incondicional, por aguantarme con todos mis muchos defectos y mis pocas virtudes, por tu paciencia, por ayudarme a conseguir mis sueños, por levantarme cuando me caigo y por quererme un poquito. Tu persona ha sido fundamental en mi vida y contigo he aprendido a ver siempre el vaso medio lleno.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XIX
I. INTRODUCCIÓN:.....	23
I.1 CÁNCER COLORRECTAL: CONCEPTOS GENERALES.....	25
I.1.1 COLON-RECTO: CÁNCER COLORRECTAL.....	25
I.1.2 INCIDENCIA DEL CÁNCER COLORRECTAL:.....	27
I.1.3 ETIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL.....	28
I.1.4 FACTORES DE RIESGO.....	29
I.2 VÍAS DE TUMOROGÉNESIS COLORRECTAL.....	35
I.3 CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO VS FAMILIAR.....	38
I.4 SÍNDROMES HEREDITARIOS.....	40
I.4.1 SÍNDROMES POLIPÓSICOS:.....	40
I.4.1.1 POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR:.....	40
I.4.1.2 POLIPOSIS ASOCIADA A MUTYH (MAP).....	49
I.4.1.3 OTROS SÍNDROMES POLIPÓSICOS.....	55
I.4.2 CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO POLIPÓSICO /SÍNDROME DE LYNCH.....	56
I.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN FAMILIAS CON SOSPECHA DE CCR HEREDITARIO.....	67
II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN:.....	71
III. MATERIAL Y MÉTODOS:.....	75
III.1 SELECCIÓN DE PACIENTES Y CONTROLES.....	77
III.2 EXTRACCIÓN DE DNA.....	78
III.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.....	78
III.2.1.1 EXTRACCIÓN MANUAL CON WIZARD DNA EXTRACTION KIT.....	79
III.2.1.2 EXTRACCIÓN MECANICA CON CHEMAGIC DNA BLOOD 100 KIT.....	79
III.2.2 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE MUESTRA DE TEJIDO INCLUIDA EN PARAFINA.....	79
III.2.3 CUANTIFICACIÓN Y CONSERVACION DEL DNA.....	80
III.3 INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI).....	81
III.3.1 LOCI ANALIZADOS Y CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN.....	81
III.3.2 DETECCIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR.....	81
III.3.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS Y ANÁLISIS DE DATOS.....	82
III.4 ANÁLISIS DE MUTACIONES PUNTUALES EN LOS GENES: APC, MUTYH, MLH1, MSH2 Y MSH6.....	83
III.4.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES APC, MUTYH, MLH1, MSH2 Y MSH6.....	83
III.4.1.1 AMPLIFICACIÓN DEL GEN APC.....	84
III.4.1.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN MUTYH.....	84
III.4.1.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN MLH1.....	85
III.4.1.4 AMPLIFICACIÓN DEL GEN MSH2.....	86
III.4.1.5 AMPLIFICACIÓN DEL GEN MSH6.....	87
III.4.2 CHEQUEO Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.....	88
III.4.3 REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN.....	88
III.4.4 ELECTROFORESIS CAPILAR Y ANÁLISIS DE DATOS.....	88

III.5	ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS GENÓMICOS EN LOS GENES <i>APC</i> , <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> Y <i>MSH6</i> .	90
III.5.1	MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA).	90
III.5.2	DETECCIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.	92
III.5.3	CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS Y ANÁLISIS DE DATOS.	93
III.6	ESTUDIOS DE cDNA.	93
III.6.1	EXTRACCIÓN DEL RNA.	93
III.6.2	SINTESIS DEL cDNA.	94
III.6.3	DISEÑO DE PRIMERS Y CONDICIONES DE AMPLIFICACION.	94
III.6.4	SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO Y ANÁLISIS DE DATOS.	95
III.7	ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN P.VAL600GLN DEL GEN <i>BRAF</i> .	95
III.8	ESTUDIO DE VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (VUS).	96
III.8.1	ESTUDIOS <i>in silico</i> .	97
III.8.2	ESTUDIOS EN POBLACIÓN CONTROL.	98
III.8.3	ESTUDIOS DE COSEGREGACION.	99
III.9	NOMENCLATURA DE LAS MUTACIONES.	99
III.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	99
IV.	RESULTADOS:	101
IV.1	SÍNDROMES POLIPÓSICOS: POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR Y POLIPOSIS ASOCIADA A MUTYH.	103
IV.1.1	ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN <i>APC</i> :	103
IV.1.2	ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN <i>MUTYH</i> :	107
IV.1.3	ESTUDIO DE VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (VUS) EN LOS GENES <i>APC</i> Y <i>MUTYH</i> .	109
IV.2	CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO/ SÍNDROME DE LYNCH.	115
IV.2.1	ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES <i>MMR</i> (<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> Y <i>MSH6</i>) EN PACIENTES CON SOSPECHA DE SÍNDROME DE LYNCH.	115
IV.2.2	ESTUDIO DE VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO EN LOS GENES <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> Y <i>MSH6</i> .	122
IV.2.3	ANÁLISIS DEL GEN <i>MUTYH</i> EN PACIENTES CON <i>CCR</i> ESTABLES Y MENORES DE 50 AÑOS, Y EN FAMILIAS ÁMSTERDAM POSITIVAS SIN ALTERACIÓN DE LA VÍA MUTADORA.	128
V.	DISCUSIÓN:	129
V.1	SÍNDROMES POLIPÓSICOS: GENES <i>APC</i> Y <i>MUTYH</i> .	131
V.2	CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO /SÍNDROME DE LYNCH: GENES <i>MMR</i> .	136
V.3	VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO:	140
VI.	CONCLUSIONES:	147
VII.	ANEXOS:	151
VII.1	ANEXO I: PRIMERS DE AMPLIFICACION Y SECUENCIACION DEL GEN <i>APC</i>	153

VII.2	ANEXO II: PRIMERS DE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN MUTYH.155	
VII.2.1	<i>LISTADO DE PRIMERS DE PCR Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN MUTYH</i>	155
VII.2.2	<i>LISTADO DE PRIMERS DE PCR Y AMPLIFICACIÓN PARA LOS HOTSPOTS DE MUTYH.</i>	156
VII.3	ANEXO III: PRIMERS DE PCR Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN MLH1.	157
VII.4	ANEXO IV: PRMER DE SECUENCIACIÓN Y PCR PARA EL GEN MSH2.	159
VII.5	ANEXO V: LISTADO DE PRIMERS DE SECUENCIACION Y PCR DEL GEN MSH6.	161
VII.6	ANEXO VI: SONDAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS MLPA:.....	163
VII.6.1	<i>SONDA DEL KIT MLPA P043 APC</i>	163
VII.6.2	<i>SONDAS DEL KIT MLPA P003 MLH1_MSH2</i>	165
VII.6.3	<i>SONDAS DEL KIT MLPA P248 MLH1-MSH2</i>	167
VII.6.4	<i>SONDAS DEL KIT MLPA P008 MSH6_PMS2:</i>	169
VII.7	ANEXO VII: ESTUDIOS DE cDNA.....	171
VII.7.1	<i>PRIMES DELECIÓN DEL EXON 4 DEL GEN APC:</i>	171
VII.7.2	<i>PRIMERS DELECIÓN DEL LOS EXONES 4 AL 6 DE MLH1:</i>	171
VII.8	ANEXO VIII: PRIMERS DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL EXÓN 15 DE BRAF:	172
VII.9	ANEXO IX: VARIANTES POLIMÓRFICAS DETECTADAS EN LOS GENES APC Y MUTYH EN FAMILIAS GALLEGAS.	173
VII.10	ANEXO X: VARIANTES POLIMÓRFICAS DETECTADAS EN LOS GENES MMR EN FAMILIAS GALLEGAS.	174
VII.11	ANEXO XI: ARTÍCULOS.....	175
VII.11.1	<i>Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations?</i>	175
VII.11.2	<i>Association of MUTYH and MSH6 germline mutations in colorectal cancer patients.</i>	193
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	207

ABREVIATURAS

AFAP:	Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada.	MMR:	Sistema <i>Mismatch Repair</i> o de reparación de bases desapareadas.
APC:	gen <i>Andeomatosous polyposis coli</i>	mRNA:	RNA mensajero.
BRAF:	homologo B1 del oncogén V-raf del sarcoma murino viral.	MSH2:	Gen homólogo humano 2 de MutS de <i>E.coli</i> .
CALS:	Manchas café con leche.	MSH6:	Gen homólogo humano 6 de MutS de <i>E.coli</i> .
CCR:	Cáncer colorrectal.	MSI:	Inestabilidad de Microsatélites
cDNA:	DNA complementario	MSI-H:	Alta inestabilidad de microsatélites
cM:	Centimorgans	MSI-L:	Baja inestabilidad de microsatélites
DNA:	ácido desoxiribonucleico.	MSS:	Estabilidad de microsatélites
dsDNA:	DNA de cadena sencilla.	MT:	Síndrome de Muir-Torre.
ESE:	Enhancers exónicos	MutYH:	Gen homólogo humano de MutY de <i>E.coli</i> .
ESS:	Silencer exónicos.	OMIM:	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
FAP:	Poliposis Adenomatosa Familiar.	ORF:	<i>Open Reading frame</i>
FISH:	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia.	ORF:	<i>Open reading frame.</i>
GWAS:	<i>Genome-wide Association Studies</i>	Pb:	pares de bases
HGMD:	<i>Human Gene Mutation Database</i>	PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
HGSV:	<i>Human Genome Sequence Variation</i>	PoliA:	Poliadenosinas.
HNPCC:	Cáncer colorrectal no polipósico.	RNA:	Ácido ribonucleico.
Hotspots:	Puntos calientes de mutación.	SNP:	Polimorfismo de una única base.
IHQ:	inmunohistoquímica.	Ta:	Temperatura de <i>anealing</i> .
Kb:	kilobases.	TS:	Síndrome de Turcot.
KDa:	kilodaltons.	TSG:	Genes supresores de tumores.
KO:	<i>knockout</i>	VUS:	<i>Variants of uncertain significance.</i>
LOH:	Pérdida de la heterocigosidad		
MAP:	Poliposis asociada a <i>MutYH</i> .		
MCR:	<i>Mutation cluster región.</i>		
MLH1:	Gen homólogo humano 1 de <i>MutL</i> de <i>E.coli</i> .		
MLPA:	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>		

I. INTRODUCCIÓN

I.1 CÁNCER COLORRECTAL: CONCEPTOS GENERALES.

I.1.1 COLON-RECTO: CÁNCER COLORRECTAL.

El colon es la primera y la mayor de las partes del intestino grueso. Se localiza entre el intestino delgado y se continúa con el ciego y el recto. Su principal función es la absorción de agua, nutriente, minerales y alimentos, además de servir como área de almacenamiento de las heces. El colon consta de cuatro secciones (figura1): colon ascendente (derecho), colon transverso, colon descendente (izquierdo) y colon sigmoideo o sigma.

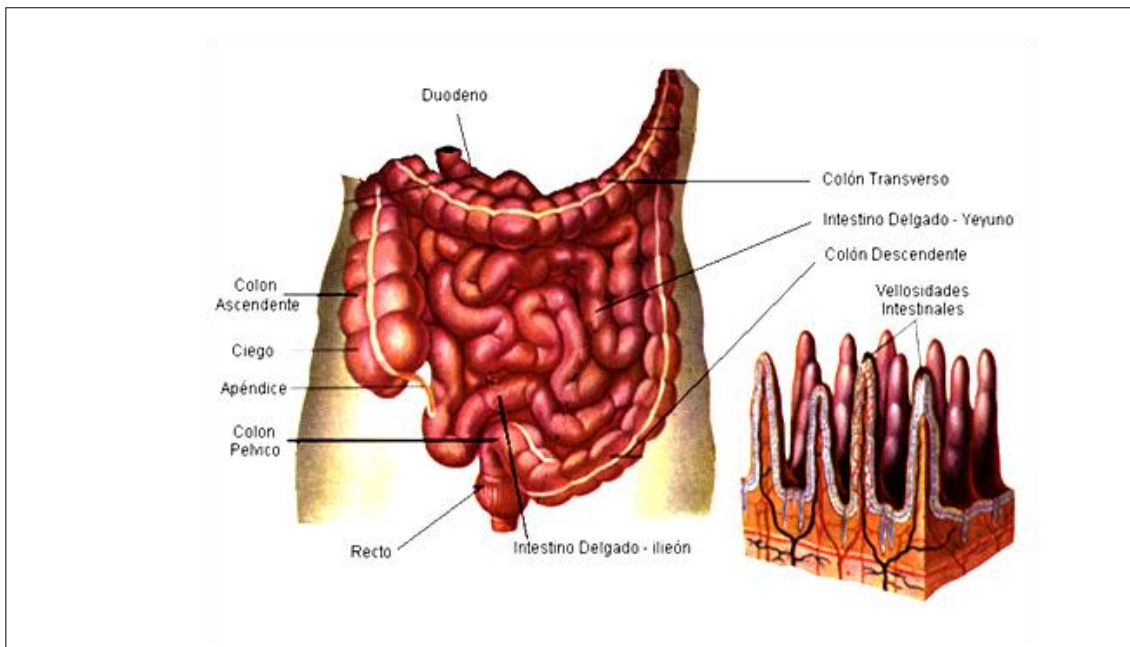


Figura 1: Esquema de la anatomía del colon y la estructura de su epitelio. Tomado de www.xenciclopedia.com

El colon es irregular y grueso debido a la disposición longitudinal de las fibras musculares, también denominadas tenias del colon. La submucosa está poco desarrollada y a este nivel la mucosa está llena de nódulos linfáticos que le confieren un aspecto característico. La mucosa del intestino grueso tiene mayor espesor que la del intestino delgado, y a lo largo de la superficie de su epitelio aparecen multitud de invaginaciones con forma tubular que ocupan desde la luz del tubo digestivo hasta la capa muscular de la mucosa. A estas invaginaciones se les denominan Criptas De Lieberkühn, y en el colon son más anchas, profundas y más numerosas (figura 2A, 2B). La regeneración del epitelio tiene lugar en el fondo de estas criptas.

El cáncer colorrectal (CCR) consiste en el crecimiento descontrolado de las células de la mucosa en regiones intestinales del colon y recto. Estas células destruyen el tejido *in situ* y

pueden destruir e invadir tejidos adyacentes, o de cualquier parte del organismo si pasan al torrente sanguíneo o linfático ¹.

El tipo de tumor colorrectal más frecuente es el adenocarcinoma, y aparece en el 90%-95% de los casos en la mucosa que recubre el interior del colon y recto. El pronóstico del paciente va a depender del estadio en el que se localice el cáncer, y por tanto del diagnóstico temprano del mismo. Así hablamos clásicamente de 5 estadios o fases (figura2C):

1. Estadio 0 (carcinoma *in situ*): El cáncer afecta únicamente al recubrimiento más profundo del colon.
2. Estadio I: El cáncer comprende las capas más profundas e intermedias del colon. Este estadio se corresponde con el estado A de la clasificación de *Dukes*. y tiene una supervivencia del 90% a 5 años.
3. Estadio II: Se corresponde con el estadio B de *Dukes*. El cáncer ya ha metastatizado más allá de la capa más profunda del tejido del colon, ocupando las capas medias del mismo o tejidos circundantes (Estadio IIA), alrededor del colon-recto o metastatizado en órganos circundantes a través del peritoneo (Estadio IIB)
4. Estadio III: Se corresponde con el estado C de *Dukes* y se divide en 3 fases (IIIA, IIIB y IIIC) según haya metastatizado a 3 o 4 ganglios y a tejido extraperitoneal, respectivamente.
5. Estadio IV o estadio D de *Dukes*. En este estado el tumor podría haber metastatizado a los ganglios linfáticos cercanos y a otras partes del cuerpo, como el hígado y los pulmones. Solo un 5% de los enfermos sobreviven 5 años cuando el CCR se localiza en este estado.

Los tumores colorrectales constituyen un excelente sistema para estudiar la carcinogénesis, así como los eventos moleculares involucrados en el desarrollo de un tumor como resultado de una acumulación de alteraciones genéticas en genes que son trascendentales en el control del crecimiento epitelial y la diferenciación celular².

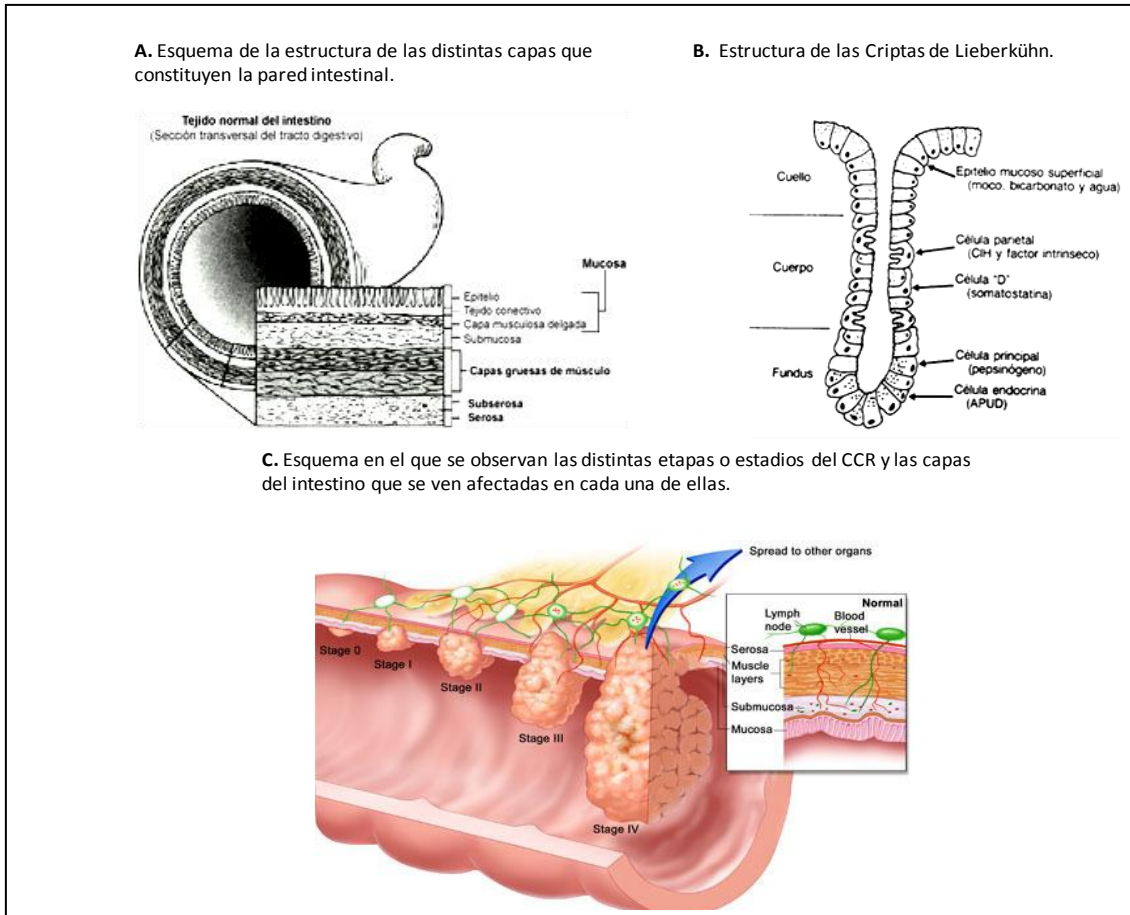


Figura 2: Estructura de la pared del colon y estadios invasivos del cáncer. *Modificado de www.cancer.gov.*

I.1.2 INCIDENCIA DEL CÁNCER COLORRECTAL:

El CCR constituye un importante problema de salud pública en el mundo occidental. Es el tercero de las entidades tumorales en frecuencia entre los hombres en países desarrollados (tras los tumores de pulmón y próstata) y el segundo entre las mujeres (tras el cáncer de mama), con aproximadamente 1.000.000 de nuevos casos al año en todo el mundo (550.000 hombres y 470.000 mujeres). Representa el 9,5% de todos los tumores, pero como ocurre en muchos otros cánceres, hay grandes diferencias entre los países menos y más desarrollados siendo mucho más frecuente en estos últimos (Norteamérica, Australia, Japón y Europa) y mostrando además una clara tendencia al alza.

En España el cáncer colorrectal constituye la segunda neoplasia más común (figura 3.A) y la primera causa de muerte por cáncer, representando el 11% de defunciones por cáncer en el hombre y el 15% en la mujer³ (<http://www-dep.iarc.fr>). Se diagnostican aproximadamente 30 y 40 nuevos casos de CCR por cada 10.000 habitantes⁴, por tanto, su incidencia se puede considerar alta con una tendencia al alza, con más celeridad en el sexo masculino (figura 3B). En un contexto exclusivamente europeo, la incidencia en España se puede considerar media-baja y se estima que ronde valores de 21.000 casos al año, con un incremento medio del 2,6%

anual. Galicia es la segunda Comunidad Autónoma con mayor incidencia de CCR, presentando un 3,9% de las causas de mortalidad entre su población. Existen datos de 2001 que demuestran la elevada incidencia en nuestro medio, presentando una tasa superior a la media europea en hombres (60.4 vs 50.5) e idéntica en mujeres (35.0 vs 35.7) (Clofent, *com. pers.*). Esta elevada incidencia tiende a mantenerse en los próximos años debido a la alta tasa de envejecimiento de nuestra población, por lo que está convirtiéndose en un importante problema sanitario.

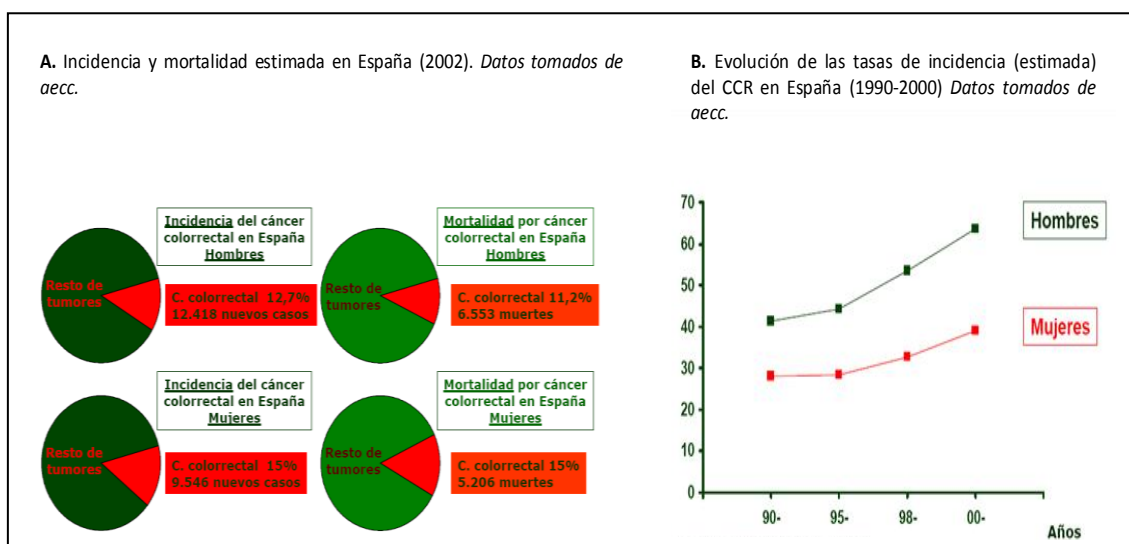


Figura 3: Incidencia del cáncer colorrectal en España. Modificado de aecc.com

I.1.3 ETIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL.

El riesgo de desarrollar este tipo de tumor en la población general se sitúa en el 5-6%, pero aumenta exponencialmente con la edad. Se estima que entre un 20-40% de los casos tendrían una base genética (hereditaria o agrupación familiar), y que alrededor del 60-80% serían debidos fundamentalmente a factores ambientales (dieta, estilo de vida, etc...). La mayoría de los casos de CCR son diagnosticados entre los 65-70 años y suelen corresponderse con casos de CCR esporádico o agregación familiar. Los casos diagnosticados a edades más tempranas y suelen corresponderse con casos familiares (<50 años) o hereditarios (son la minoría de los casos y se diagnostican a edades de 35-40 años). El CCR se puede clasificar en tres tipos atendiendo a su forma de transmisión y a la participación de genes y ambiente en su desarrollo:

1. El CCR hereditario (o formas hereditarias clásicas) es la forma menos común de CCR. Agrupan al 3-5% de los CCR y se caracteriza por una herencia mendeliana principalmente autosómica dominante, aunque también se describen casos con herencia autosómica recesiva. Las formas hereditarias de CCR más conocidas son la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP, 1%)⁵, la Poliposis

asociada a *MYUTYH* (MAP, 0.4-0.75%)^{6,7} y el Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC)/ Síndrome de Lynch (3-5%)⁸:

2. El CCR con agregación familiar se define como la aparición a edades tardías de CCR, u otro tipo de tumores, en más miembros de una familia de lo que correspondería por azar, constituye alrededor del 20-40% de los casos. Los estudios poblacionales asocian un riesgo de dos a tres veces mayor que la población normal de adquirir un CCR cuando un familiar de primer grado ha padecido un CCR⁹, aunque los factores ambientales probablemente determinan quiénes de los individuos predispuestos genéticamente desarrollarán CCR.
3. El CCR esporádico agrupa a la mayor parte de los CCR (60-80%). Se caracteriza por no mostrar ningún tipo de agregación familiar⁸. Parece que este tipo de CCR surge principalmente como causa de la exposición a factores ambientales, aunque se sospecha que existe cierta predisposición genética en los individuos que lo padecen^{10,11}. Los datos de frecuencia de estos tipos de cáncer en población española^{8,12} se muestran en la siguiente figura:

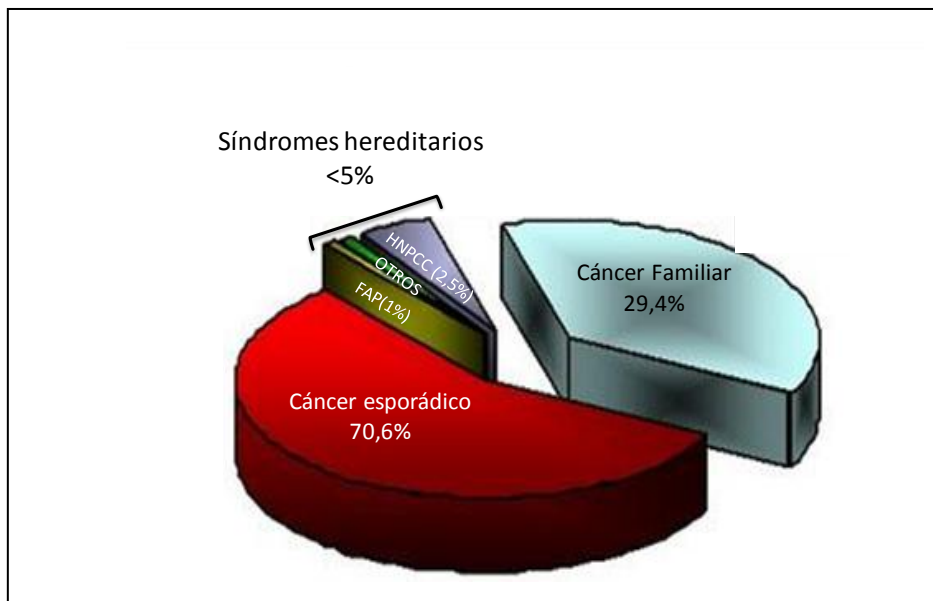


Figura 4: Distribución de los distintos tipos de cáncer colorrectal en la población Española. Modificado de Piñol et al. 2005⁸.

I.1.4 FACTORES DE RIESGO.

El CCR se considera una enfermedad multifactorial causada por la interacción entre factores genéticos de susceptibilidad y factores de riesgo presentes en el ambiente². Así se consideran factores de riesgo:

- **EDAD:**

La probabilidad de padecer cáncer colorrectal aumenta al envejecer. Aunque la enfermedad puede presentarse a cualquier edad, la mayoría de las personas a las que afecta el cáncer colorrectal son mayores de 50 años.

- **DIETA Y HÁBITOS ALIMENTICIOS:**

Teniendo en cuenta las variaciones mundiales de la incidencia del CCR, la dieta correspondería al factor de riesgo ambiental más importante. Algunas evidencias sugieren que el desarrollo de cáncer colorrectal puede estar relacionado con una dieta rica en grasa y calorías y pobre en alimentos con fibra, tales como grano integral, frutas y verduras. Los investigadores están explorando el papel que tienen éstos componentes dietéticos y otros en el desarrollo del cáncer colorrectal. Existen también estudios que sugieren que un estilo de vida sedentario puede estar relacionado con un riesgo mayor de cáncer colorrectal. Por el contrario, las personas que hacen ejercicio con regularidad pueden tener un riesgo menor de padecer esta enfermedad. Existe una gran controversia en cuanto a los efectos que estos factores ambientales tienen sobre la predisposición o protección (tabla 1).

Tabla 1: Factores ambientales de riesgo y protección ante el CCR. Adaptada de la revisión de De la Chapelle. 2004²

Factores ambientales de riesgo	Factores ambientales que proporcionan protección
Ingesta de grasas	Vegetales
Carne	Antiinflamatorios no esteroideos: aspirina
Alcohol	Actividad física
Tabaco	Terapia de reemplazamiento hormonal

- **ANTECEDENTES PERSONALES:**

Una persona que ya ha tenido cáncer colorrectal tiene un mayor riesgo de que se presente una segunda vez. Además, existen estudios que muestran que algunas mujeres con antecedentes de cáncer de ovario, de útero o de mama tienen una probabilidad mayor que la media de padecer cáncer colorrectal. Dentro de los antecedentes personales se consideran de alto riesgo:

1. **Pólipos:** Los pólipos son tumores benignos que sobresalen en la pared interna del colon o recto y son relativamente comunes en las personas mayores de 50 años. Aunque en su mayoría los pólipos son benignos, los expertos piensan que la mayor parte de los casos los cánceres colorrectales se desarrollan a partir de la malignización de ciertos pólipos, denominados adenomas. Por

esto, la detección y extirpación de estos tumores puede ayudar a prevenir el cáncer colorrectal.

2. Colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn: La colitis ulcerosa es una afección que causa inflamación crónica y llagas (úlceras) en el revestimiento del tracto gastrointestinal, más frecuentemente en el intestino delgado. Las personas con enfermedad de Crohn pueden tener más probabilidades de padecer cáncer colorrectal que las que no padecen esta afección¹³.

- **HISTORIA FAMILIAR:**

Los familiares cercanos (padres, hermanos o hijos) de una persona que ha tenido cáncer colorrectal tienen más probabilidades de desarrollar este tipo de cáncer ellos mismos, especialmente si el pariente desarrolló el cáncer cuando era joven. Si varios miembros de la familia han tenido cáncer colorrectal, el riesgo aumenta todavía más¹⁴ (tabla 2).

Tabla 2: Estima de los valores absolutos y relativos de riesgo de desarrollo de CCR dependiendo de la historia familiar. Adaptada de Johns et al. 2001¹⁴.

Historia Familiar	Riesgo relativo de CCR	Riesgo absoluto de CCR a los 79* años
Sin historia familiar.	1	4%
Un pariente de primer grado con CCR	2.3 (95% CI, 2.0-2.5)	9%*
Más de un pariente de primer grado con CCR	4.3 (95% CI, 3.0-6.1)	16%*
Un pariente de primer grado diagnosticado de CCR antes de los 45 años.	3.9 (95% CI, 2.4-6.2)	15%*
Un pariente de primer grado diagnosticado de adenomas colorrectales.	2.0 (95% CI, 1.6-2.6)	8%*

* El riesgo absoluto de CCR en individuos con antecedentes familiares fue calculado utilizando el riesgo relativo de CCR y el riesgo absoluto de CCR a los 79 años. C.I. Intervalo de confianza.

- **LOCI DE ALTA PENETRANCIA:**

Se denomina penetrancia de una mutación a la probabilidad de que el portador de dicha mutación exprese el fenotipo asociado a ésta. Los *loci* de alta penetrancia responsables de la susceptibilidad a CCR son principalmente los genes implicados en el desarrollo de los distintos síndromes hereditarios (tabla 3). Dentro de estos síndromes destacan:

1. Síndrome de Lynch/cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC): Este síndrome está causado, en el 3% de los casos, por mutaciones germinales en los genes implicados en la reparación del DNA (genes *MMR* o *Mismatch repair*): *MLH2*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Las mutaciones causales en alguno de estos genes tienen una penetrancia del 80%¹⁵.

2. Poliposis Adenomatosa Familiar: Su diagnóstico genético se basa en el estudio del gen *APC* que se encuentra mutado en un 80-90% de los casos de FAP¹⁶. Las mutaciones en este gen tienen una penetrancia de casi el 100%, aunque con fenotipo variable, inter e intrafamiliar¹⁷.
3. Poliposis asociada a *MUTYH* (MAP): Esta entidad clínica fue descrita como tal recientemente^{18, 19}. Se encuentra vinculada a mutaciones en el gen *MUTYH* (*MYH*), gen que participa en la ruta de reparación BER (*Base excision repair*). MAP explica alrededor del 1% de los CCR y un tercio (30%) de los casos de pacientes con 15-100¹⁶. La penetrancia de las mutaciones bialélicas en este gen es próxima al 100%²⁰.

Existen otros síndromes polipósico asociados a la predisposición a padecer CCR, como son los Síndromes de poliposis hamartomatosa (0,1%): Peutz-Jeghers (*LKB1*), Poliposis Juvenil o Síndrome de Cowden (*SMAD4* y *BMPR1A*). El estudio más pormenorizado de los síndromes hereditarios de predisposición al CCR y de los genes responsables de éstos se realizará en apartados posteriores.

Tabla 3: Principales síndromes hereditarios y sus loci de susceptibilidad.

Síndrome	Gen causal	Penetrancia	Riesgo absoluto en portadores de mutaciones	Referencias	
Poliposis Adenomatosa Familiar	Poliposis Adenomatosa Familiar clásica	<i>APC</i>	100%	90% a los 45 años.	21
	Poliposis Adenomatosa Familiar atenuada	<i>APC</i>	80%	69% a los 80 años.	21
Poliposis asociada al gen <i>MUTYH</i> .	<i>MUTYH</i>	100%	Sin establecer	17	
Síndrome de Lynch	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i>	80%	80% a los 75 años.	22	
Síndrome de Peutz-Jeghers	<i>LKB1</i>	40%	39% a los 64 años.	23	
Poliposis Juvenil	<i>SMAD4</i>	10-40%	17%-68% a los 60 años.	24	

Se han identificado otros *loci* de predisposición al CCR mediante la realización de estudios de ligamiento en gemelos concordantes (en los que se observa la misma enfermedad) y discordantes (en los que no se observa la misma enfermedad en cada uno de ellos) para CCR. Con ello se ha localizado un *locus* de 25cM que parece producir susceptibilidad en el cromosoma 9q (da una señal fuerte en gemelos discordantes) que parece estar asociado con un 36% de los casos de CCR. Los genes aquí localizados no se han identificado²⁵. Se ha descrito otro *locus* implicado en susceptibilidad a CCR solo en poblaciones de judíos Askenazi^{26,27}. Este *locus* se localiza en el cromosoma 15q y fue identificado por análisis de ligamiento. Se ha observado pérdida de heterocigosidad en esta región en pacientes con CCR esporádico²⁸. Al

igual que ocurre en el caso anterior, el *locus* contiene gran cantidad de genes entre los cuales se localizará el responsable de la susceptibilidad, pero éste aún no ha sido identificado. También se han descrito fenómenos de amplificación en el cromosoma 20q y de pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 8q que parecen contribuir a una predisposición a CCR^{29,30}.

- **LOCI DE BAJA PENETRANCIA Y GENES MODIFICADORES:**

Se dice que la penetrancia de un *loci* es baja cuando es menor de 25%. En estos casos la identificación de este alelo se hace muy compleja, ya que no es posible realizarla utilizando estudios de ligamiento debido a que individuos no afectados pueden ser portadores del alelo asociado a la enfermedad. El descubrimiento en los años 90 de los polimorfismos de secuencia de una única base (SNPs) permitió desarrollar la búsqueda de estas variantes de baja penetrancia y alta frecuencia a través de los “estudios de asociación”, en los que se comparan las frecuencias de los alelos candidatos entre grupos de casos y controles. La utilización de este tipo de estrategias ha permitido la identificación de diversos alelos de baja penetrancia presuntamente implicados en susceptibilidad al CCR³¹, entre los que destacan *APC**Ile1307Lys y *TGFβR1**6Ala, aunque también se han descrito otras variantes alélicas como *HARS1* VNTR, *MTHFR**β77Val, *BLM**Ash, *APC**Glu1317Gln o *HFE**Cys282Tyr (tabla 4).

Tabla 4 Tabla de alelos de baja penetrancia implicados en el riesgo de padecer CCR. Adaptada de De la Chapelle 2004.²

Gen	Alelo*	Frecuencia en la población (%)	Riesgo relativo (95% ic)	Población	Riesgo atribuible de CCR
<i>APC</i>	<i>APC</i> *Ile1307Lys	5-7	1.5-2.2	Judíos Askenazi	3-7%
<i>TGFβR1</i>	<i>TGFβR1</i> *6Ala	14	1.20	Caucasoides	3%
<i>HARS1</i>	<i>HARS1</i> VNTR	1-6	2.50	Caucasoides	1-8%
<i>MTHFR</i>	<i>MTHFR</i> *β77Val	32-43	0.76	Caucasoides	Protector
<i>BLM</i>	<i>BLM</i> *Ash	0.8	2.4	Judíos Askenazi	1%
<i>HFE</i>	<i>HFE</i> *Cys282Tyr	26	1.4	Carolina del Norte. USA.	9%
<i>CCND1</i>	<i>CCND1</i> *870Ala	>60	1.7	Ingleses	24%

1. La transversión T→A *APC**Ile1307Lys confiere un moderado incremento del riesgo de padecer CCR en la población de judíos Askenazi, a pesar de su frecuencia polimórfica y la ausencia de efecto sobre la función proteica. Se ha descrito como polimorfismo fundador en población judía Askenazi, con una frecuencia de heterocigotos en esta población es del 5-7% en población normal y del 8-15% en judíos con CCR³². Esta variante se asocia con un riesgo moderado de desarrollar CCR^{32,33}. El riesgo relativo de los portadores de ésta ha sido muy debatido, pero se establece en 1,5-2,2^{34,35}. A pesar de ser un tipo de mutación de cambio de sentido (*missense change*), la p.Ile1307Lys está situada en una región crítica del gen *APC*, lo cual sugiere un cierto efecto funcional. Sin embargo el mecanismo genético que subyace a esta aumento de riesgo

se basa en que esta transversión T→A genera una cola de 8 adeninas (A₈) que favorece el *slippage* de la polimerasa en esta zona y por tanto la aparición de errores del tipo inserción/delección durante el proceso de replicación en las células somáticas responsables de la predisposición al CCR^{32,36}. El análisis de los pólipos de pacientes portadores de la mutación p.Ile1307Lys no presentan *slippage* en el tracto A₈³⁵, pudiendo deberse a una combinación de diversos factores: sesgo de evaluación o a una variación en la tendencia del tracto A₈ a presentar *slippage*.

2. El alelo *TGFBR1**6Ala aparece mutado en el 80% de los tumores en caucosoides. La base genética de la susceptibilidad al CCR subyace en la localización de esta variante en un tracto de poliA cuyo número es variable según la población (6-9Ala). Esta secuencia repetitiva es la encargada de la transducción de señal en la proteína, de modo que cuanto menor es el número de adeninas, menos eficiente es la transducción². El meta-análisis de los estudios realizados es indicativo de un mecanismo de dosis alélica, en el que los portadores heterocigotos tienen un incremento del riesgo de sufrir CCR de un 19% y los homocigotos, del 70%³⁷.

Sin embargo, los estudios de asociación se han encontrado con un gran problema a la hora de identificar estas variantes, la falta de replicación de los resultados positivos en poblaciones independientes. Esto ha llevado a realizar modificaciones en el diseño, como el aumento del número muestral y favorecer la inclusión en el estudio de casos con historia familiar de la enfermedad (lo que aumenta el poder del mismo). Además, con el desarrollo del "Proyecto *HapMap*" se identificaron SNPs en regiones no codificantes, lo que permitió el desarrollo de una segunda aproximación: la "estrategia indirecta". En ella se utilizan una serie de polimorfismos (tagSNPs) que a través de las propiedades de "desequilibrio de ligamiento" del genoma, son capaces de proporcionar información genotípica no sólo de ellos mismos sino de otros SNPs que existen en su proximidad. Con este avance, junto con el desarrollo tecnológico de plataformas de genotipado masivo, se ha posibilitado la extensión de los estudios de asociación al genoma completo (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS), que han identificado diversos *loci* asociados al CCR en estos últimos años: 8q24³⁸⁻⁴⁰, 8q23 y 10p14⁴¹, 11q23 y 18q21⁴² y los SNPs rs4939827 del gen *SMAD7*⁴¹ y rs4779584 en *CRAC1*²⁷. Después de estos primeros resultados, quedan por identificar las variantes funcionales en desequilibrio de ligamiento con los *loci* identificados en el GWAS. Para ello, se requiere realizar una secuenciación masiva de los *loci* asociados, así como analizar un mayor número de muestras en *arrays* de mayor cobertura de SNPs.

El grado de penetrancia puede sufrir importantes modificaciones tanto inter como intrafamiliares. Sobre estas variaciones tienen gran importancia los genes modificadores, cuyo mecanismo subyacente está siendo clarificado mediante estudios de asociación caso-control. Los estudios de genes modificadores en humanos son difíciles, por lo que se realizan en ratón. Un ejemplo clásico viene de la mano del modelo *APC*^{Min/+} para el estudio de genes modificadores en FAP⁴³, donde se observan importantes variaciones fenotípicas (como es el número de pólipos) dependiendo del ambiente genético. Uno de los genes modificadores más importantes identificados mediante análisis de ligamiento ha sido el de *Mon-1*⁴⁴, gen modificador de gen de la fosfolipasa que se ha localizado en la misma región del cromosoma 4

que éste. Existe la duda de si habrá un gen modificador similar en humanos responsable de variar los niveles de penetrancia o expresión de las mutaciones^{45,46}.

I.2 VÍAS DE TUMOROGÉNESIS COLORRECTAL.

En la carcinogénesis colorrectal se han descrito varias vías por las cuales la célula colónica normal puede malignizar. Las alteraciones genéticas que se producen en cada una de estas vías se centran en 4 categorías fundamentales de genes: genes supresores de tumores (TSG, *tumors suppressor genes*) (*APC*, *DCC*, *SMAD2*, *SMAD4* y *p16INK4a*), oncogenes (*TP53*), protooncogenes (*K-ras*) y genes reparadores del ADN (genes *MMR* o *MUTYH*).

La primera vía descrita, recogida en el modelo genético de Fearon y Vogelstein⁴⁷, es la **vía supresora o de inestabilidad cromosómica**. En esta vía están incluidos los tumores de la FAP y el 80% de los tumores esporádicos. El tumor generado por alteración de esta vía desarrolla inestabilidad cromosómica (CIN): frecuentes alteraciones citogenéticas y pérdida de heterocigosidad alélica⁴⁸. Este modelo propone que la secuencia histopatológica de progresión del CCR se debe a mutaciones en genes concretos, principalmente genes supresores de tumores (TSG). La secuencia de cambios se iniciaría con la mutación o pérdida del gen *APC* (5q21-q22), seguida de mutaciones en *KRAS* (12p12.1) y las mutaciones en *TP53* (17p13.1) y *DCC* (18q21.3). El gen *APC* aparece mutado en un 70-80% de los tumores colorrectales y hasta un 50% de ellos muestran mutaciones independientes en la β -catenina, destacando el papel preponderante de la vía *wnt* para el control de la tumorogénesis colorrectal sobre todo en sus estadios iniciales⁴⁹. Las mutaciones en el oncogén *K-ras* se producen durante un estadio adenomatoso más avanzado, afectan preferentemente a sus codones 12 y 13, y se encuentran hasta en el 40% de los tumores colorrectales⁵⁰. En 18q21 se sitúa el gen *DCC* con una función en el CCR todavía poco conocida. Sin embargo, el *TP53* juega un papel sobradamente divulgado en la proliferación y apoptosis, y su mutación, y consiguiente sobreexpresión proteica, precede a la transformación maligna en la mayoría de los cánceres humanos y también en CCR⁵¹. El modelo se completó en 2002 con el descubrimiento de la MAP⁵². El patrón de mutaciones del gen *MUTYH* deriva en una deficiencia de la función proteica que se caracteriza por un exceso de transversiones G→T en secuencias GAA, que son susceptibles de provocar la aparición de codones de parada. Debido a que *APC* contiene un elevado número de estas secuencias (216), las mutaciones en *MUTYH* incrementan la tasa de mutación somática de *APC*, el cual a su vez inicia la transformación neoplásica⁵³ (figura 5).

Diez años después el modelo de Fearon-Vogelstein se sigue considerando válido para ilustrar el concepto *multistep* de la progresión tumoral, pero es necesario hacer algunas puntualizaciones. Hay que tener en cuenta que la secuencia de alteraciones propuesta es el resultado de un análisis estadístico en el que las alteraciones de tumores de diferentes pacientes se agrupan para formar un único modelo del proceso. Por tanto esto no implica que en un individuo se tengan que dar todas las alteraciones.

La segunda vía, es la **vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites**, dentro de la cual estarían incluidos los tumores del Síndrome de Lynch y un 15% aproximadamente de los tumores esporádicos. Esta vía explicaría la aparición del CCR en los casos de deficiencia en el sistema de reparación de errores de *mismatch* (MMR) o desapareamiento de bases, en los que las mutaciones en los genes *MMR* provocan un estado de inestabilidad genómica que conlleva la aparición de un fenotipo “hipermutador”, también conocido como inestabilidad de microsatélites (MSI)⁵⁴. Este fenotipo se produce porque la alteración de los genes *MMR* favorece la aparición de nuevas mutaciones, predominantemente en secuencias repetitivas (*loci* microsatélite) del tipo AA[A]NAA o CA[CA]NCA generando una inestabilidad en las regiones microsatélite que se contraen o expanden por la inserción o deleción de unidades de repetición^{55,56}. Esto produce la inactivación de diversos tipos de genes, como los que regulan la apoptosis(como es el caso de los genes *BAX*⁵⁷ o *Caspasa-5*⁵⁸, genes implicados en el control y regulación del crecimiento celular(como *TGFβRII*⁵⁹ *WISP-3*⁶⁰ o *IGFIR*⁶¹ o incluso genes *MMR* (como *MSH3* o *MSH6*)⁶²(figura 5).

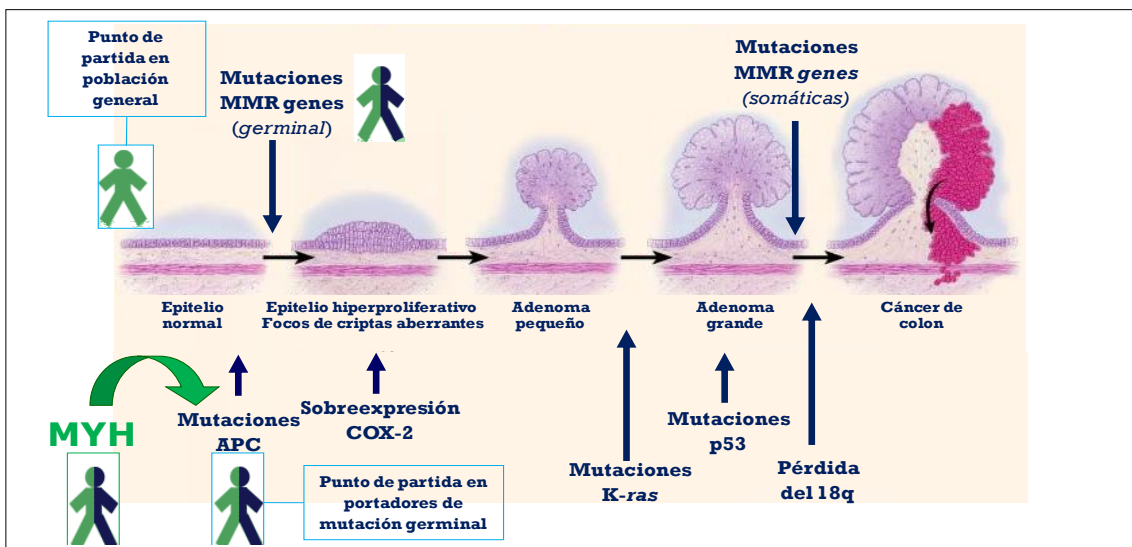


Figura 5: Modelo genético de cáncer colorrectal resultado de la combinación de diferentes vías de tumorigénesis. Se presentan la aparición progresiva de mutaciones somáticas durante el proceso carcinogénico. Modificado de Fearon et al. 1990⁴⁷.

Existen una serie de criterios que han de cumplirse para el desarrollo del CCR según los modelos descritos anteriormente:

1. Es necesario que se produzcan mutaciones en al menos 4 ó 5 genes para la formación de un tumor maligno.
2. Las alteraciones genéticas ocurren en una secuencia preferente, y es la acumulación total de los cambios la responsable del desarrollo neoplásico.
3. Las mutaciones deben provocar la inactivación de TSG o la activación de oncogenes. Generalmente lo que se produce es la inactivación de un alelo de un TSG, y esta mutación repercute en el fenotipo aún apareciendo en heterocigosis. De acuerdo con la hipótesis del “two-hit” de Knudson, para la

desactivación de un TSG serían necesarios dos eventos mutacionales, uno que inhabilitase cada alelo. La explicación radica en que estos TSG no actúan como recesivos a nivel molecular⁶³ y esto se debe a que la mutación de este primer alelo determina la aparición de un evento. Los genes reparadores actúan de manera similar a los TSG, de modo que mutaciones en heterocigosis presentan un efecto dominante⁶⁴.

La epigenética ha sido descrita como uno de los mecanismos alternativos de carcinogénesis, a pesar de que no implique ninguna alteración genética⁶⁵. Hoy el silenciamiento epigenético, o **vía del fenotipo metilador o CIMP** (*CpG island methylator phenotype*), se reconoce como la tercera vía del modelo de Knudson de tumorigénesis colorrectal⁶⁶. Estas modificaciones epigenéticas se mantienen a lo largo de las generaciones celulares, están mediadas por la acción de las enzimas DNA-metiltransferasas (DNMTs)⁶⁷ y generan inestabilidad genética como resultado de la inactivación de TSGs o genes reparadores (MSI o CIN)⁶⁸. Las causas que activan el proceso de hipermetilación no están nada claras. La variabilidad del índice de metilación en los distintos tipos tumorales revela que este mecanismo no se realiza aleatoriamente, sino que sigue un patrón que no ha podido ser todavía establecido⁶⁹. Se sabe que factores ambientales (lesiones por agentes quimioterápicos o la ingesta de folatos) y genéticos regulan este fenómeno, aunque no se conoce muy bien cómo. Atendiendo al grado de hipermetilación de un tumor se habla de: CIMP-H y CIMP-L^{70,71,72,73}. Muchos genes de alta penetrancia implicados en susceptibilidad al CCR se sabe que son inactivados mediante hipermetilación de sus promotores, como es el caso del gen *MLH1*^{74,75} o *APC*⁷⁶. Se ha demostrado que un alto porcentaje de tumores CCR con MSI son consecuencia de la inactivación epigenética del promotor de *MLH1*⁷⁷. Esta hipermetilación aberrante de las citosinas de la región 5' de sus islas CpG genera una pérdida de expresión de transcripto y consecuentemente de la proteína⁷⁸. Existe una correlación directa entre la hipermetilación del promotor de *MLH1* y mutaciones en el gen *BRAF*⁷⁹. La inactivación de alguno de los genes reparadores produce según el modelo de sucesión tumoral acumulaciones en genes como *APC*, *KRAS2*, *AXIN2*, *BRAF* y *TP53*. Se realizaron estudios para intentar establecer una correlación entre la inactivación epigenética de *MLH1* y mutaciones en estos genes. El resultado fue que tan solo se estableció una correlación directa con el gen *BRAF* (P= 0.003), concretamente la mutación p.Val600Glu localizada en el segmento de activación (exón 15) de este gen^{80,81}. *BRAF* es un protooncogén que codifica para una proteína perteneciente a la familia de las proteínas raf (Ser-Tre-Kinasa) que está implicada en la regulación de la ruta de señalización MAPK/ERKs y por tanto en regulación de la división, diferenciación y secreción celular⁸². La relación que existe entre las alteraciones epigenéticas en *MLH1* y *BRAF* es muy directa (68,8%)⁷⁹ lo que explica su uso como marcador clínico (100% especificidad y 48% sensibilidad)⁸³. Ha de tenerse en cuenta que esta relación directa implica que las mutaciones en este gen no son una consecuencia directa una actividad del sistema MMR *per se*⁸⁴.

El fenotipo resultante de la alteración de cada una de estas vías (CIN, MSI y CIMP) están adquiriendo una gran importancia como marcador en la clasificación molecular del CCR⁷³.

I.3 CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO VS FAMILIAR.

En los últimos años, la confirmación de la hipótesis del “two-hit” de Knudson ha cambiado la percepción de la contribución genética a muchos tipos de cáncer, que hasta la década de los 80 se creían predominantemente ambientales. El análisis extensivo de gemelos ha sugerido que esta susceptibilidad genética puede explicar cerca del 35% de los casos de CCR², pero los genes de susceptibilidad de alta penetrancia identificados como responsables de los síndromes de herencia mendeliana, sólo explican el 5% de estos casos⁸⁵. Se piensa por ello que la susceptibilidad genética a desarrollar CCR (95% de los caso) se debe a la combinación del efecto de los alelos de baja penetrancia, que ejercen de forma individual un efecto muy pequeño sobre el riesgo a desarrollar CCR (figura 6).

Exceptuando el caso de los síndromes hereditarios de predisposición al CCR, es prácticamente imposible determinar si un cáncer familiar se debe a una predisposición genética en la familia o si es cosa del azar. Algo similar ocurre con los casos de CCR esporádicos, donde la aparente ausencia de historia familiar de cáncer podrían no ser cierta y deberse al azar, al reducido tamaño de las familias (el extremo sería la adopción) o la pobreza en el diagnóstico de cáncer de miembros de la familia. La existencia de una susceptibilidad genética subyacente en los casos de CCR esporádico y familiar hace que en ocasiones la diferenciación entre ambos sea fífcil (figura6).

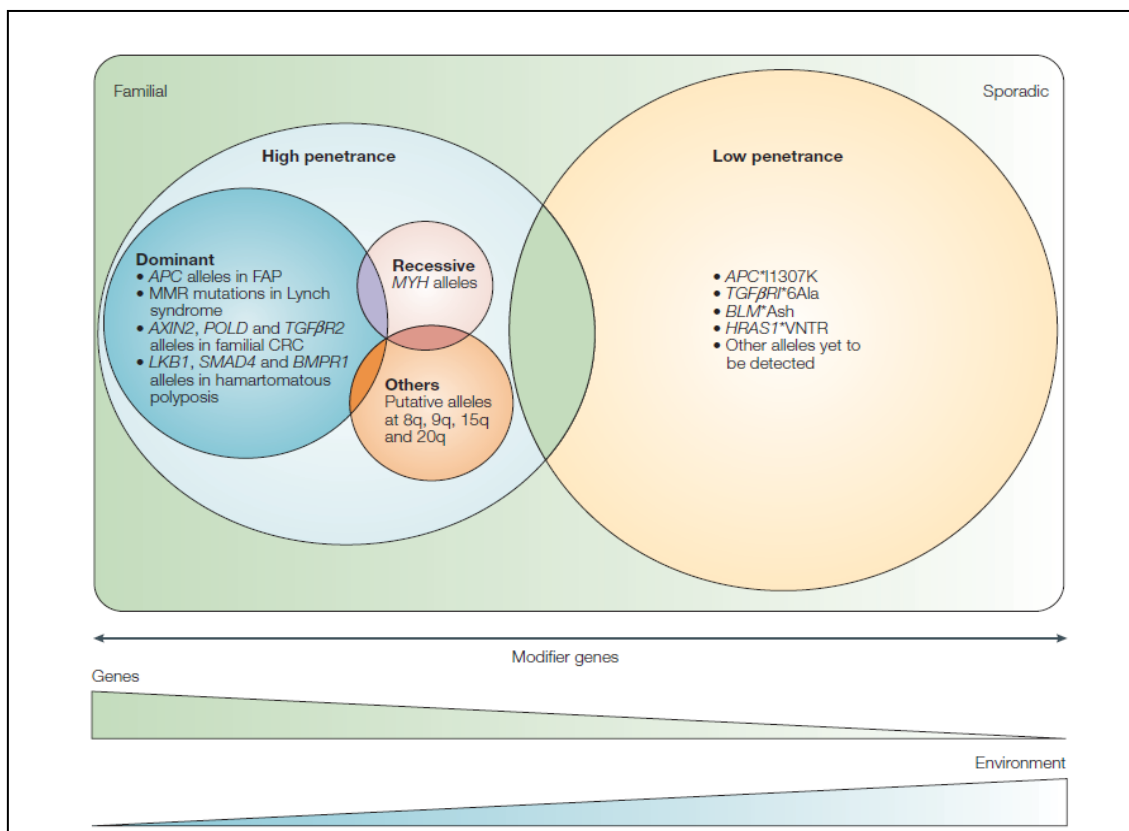


Figura 6: Visión global de la contribución genética al CCR. Adaptado de la revisión de De la Chapelle et al.2004².

El CCR es el segundo cáncer más común en términos de heredabilidad (35%) después de cáncer de próstata (42%)² (tabla 5). La estimación de los valores de heredabilidad de una enfermedad se obtiene mediante estudios de cohortes y de gemelos. La realización de estudios de cohortes permite medir la contribución de un gen al fenotipo de una enfermedad mediante la observación de la historia familiar de cohortes de individuos que padece dicha enfermedad. El número de pacientes de primer grado que presentan la enfermedad es apuntado. La relación obtenida entre pacientes y parientes afectados se compara con una cohorte control lo que permite obtener una relación que establece el grado de riesgo familiar. Este estudio elimina la influencia de las fenocopias pero no los efectos del ambiente. Para minimizar los efectos del ambiente se realizan los estudios en gemelos, donde la contribución de factores hereditarios a un fenotipo y la contribución del ambiente pueden ser perfectamente medidas si comparamos la concordancia para una enfermedad en gemelos monocigóticos y dicigóticos.

Tabla 5: Tabla de valores de heredabilidad para distintos tipos de cáncer. Adaptada de la revisión de de la Chapelle 2004².

Tipo de cáncer	Estudio en 1 familia. (Ratio de riesgo)	Estudio en 2 familias. (Ratio de riesgo)	Proporción de varianza por factores hereditarios.
Testículo	8.57	850	ND
Tiroides	8.48	12.42	ND
Laringe	8.00	ND	ND
Mieloma múltiple	4.29	5.62	ND
Pulmón	2.55	3.16	0.26
Colorrectal	2.54	4.41	0.35
Próstata	2.21	9.41	0.42
Melanoma	2.10	3.41	ND
Mama	1.83	2.01	0.27

ND: No determinado

Bajo el modelo de herencia poligénica, la hipótesis más aceptada de predisposición a las enfermedades complejas es la denominada “enfermedad común-variante común”. Esta hipótesis postula que las variantes que predisponen al desarrollo del CCR son relativamente frecuentes en las poblaciones, y es la presencia de un número más o menos elevado de estos alelos en el individuo lo que incrementa el riesgo de desarrollar la patología. La interacción de estos factores genéticos con el ambiente modularía finalmente este riesgo para determinar qué individuos desarrollan la enfermedad. Estos alelos de baja penetrancia podrían explicar el factor genético subyacente de los CCR familiares y probablemente también de los esporádicos, y así se podría explicar la alta incidencia poblacional del cáncer². La identificación de este tipo de alelos se realiza mediante estudios de asociación caso-control.

I.4 SÍNDROMES HEREDITARIOS.

I.4.1 SÍNDROMES POLIPÓSICOS:

I.4.1.1 POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR:

- **CRITERIOS CLÍNICOS:**

La Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP, OMIM #175100) fue descrita por Sklifasowski en 1881⁸⁶. Es el síndrome polipósico más frecuente, responsable del 0,1-1%⁸⁷ de los casos de CCR. Posee una incidencia del 1 caso por 10.000-20.000 habitantes, (enfermedad rara)⁸⁸. Se caracteriza por la presencia de cientos o miles de adenomas o pólipos adenomatosos a lo largo del colon, con tendencia al desarrollo en la zona distal. Estos pólipos funcionan como lesiones pre-malignas, que normalmente malignizan si no se tratan, transformándose en adenocarcinomas en la segunda o tercera década de vida⁸⁷. El desarrollo de pólipos suele iniciarse a partir de la pubertad (16 años, con un rango de 7-36 años)⁸⁹, aunque habitualmente no ocasiona sintomatología hasta los 30-35 años de edad. A la edad de 10 años aproximadamente un 15% de los pacientes presentan adenomas, a los 20 años esta probabilidad aumenta a un 75%, a los 30 años las probabilidades de desarrollar una FAP llegan al 90% y al 100% a los 39 años¹⁶. Se considera que entre el 80-90% de las familias afectas de FAP clásica presentan mutaciones en el gen *APC* en línea germinal. La genética de la FAP es similar a la de otros síndromes en la que se encuentran implicados genes supresores. Es característico de este síndrome su expresividad variable que comúnmente (40% de los casos) se acompaña de manifestaciones extracolónicas muy útiles para su diagnóstico: hepatoblastoma en la infancia, tumores cerebrales, osteomas, pólipos gástricos⁹⁰, anomalías dentales, carcinoma periampular, quistes epidermoides^{91,92}, ampolla del Vater^{93,94} y más comúnmente carcinoma papilar de tiroides e hiperplasia congénita del epitelio pigmentario de la retina (CHRPE)⁹⁵. Atendiendo al número de pólipos la FAP se clasifica clínicamente como⁹⁶:

1. Poliposis Adenomatosa Familiar Clásica (FAP): Se caracteriza por una clínica de cientos a miles de pólipos adenomatosos a lo largo del intestino (figura 7A) con tendencia al desarrollo en la zona distal.
2. Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada (AFAP): Es una variante atenuada de la Poliposis Adenomatosa Familiar caracterizada por un fenotipo de menos de 100 pólipos en la región colónica más proximal (figura 7B).

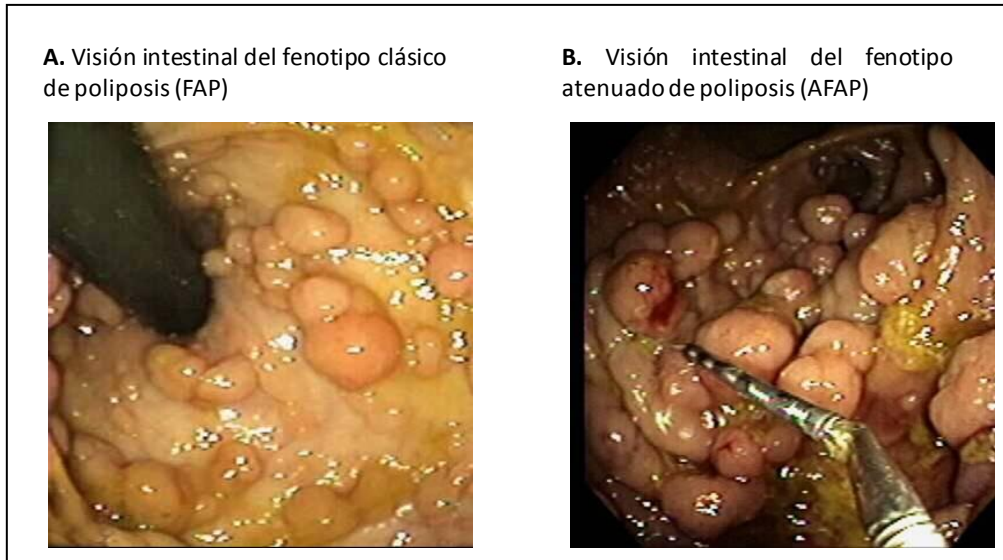


Figura 7: Fenotipo polipósico de la FAP y AFAP. Adaptada de www.cancer.gov.

La Poliposis Adenomatosa Familiar es una entidad clínica caracterizada por una alta heterogeneidad fenotípica inter e intrafamiliar. Esta variabilidad parece residir en la actuación de genes modificadores y dificulta en ocasiones la diferenciación clínica entre la poliposis clásica y atenuada⁹⁷. Existe una falta de consenso a la hora de realizar el diagnóstico de la AFAP por lo que Nielsen *et al.*⁹⁸ propuso los siguientes criterios diagnósticos:

1. Ningún familiar con más de 100 pólipos antes de los 30 años.
2. Al menos dos familiares con 10-99 adenomas diagnosticados después de los 30 años o un familiar con 10-99 adenomas diagnosticado después de los 30 años y un familiar de primer grado con CCR y pocos adenomas.

El riesgo de CCR en pacientes AFAP no está clara, el riesgo acumulativo a los 80 años se estima que es del 70%⁹⁹. La edad promedio de diagnóstico es de 50 a 55 años, 15 años menos que la FAP clásica pero a edades más tempranas que el CCR esporádico^{100,101}.

- **GEN Y LA PROTEINA APC:**

La base genética que subyace a este síndrome reside en mutaciones germinales en el gen APC (*Adenomatous Polyposis Coli tumor suppressor gene*, OMIM 611731, 5q21-q22). Este gen tiene una ORF de 8535 pb distribuidos en 21 exones¹⁰², 15 de ellos codificantes, que se expresan en todos los tejidos. Dentro de los exones no codificantes se localiza una región denominada exón N en la que se encuentran las dos regiones promotoras de este gen (1A y 1B), caracterizadas por un alto contenido en GC (75%) en 857-957pb y la carencia de las cajas CAAT y TATA. Una característica importante de este gen es el gran tamaño del exón 15 (6574pb y 2.843 aminoácidos) que representa aproximadamente el 77% de la región codificante. El gen APC se agrupa dentro de los genes *housekeeping* (HK).

Fue localizado 1986 en familias con poliposis adenomatosa familiar (FAP) que presentaban el Síndrome de Gardner en los que se observaba la delección de la banda 5q21¹⁰³. Se mapeó en 1987 por análisis de ligamiento en familias FAP^{104,105} y en 1991 se consiguió su clonación posicional de forma independiente por dos grupos¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ en una región de 5,5Mb asociada a FAP que englobaba a varios genes que se expresaban en tejido normal de mucosa colónica, entre los que se encontró *APC*.

Este gen se caracteriza por presentar con frecuencia *splicing* alternativo que puede afectar a distintos exones. Existen 6 mecanismos de *splicing* alternativo en este gen responsable de la heterogeneidad de su mRNA:

1. El *splicing* alternativo de los exones 8 al 15 del gen *APC* es el responsable de la alta variabilidad de las isoformas de la proteína.
2. Expresión facultativa del exón 9: Se han descrito dos formas alternativa para el exón 9 del gen *APC*, una que es el exón completo y la otra (9A) es el resultado de un *splicing* en el interior del exón que elimina 101 aminoácidos (de la base 934 a 1235 en el mRNA) de la proteína^{108,110}.
3. Exón 10A: Descrito por Sulekova *et al.* y Xia *et al.* en 1995¹¹¹ como un nuevo exón del gen *APC* resultado de un *splicing* alternativo del exón 10, 1.6-kb *downstream* de éste. Es el más pequeño de los exones del gen *APC* (54pb) y presenta un motivo de repeticiones y se encuentra altamente conservado. Se inserta *in-frame* dentro del transcrito proporcionando a la proteína APC con 18 aminoácidos adicionales. Las secuencias flanqueantes a este exón se incluyen dentro del procedimiento de *screening* de mutaciones¹⁰⁸.
4. *skipping* del exón 14: La pérdida de este exón tiene como consecuencia la conexión de los exones 13 y 15¹¹². El evento que genera este salto de exón ocurre en el mRNA y tiene como consecuencia la reducción de la ORF del exón 15, la cual termina 19 codones después del inicio del exón. La mayor parte de las isoformas que presentan este *splicing* lo hacen en combinación con el *splicing* alternativo del exón 10¹¹¹.
5. *Skipping* del exón 7 es otra isoforma que se encontró en ratón como en células humanas y conecta directamente los exones 6 y 8. Estas dos isoformas (sin y con exón 7) se presentan de un modo diferencial en los tejidos¹¹³.
6. Múltiples isoformas generadas por el *splicing* alternativo del exón 1: Thliveris *et al.*¹¹⁴ identificó en 1994 tres exones en la región 5' del exón 1 (0.1, 0.2 y 0.3 o exón 1A) aislados a partir de cDNA de células de retina fetal. Estas variantes de *splicing* del exón 1 resultan de la combinación de las secuencias 5' del exón N con el exón 1, que mediante un mecanismo de regulación transcripcional muy complejo genera 6 isoformas distintas de la proteína¹¹⁴. Es por este motivo que la regulación transcripcional de este gen es muy compleja. Horii *et al.*¹¹⁵ también identificaron estos exones así como uno específico de cerebro denominado como exón BS. Esta expresión diferencial de APC parece

vincularse a la variación en las manifestaciones de fenotipo o tejido-específicas de el CCR. Estos 4 exones se expresan alternativamente y parecen ser específicos de distintos tejidos. La forma alternativa del exón 1 0.3 parece ser el exón mayoritario.

Múltiples estudios revelan que se trata de un gen con actividad supresora de tumores implicado en la regulación de las señales apoptóticas a través de la vía *wnt* y en la formación del huso mitótico. Todos los individuos portadores de una mutación en línea germinal en este gen (el primer evento mutacional o hit de acuerdo con la "*Knudson's two hit hypothesis*") predisponen al desarrollo de FAP. El desarrollo de tumores en FAP se produce tras un segundo evento mutacional o *hit* que ocurre en el pólipo colónico. Que cientos o miles de pólipos se formen entre los 15-40 años implica que tan solo dos mutaciones son necesarias para la iniciación de la tumorigénesis. El hecho de que tan sólo uno o unos pocos pólipos se malignicen indica que son necesarias algunas mutaciones adicionales, tal como establece el modelo de Fearon y Vogelstein⁴⁷.

El gen *APC* codifica una proteína notablemente hidrofóbica, con masa molecular de 311.8 kDa^{108,115}. Presenta varias isoformas de distinto peso molecular (90-300kDa) resultantes del fenómeno de *splicing* alternativo, que ocurre a nivel de mRNA, y a las modificaciones post-traslacionales. Esta proteína presenta una distribución citoplasmática difusa acumulándose principalmente a lo largo de los márgenes laterales o subapicales de las células¹¹⁶. La forma más abundante pierde el exón 10A y codifica para una proteína APC de 2843 residuos que se dividen en 7 dominios: un dominio de oligomerización y una región armadillo en el extremo amino-terminal, un grupo de repeticiones de 15 y 20 aminoácidos en su porción central y un extremo carboxilo-terminal que contiene un dominio básico y sitios de unión para otras proteínas.

1. Dominio de oligomerización: Se localiza en la región N-terminal de la proteína y consta de 7 repeticiones de 6-57 aminoácidos. Este dominio es el responsable de la formación de homodímeros de la proteína necesarios para que ésta se localice en su forma activa¹¹⁷.
2. Región Armadillo: Es una región altamente conservada localizada entre los aminoácidos 453 y 767 que le permite jugar un papel en la estabilización y motilidad del citoesqueleto, ya que APC se une a un factor intercambiador de nucleótidos de guanina estimulándolo (Asef) el cual posteriormente interactúa con Rac (GTP-asa perteneciente a la familia Rho) responsable del control de la adhesión y motilidad celular al controlar el citoesqueleto de actina. Además a nivel de este dominio también se produce el acoplamiento de la ruta *wnt* con la vía catalítica de la Axina, ya que APC presenta una zonda de alta homología de 7 repeticiones que interaccionan con la subunidad B56 reguladora de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), una enzima que acopla a la proteína APC con la vía catalítica de la Axina.
3. Repeticiones de 20 aminoácidos: La proteína APC presenta un dominio de 7 motivos de 20 aminoácidos repetidos altamente conservados, localizados

entre los residuos 1262 y 2030 de la región MCR, cada uno de ellos con la estructura TPXXFSXXXSL. Este dominio le confieren a la proteína APC sitios de unión para la β -catenina y funciona como sustrato de fosforilación para la glicogeno-sintasa-kinasa-3 β (GSK3 β .) La regulación de la β -catenina es dependiente de la presencia de un mínimo de 3 de las 7 repeticiones de estos 20 aminoácidos. Se supone que esta es una de las regiones susceptibles de mutación durante la tumoregénesis¹¹⁶.

4. Repeticiones de 15 aminoácidos: Es un dominio altamente conservado localizado entre el aminoácido 1020 y 1169 que engloba 3 repeticiones de 15 aminoácidos que funcionan como sitios de unión para la β -catenina¹¹⁸.
5. Dominio básico de APC: Este dominio se localiza en la región C-terminal (aminoácidos 2200 a 2400). Se denomina así por su baja proporción de residuos de Prolina y alta proporción de residuos Arginina y Lisina¹¹⁹ que parecen funcionar como dominio de unión a los microtúbulos.

Los múltiples dominios de APC le permiten interactuar con otras proteínas, teniendo cada dominio una función específica en el desarrollo de la actividad de la proteína¹¹⁹ (figura 8):

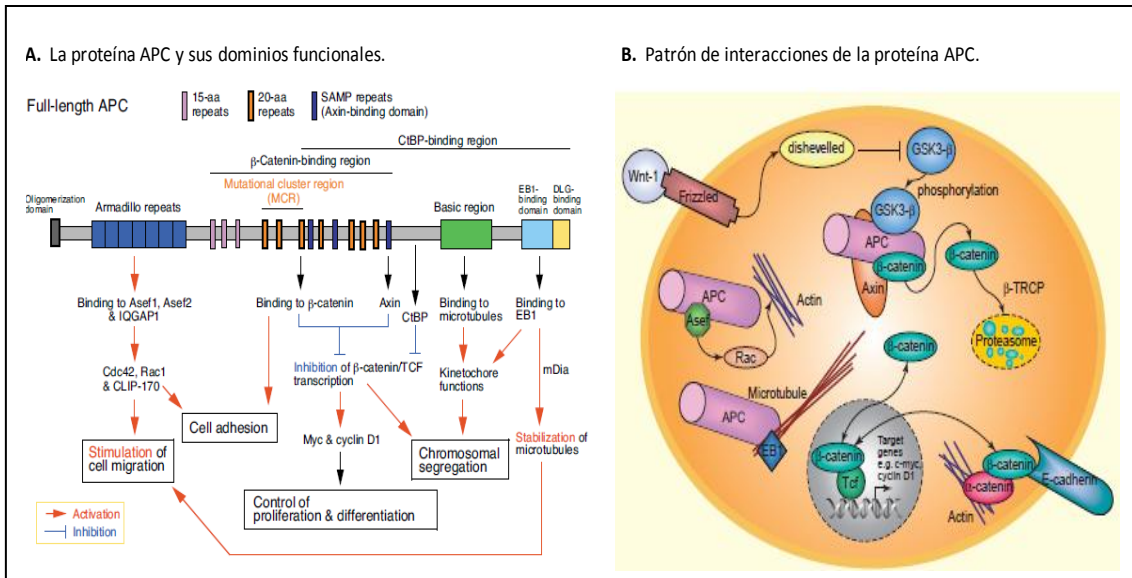


Figura 8: Estructura y función de la proteína APC. Adaptado de Aoki et al. 2007¹²⁰ y Sieber et al. 2000¹¹⁶.

A la proteína APC se le conocen diversas funciones¹²¹:

1. Regulación de los niveles de β -catenina y por tanto de las señales inducidas por la misma: La proteína APC funciona fundamentalmente como parte de un complejo con axina y la glicógeno sintasa quinasa-3-beta (GSK3- β), complejo que fosforila la vía *Wnt* de la β -catenina y la hace candidata para una degradación proteosómica¹²². La actividad del complejo parece estar ampliamente controlada por la fosforilación mediante la GSK3- β , y controlada

por la inactividad consecuente cuando la vía de señalización Wnt está activada. Las dos mutaciones *APC* en las células tumorales son coseleccionadas, hasta llegar a producir un nivel de β -catenina que resulta ser óptimo para la tumorigénesis¹²³.

2. Regulación de la adhesión celular a través de la β -catenina y la E-cadherina: Se ha observado en células tumorales que la inactivación del gen *APC* produce pérdida de la adhesión celular¹²⁰. Esto se debe a que la β -catenina interactúa con la E-cadherina, α -catenina y el citoesqueleto en células epiteliales. Se ha observado en ratón que mutaciones en la proteína *APC* reducen los niveles de E-cadherina en las membranas celulares al producirse la unión β -catenina / E-cadherina. Así *APC* controla la adhesión celular en base a los niveles de β -catenina y E-cadherina.
3. Regulación de la migración celular y la estabilidad cromosómica por mediación de la interacción con los microtúbulos. La proteína *APC* presenta dos dominios de unión con microtúbulos en su extremo C-terminal. Una región básica localizada entre los residuos 2200-2400 que media la interacción directa con los microtúbulos y otra región más carboxilo terminal localizada entre los residuos 2560-2843 que se une a EB1 (proteína de unión a microtúbulos y centrómeros). Parece que la unión¹²⁴ *APC/EB1* promueve la polimerización de los microtúbulos
4. Regulación de la función neural: El extremo C-terminal también se une con la proteína hDLG (*human homolog of Drosophila discs large tumour suppressor*), una molécula que se localiza habitualmente en las uniones célula-célula entre células epiteliales y terminaciones presinápticas del sistema nervioso central, y con la proteína tirosina fosfatasa PTP-BL¹¹⁶.
5. Bloqueo del ciclo celular tal vez mediante inhibición directa de los componentes del ciclo celular y por tanto regulación de la apoptosis: La acumulación de β -catenina, en el núcleo produce la activación de diferentes genes diana entre los que se encuentran genes reguladores de proliferación celular (*c-myc*, la *ciclina D1*, TCF1, efrinas y caspasas, entre otros...). La sobreexpresión de *APC* regula la progresión del ciclo celular ya que su sobreexpresión inhibe la progresión de la célula desde la fase G0/G1 a la fase S funcionando como un gen supresor tumoral. Por lo tanto problemas en la ruta *wnt* producirían un descontrol del ciclo celular¹²⁵.
6. Regulación de la motilidad celular: *APC* regula la polaridad celular y la migración a través del control del citoesqueleto de actina. *APC* interactúa con Asef, *Rac-specific GEF* y Proteína1 con motivo IQ de activación de la actividad GTP-asa.(IQGAP1) La interacción entre Asef y *APC* produce la estimulación de la actividad GTP-asa de Asef y la activación de Rac1, aplanamiento celular, erizamiento de la membrana, formación de lamelipodia y aumento de la migración celular¹²⁰. La interacción entre Asef y *APC* se produce a través del

dominio armadillo el cual se localiza en el extremo N'-terminal de la región MCR, por lo que mutaciones en esta zona pueden afectar a la motilidad celular

- **ESPECTRO MUTACIONAL Y CORRELACIONES GENOTIPO/FENOTIPO:**

El espectro de mutaciones del gen *APC* es muy amplio. Se estima que alrededor de un 70% de los pacientes con FAP clásica y un 10% de los pacientes con AFAP presentan mutaciones germinales en el gen *APC*¹²⁶. Más del 98% de las mutaciones germinales en *APC* tienen como consecuencia la síntesis de una proteína truncada¹²⁷. Las mutaciones *frameshift* son las más abundantes (48%)¹²⁸⁻¹³³ aunque también se han descrito grandes reordenamientos (8-12%)¹³⁰ del tipo deleciones exónicas y del gen completos. Alrededor de un 20% de las mutaciones son *de novo*¹³⁴.

La mayor parte de las mutaciones de línea germinal del gen *APC* ocurren entre los codones 168 y 1.580, y hay puntos calientes de mutación (*hotspots*) en los codones 1061 y 1309 (con unas frecuencias del 8% y 20% respectivamente)¹¹⁹, quizás porque estos sitios contienen secuencias cortas de repetición con tendencia a un deslizamiento espontáneo (*slippage*). La mutación en el codón 1309 es la más frecuente en el gen *APC* y se asocia a un fenotipo severo. Las mutaciones asociadas a este codón presentan un alto número de pólipos y una edad temprana de aparición de CCR¹³⁵. Esta mutación consiste en una deleción de 5pb (c.3927_3931delAAAGA)^{132,136} que genera un codón de parada prematuro en la posición 1312¹³⁷. Presenta una alta tasa de aparición *de novo* (29%) frente a la tasa típica en pacientes FAP familiar (6%). Se ha reportado la existencia de variabilidad inter e intrafamiliar¹³⁶ en portadores de esta mutación. La mutación en el codón 1061 es un poco menos frecuente y también es una deleción de 5pb (c.3183_3187delACAAA). Fue descrita por primera vez en línea germinal en Japón¹³⁸ y en una serie de pacientes de EEUU¹³⁹. Se cree que es responsable de un 11% de los casos de FAP^{140,119}. Los individuos con esta deleción presentan típicamente poliposis colorrectal a una edad promedio de 42 años.

La asociación genotipo-fenotipo en el gen *APC* es consecuencia de la pérdida de alguno de los dominios funcionales de la proteína como consecuencia de alguna mutación y parece además estar determinado por multitud de factores ambientales y genéticos. Así es importante destacar que una misma mutación genera distintos fenotipos y que un mismo fenotipo puede ser resultado de distintas mutaciones. Además, esta heterogeneidad se mantiene dentro y fuera de las familias, lo que sugiere que otros factores genéticos y/o ambientales deben de influir en el curso de la enfermedad. Se han descrito muchas asociaciones genotipo-fenotipo para el gen *APC* (tabla 6) que parecen relacionarse con la posición de la mutación heredada entre los codones 169 y 1600 del gen *APC* y la posible influencia genes modificadores.

Tabla 6: Tabla resumen de la correlación entre el la severidad del fenotipo FAP en cuanto a número de pólipos y la localización de las mutaciones en el gen APC. *Modificado de Nieuwenhuiet al. 2007¹⁴¹.*

Fenotipo	Número de codón	Autor, año	Referencia
Severo	1250-1464	Nagase <i>et al.</i> 1992, Bertario <i>et al.</i> 2003.	128,135
	1250-1311	Enomoto <i>et al.</i> 2000.	142
	1309-1324	Ficariet <i>et al.</i> 2000.	143
	1309	Caspariet <i>et al.</i> 1994, Gebertet <i>et al.</i> 1999, Friedlet <i>et al.</i> 2001, Bertario <i>et al.</i> 2003.	144,145,136,135
Clásico	157-1416	Walonet <i>et al.</i> 1997.	146
	170-1578 (excepto codón 1309)	Friedlet <i>et al.</i> 2001.	136
	179-625	Giardiello <i>et al.</i> 1997	147
	181-1110	Enomoto <i>et al.</i> 2000.	142
	208-232	Ficariet <i>et al.</i> 2000.	143
	213-1249	Nagase <i>et al.</i> 1992, Bertario <i>et al.</i> 2003	128,135
	414-423	Gebet <i>et al.</i> 1999	145
	437-1114	Ficariet <i>et al.</i> 2000.	143
	491-1028	Michilset <i>et al.</i> 2002.	148
	1347-1474	Michilset <i>et al.</i> 2002.	148
	1465-1597	Nagase <i>et al.</i> 1992, Bertario <i>et al.</i> 2003.	128,135
	1465	Enomoto <i>et al.</i> 2000.	142
	1556	Ficariet <i>et al.</i> 2000.	143
	Atenuado	Exones 3-4 y codones 141-177	Spirio <i>et al.</i> 1993.
5-158		Giardiello <i>et al.</i> 1997.	147
5-168		Soravia <i>et al.</i> 1998.	149
157-175		Enomoto <i>et al.</i> 2000.	142
139-156		Friedlet <i>et al.</i> 2001.	136

La mayoría de los pacientes FAP (más del 70%) desarrollan manifestaciones extracolónicas¹⁴³, la mayoría de ellas de poca relevancia clínica, pero algunas de las lesiones pueden causar serias complicaciones e incluso la muerte. Las manifestaciones clínicas más importantes asociadas a la FAP han podido ser correlacionadas con mutaciones en determinados codones y los correspondientes dominios proteicos (figura 9).

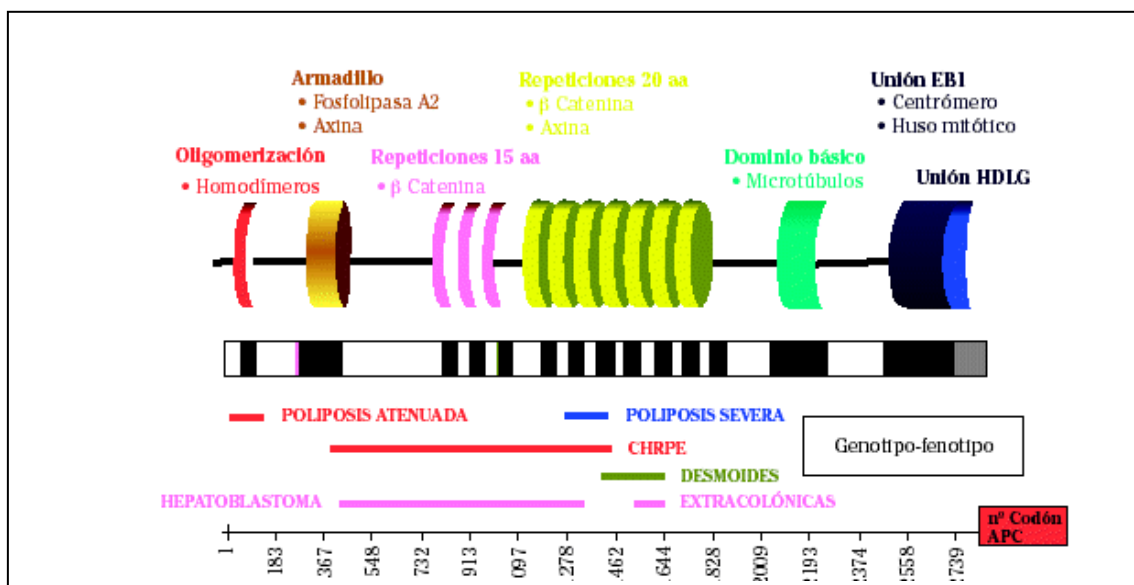


Figura 9: Esquema representativo de las distintas regiones del gen APC y de las relaciones genotipo-fenotipo de sus mutaciones. *Adaptada de Alonso et al. 2006¹⁵⁰.*

La correlación genotipo-fenotipo y la prevalencia de las manifestaciones de la FAP más comúnmente asociadas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7: Correlaciones genotipo/ fenotipo de las manifestaciones extracolónicas más típicas de la FAP.

Manifestaciones extracolónicas	Prevalencia %	Nº de codón	Autor/año	Referencia
CHRPE	70-75	311-1444	Davies <i>et al.</i> 1995	151
		413-1387	Caspari <i>et al.</i> 1995	152
		542- 1309	Giardiello <i>et al.</i> 1997, Bertario <i>et al.</i> 2003	147,135
		473-1307	Walton <i>et al.</i> 1997	146
		446-1338	Gebert <i>et al.</i> 1999	145
		564-1465	Enomoto <i>et al.</i> 2000	142
Tumores desmoides	10-15	1924, 1962	Eccles <i>et al.</i> 1996, Scott <i>et al.</i> 1996	153,154
		1445-1578	Caspari <i>et al.</i> 1995	152
		1444- 1560	Davies <i>et al.</i> 1995, Gebert <i>et al.</i> 1999	151,145
		1403-1987	Dobbie <i>et al.</i> 1996, Heinemann <i>et al.</i> 1998 Moisio <i>et al.</i> 2002	155,156,157
		1395-1493	Wallis <i>et al.</i> 1999	158
		1310-2011	Bertario <i>et al.</i> 2003	135
Pólipos gastrointestinales	-	1445-1578	Caspari <i>et al.</i> 1995	152
Pólipos de las glándulas fúndicas	40-50	No correlación	Enomoto <i>et al.</i> 2000	142
		1924	Eccles <i>et al.</i> 1996	153
Adenomas gástricos	5-20	1403-1987	Dobbie <i>et al.</i> 1996	155
		Exón 4, exón 15	Soravia <i>et al.</i> 1998	149
		1395-1493	Wallis <i>et al.</i> 1999	158
		564-1465	Enomoto <i>et al.</i> 2000	142
Adenomas duodenales	50-90	1403-1987	Dobbie <i>et al.</i> 1996	155
		Exón 4, exón 15	Soravia <i>et al.</i> 1998	149
		1395-1493	Wallis <i>et al.</i> 1999	158
		564-1465	Enomoto <i>et al.</i> 2000	142
		976-1067	Bertario <i>et al.</i> 2003	135
Manifestaciones extracolónicas múltiples	3	3_ 1445	Caspari <i>et al.</i> 1995	152
		3_ 1403	Dobbie <i>et al.</i> 1996, Heinemann <i>et al.</i> 1998	155,156
		1465, 1546, 2621	Giardiello <i>et al.</i> 1997	147
		1556	Walton <i>et al.</i> 1997	146
		1979	Brensinger <i>et al.</i> 1998	159
		976-1067, 1310-2011	Bertario <i>et al.</i> 2003	135

1.4.1.2 POLIPOSIS ASOCIADA A MUTYH (MAP).

- **CRITERIOS CLÍNICOS:**

La Poliposis asociada a *MUTYH* (MAP, OMIM #608456) fue identificada como entidad clínica por Al-Tassan *et al.*⁵² en 2002 mientras estudiaba una familia del Reino Unido “FAMILIA N*” en la cual 3 de 7 hermanos que presentaban un fenotipo AFAP en ausencia de mutaciones germinales en el gen *APC*. Cuando se analizaron los tumores de estos individuos se observó una alta e inusual proporción (83% vs. 10%) de transversiones somáticas en genes como *APC*, *KRAS*, *TP53*, *RB1*, *etc...* del tipo G: C→T: A¹⁶⁰. Esta alteración apuntaba directamente a defectos en el sistema de reparación del DNA por escisión de bases (BER) implicado en la reparación por daño oxidativo Al-Tassan *et al.*⁵² secuenció los 3 genes del sistema MMR (*OGG1*, *MUTYH* y *MTH1*) en la sangre extraída de los afectados de poliposis en la familia N y observó que estos eran portadores de dos mutaciones no conservativas en *MUTYH* (p.Tyr165Cys y p.Gly382Asp), bien en homocigosis o heterocigosis compuesta. El resto de los familiares no afectados eran heterocigotos para una de ellas o no portadores, lo que indica una transmisión de la enfermedad en esta familia con un patrón de herencia autosómico recesivo. Desde que se descubrió la asociación entre poliposis y *MUTYH* muchos estudios la han corroborado^{19,161-166}. Además Al-Tassan *et al.* observaron que las mutaciones somáticas generadas como consecuencia del déficit en el sistema BER ocurrían casi exclusivamente en secuencias del tipo GAA que pasaban a generar secuencias TAA responsable de la aparición de codones de parada(X) y por tanto proteínas truncadas. Los principales genes afectados por la acumulación de transversiones por deficiencias en el sistema BER son *APC* y el oncogén *KRAS*¹⁶⁷. El gen *APC* presenta alrededor de 216 GAA susceptibles de convertirse en codones de parada como resultado del fenómeno de transversión²⁰.

En el 2003 J. R. Sampson¹⁶¹ habla de una nueva forma recesiva y de alta penetrancia de poliposis asociada a mutaciones en el gen *MUTYH* (*MYH*, 1p34.3-p32.1) o MAP. Su clínica es similar a la FAP o AFAP pero no suele existir una historia clínica multigeneracional debida a su herencia recesiva. Los portadores de mutaciones en *MUTYH* necesitan de una mutación en cada alelo para que se desarrolle la enfermedad, de ahí que se hable de portadores monoalélicos y bialélicos de mutaciones en este gen. Los pacientes diagnosticados de MAP tienen una edad promedio de 45 años y desarrollan pólipos gastrointestinales en número variable y localización no preferencial entre 40-60 años, que nunca llegan a alcanzar la severidad de una FAP. Estos pólipos son generalmente pequeños, ligeramente displásicos y del tipo adenoma tubular¹⁶⁸. Un 25% de los pacientes MAP no presentan adenomas en el momento de diagnóstico de CCR mientras que un 50% presentan más de 15 adenomas sincrónicos y cáncer¹⁶. Los cánceres de colon derivados de MAP ocurren principalmente en el

*Familia N52: Familia afectada con múltiples adenomas colorrectales y carcinomas pero carente de mutaciones heredables en el gen *APC*. Sólo se encontraron en esta familia mutaciones somáticas en *APC* del tipo Transversión G: C → T: A en un mayor proporción que en los cánceres de tipo esporádico.

lado izquierdo del colon (71% de los casos) y no difieren mucho en estado, grado o histología de los CCR esporádicos.

Existe un limitado número de trabajos sobre las manifestaciones extracolónicas asociadas, pero que no son discriminatorias de la enfermedad ya que se han descrito pacientes sin ninguna manifestación¹⁶⁸. Estas manifestaciones son del tipo cáncer de esófago, cáncer gástrico, poliposis de las glándulas fúndicas, poliposis duodenal, carcinoma duodenal, cáncer de mama¹⁶⁹. Se han descrito también hiperplasia congénita del epitelio de la retina (CHRPE), melanoma, quistes dentales, quistes desmoides y osteomas^{52,19}. Así también parecen ser bastante comunes (18%) pólipos en el estómago, duodeno¹⁷⁰. La MSI no es una característica de los tumores MAP^{52,167} y estos tumores suelen presentar, a parte de la tasa de transversión característica del gen *APC* (las transversiones más comunes son p.Ser1315X y p.Glu1560X), una mutación característica *KRAS*, p.Gly12Cys (*missense* activadora).

MAP explica alrededor del 1% de los CCR y un tercio (30%) de los casos de pacientes con 15-100 pólipos¹⁶. La MAP parece que constituye de un 0.4-0.75% del total de CCR hereditario^{6,171} y resulta fácilmente distinguible de la AFAP o FAP en familias en las que no exista una clara transmisión vertical de la poliposis, debido a que se puede diferenciar perfectamente del patrón de herencia dominante de *APC*. Los problemas surgen cuando en las genealogías aparecen casos de poliposis aislados (sin patrón de herencia mendeliana dominante) que se pueden confundir fácilmente con casos CCR esporádico. Pero las FAP/AFAP que se generarían como consecuencia de la aparición de mutaciones *de novo* en el gen *APC* tan sólo explicarían el 25% de estas situaciones. Para explicar el 75% restante de casos de poliposis aislada se recurre al mosaicismo gonadal en *APC* de uno de los padres no afectados o a la transmisión recesiva de una poliposis asociada a *MUTYH*. Es importante la detección y seguimiento clínico de la MAP para prevenir la aparición de CCR mediante programas de consejo genético. Los criterios clínicos que identifican a los pacientes portadores de mutaciones en *MUTYH* no están todavía establecidos¹⁷², por lo que para intentar discriminar entre familias *APC*-positivas o *MUTYH*-positivas se aplican los siguientes criterios⁵² de selección establecidos en los 6 registros regionales de poliposis del Reino Unido:

Historia familiar que no muestre una transmisión vertical de la poliposis. Normalmente este criterio resulta difícil de seguir debido a que las historias familiares suelen ser incompletas.

1. El paciente ha de presentar 10 adenomas con o sin cáncer colorrectal.
2. No haber identificado claramente mutaciones patogénicas en el gen *APC* tras el análisis genético del mismo.

- **GEN Y PROTEÍNA MUTYH:**

El gen *MUTYH* (*MN_012222*) se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 entre 1p32.1 - 34.3. Es un gen de 7.1kb de longitud constituido por 16 exones que codifican una proteína de 535 aminoácidos que tiene un 41% de homología con la de *E. coli*¹⁷³ (figura 10A). Este gen presenta *splicing* alternativo y puede generar más de 7 transcritos diferentes¹⁷⁴. El

gen *MUTYH* codifica para una glicosilasa perteneciente a la ruta de reparación BER, y está especializada en el reemplazamiento de adeninas erróneamente emparejadas con los derivados oxidados de la guanina (8-oxodG) (figura 10B y 10C). Con el fin de contrarrestar los efectos mutagénicos del estrés oxidativo sobre la replicación, la proteína *MUTYH* se localiza en los orgánulos donde se produce este proceso, es decir en citoplasma y mitocondria¹⁷⁵. Para permitir su distribución por la célula en la secuencia de la proteína se integra un péptido señal de localización nuclear (NLS) y otro de localización mitocondrial (MTS). Esta proteína posee 6 dominios funcionales (figura 10A), los cuales trataremos a continuación:

1. Dominio de unión a RPA (*replication protein A*)^{175,176}. Este dominio es el de interacción con RPA. Esta unión tiene lugar en el *foci* de replicación vinculando claramente al proceso de reparación BER con la replicación del DNA.
2. Dominio helix–hairpin–helix (HhH): Es el dominio de unión al DNA y está constituido por 20 aminoácidos que se localiza en otras proteínas de unión al DNA^{177,178}. El dominio se asemeja en estructura al motivo HhH al estar formado por dos hélices conectadas por un pequeño giro. La interacción con el DNA no se realiza en una secuencia específica y tiene lugar a través de la formación de un enlace entre los fosfatos del DNA y los nitrógenos una región altamente conservada (LPGV) localizada en el extremo N-terminal de la segunda hélice^{177,179}.
3. Cluster 4Fe-4S loop (FCL): Es una estructura constituida por un motivo Cys-(Xaa) 6-Cys-(Xaa) 2-Cys-(Xaa) 5-Cys. La principal función de este cluster es la de proporcionar residuos básicos altamente conservados para la interacción con el esqueleto de fosfatos del DNA^{177,180}.
4. Dominio de unión a MSH6: Este dominio es el de interacción con el complejo MSH2/MSH6 a nivel de la proteína MSH6. La región está comprendida entre los aminoácidos 232-254 de la proteína *MUTYH*¹⁸¹.
5. Dominio NUDIX-hidrolasa (*Nucleoside Diphosphate linked to some other moiety X*): Este dominio se localiza en el extremo C-terminal de la proteína y presenta una alta homología con el dominio MutT por eso también se le denomina *Mut-like domain*. Engloba los aminoácidos 354-486 y parece estar implicado en la unión al sustrato.
6. Dominio de unión a PCNA: Se ha analizado la secuencia de la proteína *MUTYH* y se ha localizado una región consenso conservada de unión a la molécula PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*). PCNA interacciona con varias proteínas implicadas en la reparación del DNA, *MUTYH* o MMR. Se han analizado las formas nucleares de *MUTYH* y su asociación con PCNA mediante técnicas de localización por fluorescencia. Los resultados revelaron que no existía relación entre estas dos moléculas en células en fase G0/G1 (tiempo 0) pero que esta relación aumentaba en función del tiempo hacia la fase G1/S lo que sugería que las interacciones entre estas dos proteínas se regulaban en asociación con la etapa de síntesis del DNA. Durante la replicación o fase S

MUTYH se localiza específicamente unida al *foci* de replicación y en una estrecha asociación con el PCNA y RPA (*Replication protein-A*)¹⁸² que le va a permitir realizar su función glicosilasa postreplicativa de un modo directo.

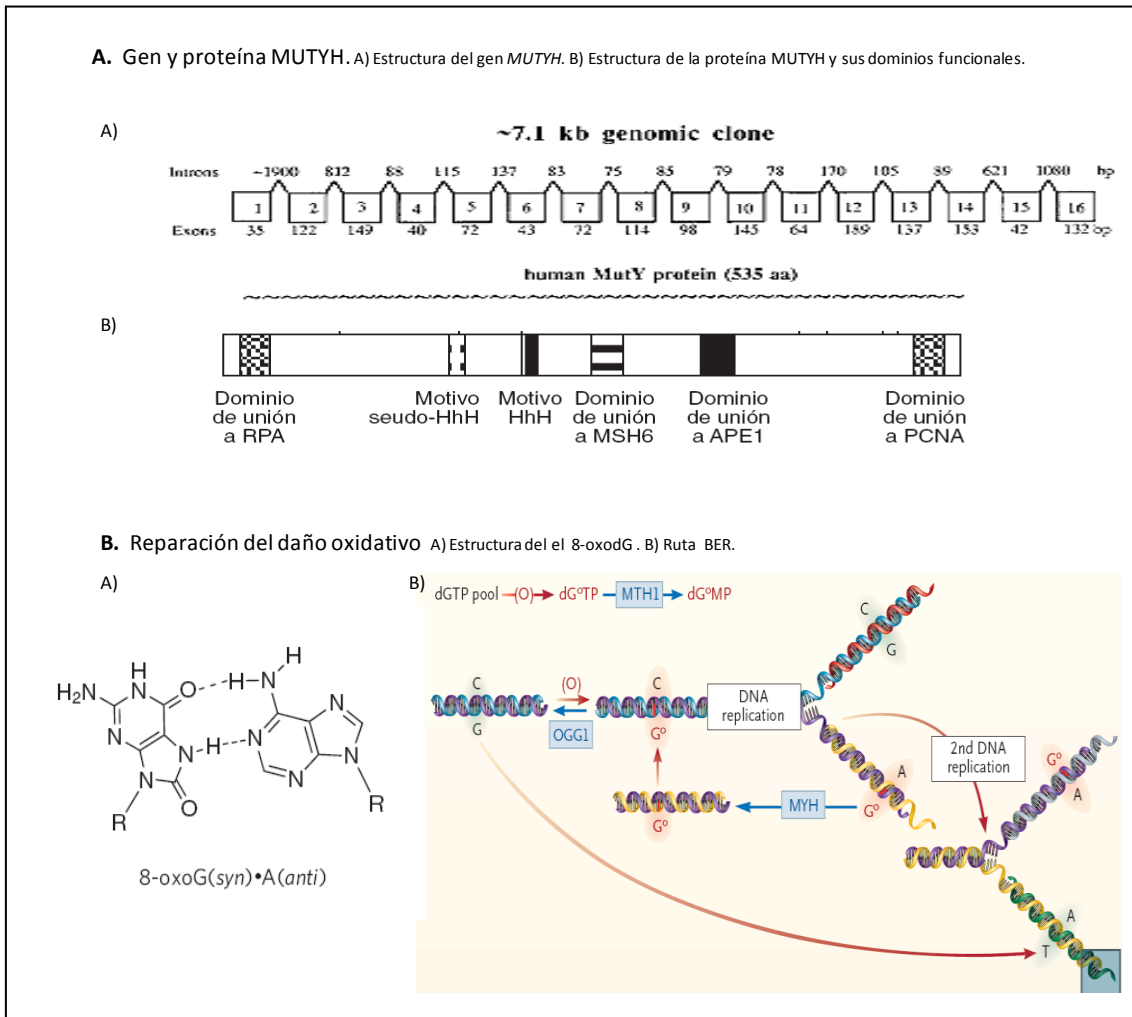


Figura 10: Proteína MUTYH: Gen estructura y función. Adaptado de Slupska et al.1996¹⁷³, Marra et al.2003¹⁸³ y Castellví-Bel et al. 2006¹²⁶.

La proteína MUTYH, al igual que otras glicosilasas BER, para poder realizar su función necesitan distinguir la mínima distorsión en el DNA. Esta detección le permite localizar la lesión, unirse con el DNA, irrumpir la unión entre bases y eliminar el nucleótido dañado del interior de la hélice. Este proceso se realiza mediante un modelo enzimático denominado “pinch-push-plug-pull” que se basa en un “nucleotide flipping”. Así la glicosilasa reconoce el nucleótido dañado al cual se une produciendo una curvatura y distorsión del DNA “pinch”. El nucleótido dañado encajado en el bolsillo del enzima es rotado “push” hacia fuera de la hélice “pull” a la vez que la enzima mantiene estable el dúplex de DNA “plug”¹⁸⁴.

• **ESPECTRO MUTACIONAL Y CORRELACIONES GENOTIPO/FENOTIPO:**

Las mutaciones en *MUTYH* son menos heterogéneas que las de *APC*, hasta el momento se han encontrado 82 mutaciones, la mayoría *missense* (<http://www.lovd.nl/2.0/>). Las mutaciones bialélicas en este gen explican aproximadamente entre un 26-29% de los pacientes con 10-100 pólipos y el 7-29% de los pacientes con 100-1000^{19,162,169}. En el caso de las clínicas atenuadas, los pacientes con mayor número de pólipos (>30), sin evidencia de transmisión vertical, tienen mayor probabilidad de presentar mutaciones en el gen *MUTYH* (25-60%)¹²⁶. En conjunto, aproximadamente de un 10-40% de los pacientes con poliposis y *APC* negativos son portadores de mutaciones bialélicas en el gen *MUTYH*^{19,163,165,169,185}. La frecuencia de mutaciones varía en los diferentes estudios dependiendo de los criterios utilizados para la selección de los pacientes aumentando cuando los pacientes cumplen criterios, lo que indica que ha de ser analizado prioritariamente *MUTYH* en aquellos pacientes AFAP sin mutaciones en *APC* AFAP¹⁶⁸. Está resultando fundamental la inmunohistoquímica de *MUTYH* para detectar mutaciones en su gen¹⁸⁶.

Se ha podido establecer la existencia de mutaciones étnicas o adscritas a un origen geográfico concreto en el gen *MUTYH*. Así las mutaciones p.Gly382Asp y p.Tyr165Cys corresponden a las mayoritariamente encontradas en la población caucasoide, explicando un 75% de las MAP de esta población^{52,20}. Exceptuando a las variantes *missense* p.Tyr165Cys y p. Gly382Asp el resto de *missense* son raras. Su baja frecuencia y la ausencia de estudios funcionales para la mayoría de ellas dificultan el diagnóstico molecular, permaneciendo en su mayoría como variantes de significado incierto (VUS o *variants of uncertain significance*) y dificultando el consejo genético en aquellas familias portadoras.

1. p.Tyr165Cys: Caracterizada por un cambio A>G en el nucleótido 494 del exón 7. Esta variación produce una alteración en el producto génico de una tirosina por una cisteína. El dominio afectado es el dominio helicoidal bucle-hélice implicado en la identificación de los *mismatches*¹⁸⁷. Esta mutación es rara en población escocesa¹⁷.
2. p.Gly382Asp: Caracterizada por un cambio G>A en el nucleótido 1145 del exón 13. Esta variación produce una alteración final en la proteína de una Gly por Asp. Esta mutación se localiza en el dominio NUDIX hidroxilasa (residuos 366 a 497) responsable de parte de la actividad de la enzima¹⁸⁷. Recientemente se ha demostrado que su existencia reduce la capacidad reparadora hasta un 1,5% de actividad normal del enzima a la hora de eliminar las G apareadas con 2-hidroxiadenina pero mantiene la actividad cuando la base apareada con la 2-hidroxiadenina es la 8-oxoG¹⁸⁸.

Las mutaciones p.Gly382Asp y p.Tyr165Cys se localizan en residuos altamente conservados de la proteína lo que le proporciona una alta patogenicidad que ha sido comprobada mediante estudios funcionales por Chmiel *et al.*¹⁸⁷ y ratificada recientemente por Ali *et al.*¹⁸⁹ al demostrar que la actividad glicosilasa y la de unión al DNA presenta deficiencias severas para la variante p.Tyr165Cys y es parcial en la variante p.Gly382Asp. Su contribución a la morbilidad en CCR parece restringirse a individuos con un número moderado de pólipos y no

a individuos con floridas poliposis. También empieza a adquirir un papel relevante en pacientes diagnosticados de Síndrome de Lynch, con tumores estables o inestables y negativos para mutaciones en los genes *MMR*.

En la MAP no se ha podido establecer una correlación genotipo-fenotipo clara como en el caso de *APC*. Un estudio reciente de Nielse *et al.*¹⁹⁰ ha intentado establecer las primeras correlaciones. Las correlaciones hasta ahora establecidas se basan en la mayor severidad de los fenotipos asociados a mutaciones en homocigosis p.Tyr165Cys y a la menor severidad de los portadores de homocigotos p.Gly382Asp y portadores bialélicos de estas mutaciones. Parece existir una relación inversamente proporcional entre la edad de manifestación de la MAP y número de alelos p.Tyr165Cys portados por el individuo. Los homocigotos para p.Gly382Asp tienen una edad promedio de 58 años, los heterocigotos compuestos p.Gly382Asp /p.Tyr165Cys presentan una edad de aparición 52 años. Los portadores de homocigotos p.Tyr165Cys presentan edades de manifestación de la MAP mucho más tempranas con una edad promedio de 45 años. No se ha descrito ningún efecto sobre la edad de aparición de la enfermedad para portadores de mutaciones *nonsense*. Igualmente también parece existir una correlación inversamente proporcional en portadores de la mutación p.Tyr165Cys entre el número de alelos y la existencia de menos de 10 pólipos. El número de pólipos parece ser directamente proporcional a la severidad de la mutación, así en portadores de bialélicos de mutaciones *nonsense* presentan más de 100 pólipos y menos los portadores monoalélicos. Parece no estar condicionada por el genotipo ni la localización del tumor colorrectal ni del estado en el que éste se encuentra.

Se ha demostrado en línea germinal el papel de las mutaciones en *MUTYH* en la predisposición al CCR cuando se localizan en homocigosis o heterocigosis compuesta (cuando cada uno de los alelos porta dos mutaciones en heterocigosis). La frecuencia de heterocigosidad (portadores monoalélicos) en la población general para las mutaciones más comunes en *MUTYH* es de 1-2%^{19,185,191}. No se han localizado mutaciones en el gen *MUTYH* en pacientes con CCR hereditario sin pólipos¹⁶⁸. Se ha detectado una posible implicación de este gen en algunos casos poliposis asociados a Muir-Torre (Heterocigoto compuesto para R168H/c.379delC)¹⁹². Varios estudios de base poblacional^{17,193-195,172} han mostrado una clara asociación, estadísticamente significativa, entre mutaciones bialélicas del gen *MUTYH* y el desarrollo del CCR con un aumento de riesgo del 93%¹⁷. La penetrancia de las mutaciones bialélicas en *MUTYH* es de un 55% a los 45 años y casi de un 100% a los 60 años^{6,17,185}. La penetrancia es mayor en el caso de homocigotos y más variable en caso de heterocigotos compuestos (existiendo casos donde no se observa fenotipo clínico) donde la penetrancia dependerá de la combinación de la penetrancia de cada una de las mutaciones en cuestión, lo que indica la baja penetrancia de alguna de las mutaciones quizás influenciada por otros factores genéticos o ambientales hasta ahora no conocidos.

Menos clara y controvertida es la posible contribución de los heterocigotos simples en *MUTYH* en el riesgo de desarrollar CCR. Por un lado se han realizado estudios que hablan de un posible incremento del riesgo de desarrollar CCR en portadores monoalélicos^{193,195,196}, aunque éste sería bajo (8% de riesgo acumulativo a los 70 años), reforzados por estudios meta-análisis^{197,198}. Estos resultados respaldarían la hipótesis de que el gen *MUTYH* actuaría como un

gen de susceptibilidad de baja penetrancia para el CCR¹⁷. Más recientemente se han realizado estudios que revelan que el riesgo asociado a portadores monoalélicos no es estadísticamente significativo en relación con el de la población normal^{172,185,194,199}, por lo que no implicaría ningún aumento de riesgo a la hora de desarrollar CCR.

1.4.1.3 OTROS SÍNDROMES POLIPÓNICOS. SÍNDROME DE PEUTZ-JEGHERS (OMIM #175200, PJS):

Es un síndrome autosómico dominante descrito por Peutz y Jeghers caracterizado por la presencia de pólipos hamartomatosos en colon-recto y estómago, máculas melanocíticas en los labios y mucosa bucal, y dedos y un aumento del riesgo de neoplasias diversas²⁰⁰. Los pólipos de tipo hamartoma se distinguen de los adenomatosos en que no suelen malignizar, aunque pueden favorecer la existencia de tumores malignos. Es un síndrome vinculado a mutaciones en el gen de la Serin-Treonin-kinasa previamente denominado LKB1, pero renombrado como *STK11* y localizado en la región 19p13, que regula la polaridad celular y funciona como un gen supresor tumoral, participando en diversas rutas celulares. Los estudios de ligamiento del *locus* genético para PJS identificaron al gen causal *LKB1* (19p13.3), homólogo al *STK11* bacteriano²⁰¹. Las mutaciones germinales que originan el PJS pueden ser mutaciones puntuales que afectan al dominio de reconocimiento del sustrato o también reordenamientos génicos²⁰². Existe controversia sobre la existencia de un segundo *locus* PJS en la región 19q13, ya que en un 30-80% de los casos de PJS no se encuentran mutaciones en *LKB1*, aunque aún no se ha identificado ningún gen en ella²⁰³.

- **SÍNDROME POLIPOSIS FAMILIAR JUVENIL (OMIM #174900; J FJP):**

Se trata de un síndrome autosómico dominante caracterizado por la aparición de pólipos en todo el tracto intestinal, pudiendo aparecer adenomas junto a hamartomas, que malignizan en un 20% de los casos. La JPS está causada por mutaciones en los genes *SMAD4* localizado en 18q21, en el gen que codifica para el gen del receptor de la proteína de morfogénesis ósea 1A-1A (*BMPRI1A*) localizado en 10q22.3 y *ENG* (9q33-q43.1). Estos genes participan en la ruta de señalización TGFβ y explican hasta un 50% de los casos de JPS²⁰⁴. Más recientemente se ha vinculado al gen *PTEN* con el desarrollo de esta enfermedad²⁰⁵.

- **SÍNDROME DE COWDEN (OMIM #158350):**

Síndrome autosómico dominante que toma su nombre del caso de Rachel Cowden²⁰⁶. Comparte características clínicas con el Síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley (BRRS) tales como pólipos hamartomatosos a lo largo del tracto gastrointestinal, lesiones en membranas mucosas, lesiones verrugosas en piel de cara y miembros, tumores de mama, tumores de tiroides y un aumento del riesgo de desarrollo de neoplasias múltiples²⁰⁷. El responsable de

estos síndromes es el gen *PTEN* por ello se agrupa a estos síndromes dentro del grupo de los “Síndromes de tumores hamartomatosos asociados a *PTEN*”.

- **SÍNDROME DE POLIPOSIS MIXTA HEREDITARIA (HMPS, OMIM #601228):**

Este síndrome se caracteriza por la presencia de varios tipos de pólipos: adenomas clásicos y serrados, hiperplásicos o pólipos juveniles atípicos, que aparecen confinados a colon y recto, algunos de los cuales pueden evolucionar a CCR. Los estudios de ligamiento han encontrado una región de susceptibilidad a HMPS en el gen *CRAC1* del cromosoma 15q14-q22²⁶. Curiosamente, un SNP en este mismo gen ha sido relacionado con el desarrollo del CCR con los datos obtenidos en un GWAS realizado este último año²⁷.

I.4.2 CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO POLIPÓSICO /SÍNDROME DE LYNCH.

- **CRITERIOS CLÍNICOS:**

El Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM #120435; #120436), es la forma hereditaria más común de CCR. Presenta una herencia de tipo autosómica dominante que afecta tanto a hombres como a mujeres y es responsable de un 3% -5% del total de de los cánceres colorrectales. El síndrome se caracteriza por un riesgo elevado de desarrollar cáncer de colon-recto (80%)^{208,209} y otros tumores extracolónicos como: endometrio (40- 60%- en mujeres)²¹⁰ y otras neoplasias como, ovario (10% en mujeres), estómago (15%), tracto urinario, intestino delgado, tracto hepatobiliar, sistema nervioso central y piel^{15,211}. El colon y el ovario, por este orden, son las regiones de mayor susceptibilidad al desarrollo del cáncer en este síndrome²¹², algo todavía sin explicación, de hecho aproximadamente de 1%-3% de los tumores de colon y 0.8%-1.4% de los cánceres de endometrio se asocian a HNPCC²¹³⁻²¹⁵. El 50% de los afectados de HNPCC tiene riesgo de padecer cáncer a los 45 años de edad²¹⁶. El aumento del riesgo de desarrollar esta enfermedad viene dado por mutaciones germinales en los genes que codifican para las proteínas de la maquinaria de reparación de errores de tipo *mismatch* en el DNA (MMR): *MLH1* (3p21.3), *MSH2* (2p22-p21), *MSH6* (2p16), *PMS2* (7p22), *PMS1* (2q31-q33) y *MSH3* (14q24.3).

El HNPCC fue descrito por primera vez por el Dr Warthin en 1913 en una familia “Familia G” que presentaba una alta incidencia de tumores gástricos. En 1966 el Dr Lynch sugirió la existencia de un síndrome al que denominó “Síndrome del cáncer familiar hereditario” caracterizado por una herencia autosómica dominante y alta incidencia de cáncer de endometrio y adenocarcinoma colorrectal²¹⁷. Así por este motivo, al HNPCC se le ha denominado históricamente como Síndrome de Lynch, en honor al trabajo realizado por el Dr Henry Lynch para la definición de este desorden²¹⁷⁻²²⁰. Posteriormente este síndrome adquirió

una nomenclatura diferente atendiendo a las manifestaciones clínicas que lo caracterizan. Así en el año 1991 el HNPCC/Síndrome de Lynch se dividió en dos grupos, Lynch I y Lynch II, atendiendo a la existencia exclusiva de CCR o a la existencia de CCR combinado con otros tumores extracolónicos respectivamente^{220,221}. Esta clasificación duró poco tiempo debido a que todas las familias que cumplen criterios clínicos de HNPCC se considera que tienen un alto riesgo de presentar de los tumores asociados a este síndrome²²²⁻²²⁴. Actualmente el HNPCC se ha redefinido atendiendo a criterios más moleculares de tal modo que el Síndrome de Lynch ha pasado a ser un subtipo de HNPCC caracterizado por la presencia de mutaciones deletéreas en alguno de los genes *MMR* denominándose Cáncer colorrectal familiar del tipo X al resto^{225,226} (figura 11).

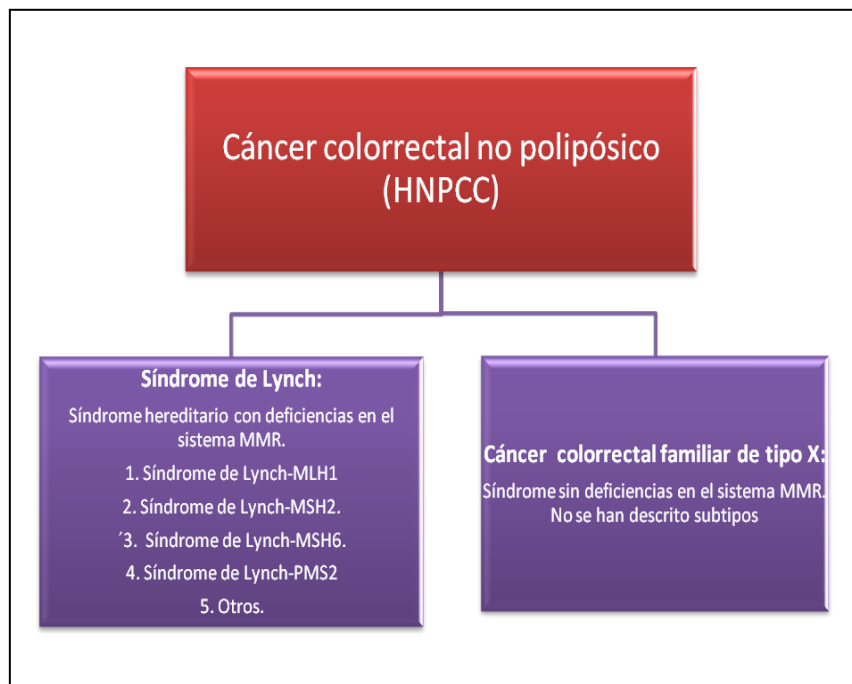


Figura 11: Esquema resumen de los distintos subtipos de HNPCC atendiendo a los distintos criterios clínicos y moleculares.

Los genes *MMR* se comportan como supresores de tumores en individuos heterocigotos, ya que el desarrollo de cáncer implicaría que en la copia no mutada se produjesen dos eventos mutacionales (perdida del alelo salvaje seguida de una delección, mutación o metilación de las islas CpG en el promotor del gen *MLH1*) que implicasen la pérdida de la heterocigosidad. La deficiencia en el sistema MMR origina en tumores inestabilidad de microsatélites (MSI). La vinculación de MSI al diagnóstico de HNPCC la realizó Aaltonen en 1999²²⁷. El análisis de MSI se realiza mediante la utilización de un panel de marcadores cuyo patrón de repeticiones es comparado entre tejido normal y tumoral²²⁸. Atendiendo al grado de inestabilidad los tumores se pueden clasificar en: en MSI-H (alta inestabilidad al ser inestables más del 30% de los marcadores), MSI-L (baja inestabilidad caracterizados por tener inestables menos de un 30% de los marcadores) y MSS (tumores estables, y en ellos ninguno de los marcadores presenta inestabilidad). El análisis de la inestabilidad de microsatélites es un buen

marcador de la deficiencia del sistema pero tiene una serie de limitaciones muy importantes y que han de ser tenidas en cuenta^{8,229}:

1. No predice qué genes son los mutados.
2. No es una prueba específica para HNPCC, un 15% de los tumores de colon esporádicos muestran MSI en ausencia de mutaciones en genes reparadores

El diagnóstico clínico del HNPCC sólo se puede hacer en base a la historia personal y familiar por lo que en 1990, el *Grupo Colaborativo Internacional del HNPCC (ICG-HNPCC)* propuso una serie de criterios clínicos: los "criterios de Ámsterdam I"²¹⁶ (tabla 8A). Sin embargo, 8 años después estos criterios fueron revisados por el mismo grupo para incluir en los mismos la posibilidad de aparición de tumores extracolónicos, los denominados Criterios de Ámsterdam II"²³⁰ (tabla 8B) Los criterios clínicos de Ámsterdam son muy restrictivos, debido al pequeño tamaño de las familias y a la carencia en ocasiones de una historia familiar, por lo que se proponen otros criterios menos restrictivos denominados Criterios de Bethesda (1997)²³¹ (tabla 8E) y Criterios de Bethesda modificados⁹⁶ (tabla 8D). Estos criterios van a permitir identificar a familias sospechosas de padecer Lynch teniendo en cuenta criterios como la inestabilidad de microsatélites y la inmunohistoquímica. La ventaja de la inmunohistoquímica respecto al estudio de MSI es que nos permite caracterizar cuál es el gen alterado. Sin embargo, la inmunohistoquímica tiene limitaciones en cuanto a su sensibilidad y especificidad, por lo que en la actualidad se conjunto de estos dos marcadores para la caracterización de pacientes HNPCC. Es importante resaltar que los Criterios de Bethesda no son criterios diagnósticos de HNPCC, cuyo diagnóstico clínico se apoya en los Criterios de Ámsterdam.

Los Criterios de Bethesda deben considerarse como un procedimiento de selección previo de los individuos con una mayor probabilidad de presentar mutaciones en los genes implicados en el HNPCC, con lo que se consigue aumentar el rendimiento del análisis genético²³². A medida que se aplican criterios clínicos menos restrictivos se reduce la sensibilidad (probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo) y se aumenta la especificidad (la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano) en la detección de individuos HNPCC²³³.

Tabla 8: Criterios diagnósticos del HNPCC. Adaptada de libro de Cáncer Hereditario de la SEOM²³⁴.

A) Criterios de Ámsterdam I²¹⁶.	B) Criterios de Ámsterdam II²³⁰.
Al menos 3 familiares afectados con cáncer colorrectal.	Al menos 3 familiares con Síndrome de Lynch, CCR, cáncer de endometrio, ovario, riñón, uréter o intestino delgado.
Al menos una de los familiares debe de ser pariente en primer grado de los otros dos.	Al menos una de los familiares debe de ser pariente en primer grado de los otros dos.
Deben de estar afectadas al menos 2 generaciones sucesivas.	Deben de estar afectadas al menos 2 generaciones sucesivas.
En uno de los afectados el CCR debe de presentarse en <50 años.	En uno de los afectados el CCR debe de presentarse en <50 años.
C) Criterios de Bethesda²³¹.	D) Criterios de Bethesda Modificados⁹⁶.
Individuos con cáncer en familias que cumplen los criterios de Ámsterdam.	Individuos con cáncer en familias que cumplan los Criterios de Ámsterdam.
Individuos con 2 cánceres asociados a HNPCC, incluidos CCR sincrónicos y metacrónicos.	Individuos con dos displasias asociadas a HNPCC, incluyendo CCR sincrónicos, metacrónicos y cánceres extracolónicos (endometrio, ovario, gástrico, hepatobiliar, intestino delgado uréter o pelvis renal).
Individuos con CCR y un familiar de primer grado con CCR y/o cáncer extracolónico asociado a HNPCC y/o un adenoma colorrectal, uno de los cánceres diagnosticado antes de los 45 años y el adenoma diagnosticado antes de los 40 años.	Individuos con cáncer colorrectal y un familiar de primer grado con CCR y/o cáncer extracolónico asociado a HNPCC y/o un adenoma colorrectal: uno de los cánceres diagnosticado a <50 años de edad y el adenoma antes de los 40 años.
Individuos con CCR o cáncer de endometrio diagnosticado antes de los 45 años.	Individuos con CCR o cáncer de endometrio diagnosticado a <50 años de edad.
Individuos con CCR localizado en el lado derecho, con patrón no diferenciado, diagnosticado antes de los 45 años.	Individuos con CCR del tipo células en anillo de sello (con más del 50% de células de este tipo) diagnosticado antes de los 50 años.
Individuos con CCR del tipo célula en estampilla de sello de anillo, diagnosticado antes de los 45 años.	Individuos con adenoma diagnosticado a <40 años de edad.

El porcentaje de detección de mutaciones varía en función de los criterios que cumplen cada familia (tabla 9). Para aquellas que cumplen los criterios más restrictivos de Ámsterdam I, las posibilidades de detectar una mutación en los genes *MLH1* o *MSH2* oscila entre el 39% y el 90%⁵, sin embargo, cuando los criterios que se completan son los de Ámsterdam modificados, desciende al 5%-50% de los pacientes HNPCC. Los criterios de Bethesda son más sensibles permitiendo la detección de mutaciones germinales tan solo en un 10-20% de las familias que los cumplen²³⁵.

Tabla 9: Tabla donde se representa la eficiencia en el cribado de los distintos criterios clínicos que se aplican al HNPCC.

Criterios clínicos.	Mutaciones germinales en <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	Sensibilidad	Especificidad
Criterios Ámsterdam I	40%-80%	61%	67%
Criterios de Ámsterdam II	0%-50%	72%	78%
Criterios de Bethesda	~50%	94%	49%
Criterios de Bethesda modificados	~20%	81%	98%

De los tumores procedentes de familias HNPCC entre un 75-86% muestran MSI²³⁶ Aproximadamente un 90% de los tumores de pacientes con HNPCC que cumplen los criterios de Ámsterdam presentan un MSI-H^{215,237}. Se asocian altos grados de inestabilidad a tumores Lynch con mutaciones en *MLH1* o *MSH2*²²⁸.

- **VARIANTES CLÍNICAS DEL HNPCC: SÍNDROMES DE TURCOT Y MUIR-TORRE.**

El Síndrome de Turcot (TS) o Síndrome de deficiencia en MMR (OMIM #276300) fue descrito en 1959 por Turcot *et al.*²³⁸ en un hermano y una hermana resultado de un matrimonio consanguíneo. Se describe como una enfermedad rara, variante del HNPCC²³⁹ que se caracteriza por la coexistencia de tumores en colon (FAP o HNPCC) y SNC (tumores cerebrales, meduloblastoma, astrocitoma o glioblastoma)²⁴⁰ además de otras características clínicas como son: manchas café con leche (*Caf-au-lait* o CALS), manchas vino de Porto, diarrea, hiperplasia nodular focal. Los síntomas aparecen más frecuentemente en la segunda década de vida. El pronóstico de supervivencia para estos pacientes es malo, en promedio de 20 años y casos aislados en adultos. En 1997 Paraf *et al.*²⁴¹ sugirió la existencia de 2 subtipos de TS: BTP tipo I (*Brain Syndrome Polyposis tipo I*) cuando la clínica esta ocasionada por mutaciones en los genes *MLH1* y *PMS2*²⁴⁰ y BTP tipo II (*Brain Syndrome Polyposis tipo II*) cuando la clínica se asocia a mutaciones en el gen *APC*. Según las manifestaciones colónicas el Síndrome de Turcot se clasifica en tres grupos²⁴²: Tipo 1 (caracterizado por múltiples pólipos colónicos (20 a 100) con transformación maligna), Tipo 2 (caracterizados por menos de 10 pólipos de más de 3 cm de diámetro con patrón de herencia incierto) y Tipo 3 (clínica similar a la FAP, con manifestaciones de carcinoma colorrectal antes de los 30 años de edad).

El síndrome de Muir-Torre (OMIM#158320, MTS) es una variante rara del Síndrome de Lynch que se caracteriza por la presencia tumores en las glándulas sebáceas o queratocarcinomas que se asocian con uno o más tumores viscerales, en particular cáncer colorrectal y gastrointestinal en general, endometrio (15%) y cáncer urológico. Esta

enfermedad aparece en ambos sexos, con una ligera predominancia en hombres (3 hombres cada 2 mujeres) a una edad promedio de 53 años (rango de edad 23-89)²⁴³. Presenta un patrón de herencia autosómico dominante relacionado principalmente con mutaciones en el gen *MSH2*^{244,245} aunque también puede deberse a mutaciones en *MLH1* y últimamente se empiezan a describir mutaciones en el gen *MSH6*^{246,247} y *MUTYH*¹⁹².

- **SISTEMA MMR: GENES Y PROTEÍNAS MMR:**

Los principales miembros del sistema MMR en eucariotas son homólogos de los MMR bacterianos de *E.coli* (*mutS*, *mutL*, *mutH* y *mutU*.) El sistema MMR en humanos está constituido por 9 proteínas MLH1, MLH3, PMS1, PMS2, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5 y MSH6, siendo MLH1, MSH2, MSH3 MSH6 y PMS2 las que juegan un papel fundamental en el funcionamiento del sistema. En eucariotas y en humanos se han identificado 6 homólogos de MutS (MSH1-MSH6) y tres homólogos de MutL (MLH1, PMS2 y PMS1), lo que refleja el alto grado de conservación del sistema MMR. Así en humanos nos encontramos con un sistema MMR complejo constituido por complejos multiprotéicos de función diversa y complementaria (tabla 10):

Tabla 10: Revisión de los homólogos MutL y MutS en mamíferos y sus funciones en el sistema MMR. Modificado de Cannavo et al.2005²⁴⁸.

Heterodimero	Componentes	Función de MMR
MutS α	MSH2 MSH6	Reparación de <i>mismatch</i> base-base y de pequeños <i>loops</i>
MutS β	MSH2 MSH3	Reparación de <i>loops</i>
MutL α	MLH1 PMS2	Reparación d todos los substratos del sistema MMR
MutL β	MLH1 PMS1	¿?
MutL γ	MLH1 MLH3	¿?

El proceso de reparación parece ser de tal modo que MutS α de un modo ATP-dependiente recluta a MutL α o a MutL β a través MSH2 generando un complejo ternario a la altura del *mismatch* denominado proteosoma. La resíntesis de la cadena con el *nick* parece que está seguida de una acción coordinada de la DNA polimerasa- δ (que rellena el *nick*

existente) y otras proteínas menos caracterizadas tales como otras DNA polimerasas, PCNA y la proteína de replicación A (RPA) y RFC²⁴⁹. La DNA ligasa que completa la reacción de MMR no ha sido aún identificada. La reparación de la cadena dañada seguirá diferentes rutas de reparación dependiendo de la localización relativa (5' o 3') del *nick* con respecto al *mismatch*.

Así los genes más importantes implicados en el funcionamiento del sistema MMR y los considerados como de susceptibilidad en el Síndrome de Lynch son: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*.

1. El gen *MLH1* (NM_000249.2) es el mayor de los genes homólogos de *MutL* y se localiza en el cromosoma 3p2. Fue identificado en el año 1993 por análisis de ligamiento²⁵⁰ y está constituido por 19 exones que contienen una ORF de 57360pb que codifica para un mRNA de 2524 (figura 12A). El producto génico de *MLH1* es una proteína de 556 aminoácidos y 84.6kDa que presenta aproximadamente un 43% de homología con el MLH1 y PMS1 de levaduras. Carece de caja TATA en su promotor, lo que permite agruparlo dentro de los genes *housekeeping*. La proteína MLH1 no posee ninguna actividad enzimática conocida *per se* pero forma heterodímeros con las proteínas PMS2 (MutL α) o con las proteínas PMS1 (MutL β) o MLH3 (MutL γ). Estos complejos heterodiméricos se unen con el complejo MutS α (MSH2 y MSH6) o MutS β (MSH2 o MSH3) y reconocer así las lesiones en el DNA. Consta de 4 dominios funcionales que abarcarían los siguientes codones: ATP-asa C (codones 23-153), DNA *mismatch repair* (codones 221-335), el dominio de interacción (336-519) y el dominio de activación (codones 521-755) (*The Pfam protein families database*)²⁵¹. Los heterodímeros formados por MLH1 son los responsables del reclutamiento, coordinando la interacción, de las proteínas necesarias para la escisión de bases y la reparación por síntesis de otras nuevas. MLH3, PMS2 y PMS1 interactúan con la misma región de MLH1 pero la proporción de cada uno de estas proteínas no es la misma en la célula²⁴⁸.
2. El gen *MSH2* (NM_000251.1) fue el primero de los genes vinculados al HNPCC mediante estudios de ligamiento, en una familia de Terranova (Canadá) y Nueva Zelanda, y clonación posicional en el año 1993²⁵². Este gen se localiza en 2p22-p21 y consta de una ORF de 80098 bp constituida por 16 exones que codifican para un mRNA de 3145 bp y una proteína de 934 aminoácidos y 104.7kDa. (figura 12B) Se engloba, al igual que *MLH1* dentro del grupo de los genes *housekeeping*, al carecer de caja TATA en su promotor. La proteína MSH2 posee una función bien caracterizada, tanto en bacterias como en levaduras, y se encuentra implicada también en el proceso de reparación post-replicativo de errores del tipo *mismatch*. Presenta una localización nuclear y está constituida por los 5 dominios característicos de las proteínas homólogas a MutS bacteriana y que comparte con MSH6 y MSH3: MutS I de unión (codones 17-132), Dominio MutS II o dominio conector (codones 143-290), Dominio Mut S III o *Core* (codones 297- 472 y 570-614), Dominio MutS IV o

dominio *lever clamp* (codones 473 a 569 y Dominio MutS V o dominio ATP-asa (codones 619-854) (*The Pfam protein families database*)²⁵¹.

3. El gen *MSH6* (NM_000179.1) se encuentra a 1Mb del gen *MSH2* en el cromosoma 2p16²⁵³ y está constituido por una ORF de 4264bp compuesta por 10 exones de los cuales el exón 4 ocupa casi un 60% (2545pb). Su producto proteico es la proteína MSH6, constituida por 1360 aminoácidos y de 160KDa, responsable de la unión al *mismatch* del complejo MutSα (figura 12C). Es por este motivo que a *MSH6* también se le denomina *GTBP* (*G/T binding protein*) o *p160*. El promotor de *MSH6* posee un elevado contenido en cajas GC (concretamente 7) y no posee cajas TATA (al igual que *MLH1*, *MSH2*, *PMS1* y *PMS2*) lo que le caracteriza como un gen *housekeeping* al limitar sus lugares de inicio de transcripción. La proteína MSH6 está constituida por cinco dominios de estructura y función similares al de la proteína MutS bacteriana: Dominio I, Dominio MutS II, Dominio Mut S III, Dominio MutS IV y Dominio MutS V o dominio ATP-asa (codones 619-854) (*The Pfam protein families database*)²⁵¹. Pero además contiene una serie de residuos adicionales precediendo al dominio I que constituyen su extremo N-terminal (NTR) donde se encuentran contenidos el dominio de unión a PCNA (PIP o *PCNA interacting protein*), una amplia región de función desconocida y un fragmento de unión no específica a DNA (*sliding clamp*). El fragmento de unión no específica al DNA abarca en levaduras desde los codones 228 a 299 y es rico en residuos de carga positiva (Lys y Arg), cambios en la carga de estos aminoácidos reducen la eficiencia de unión al DNA²⁵⁴. Esta región de función desconocida no presenta homologías entre especies (no se puede alinear entre metazoos y levaduras) y en ella en humanos recientemente se ha localizado un dominio globular denominado PWWP (codones 89 a 194), constituido por una *hoja-β* y una larga *hélice-α*. Este dominio parece ser el responsable de la unión a la doble cadena de DNA, sin ninguna preferencia por regiones con *mismatches* o *nicks*. PWWP es frecuente en otras proteínas eucariotas con multidominio y de localización nuclear implicadas en división, crecimiento y diferenciación celular²⁵⁵.
4. *PMS2* (NM_000535.4) es un gen que codifica para un homólogo del gen MutL de *E. coli* y de los genes *PMS1* de levaduras. La figura 12 muestra que *PMS2* es un gen del sistema MMR de con una ORF de 2.586pb localizado en el cromosoma 7p22^{252,256} y constituido por 15 exones codificantes que tienen como producto una proteína de 862 residuo, 95kDa y una homología con el *PMS1* de levaduras de un 32% (figura 12D). Su función requiere de la formación de un heterodímero al unirse con MLH1 (MutLβ) que posteriormente se unirá con MSH2/MSH3 (MutSβ)²⁵⁷. Kondo *et al.*²⁵⁸, entre otros, publicaron la existencia de genes con una alta homología con *PMS2* denominados genes *PMS2L* (*PMS2-like*)²⁵⁷. Estos genes se localizan en un clúster en el cromosoma 7 y tienen un alto grado de homología con el extremo 5' (extremo amino terminal de la proteína) de *PMS2*. Las regiones de

homología se corresponden con los 5 primeros exones o más del gen *PMS2* y muchos de los cuales se transcriben^{257, 258}. El pseudogén más conocido en la actualidad es el pseudogén *PMS2Ψ0* o *PMS2CL* debido a que presenta una región de homología con el 3' de *PMS2* (exones 9 y 11-15) ya que es resultado de una duplicación invertida de 100kb²⁵⁹.

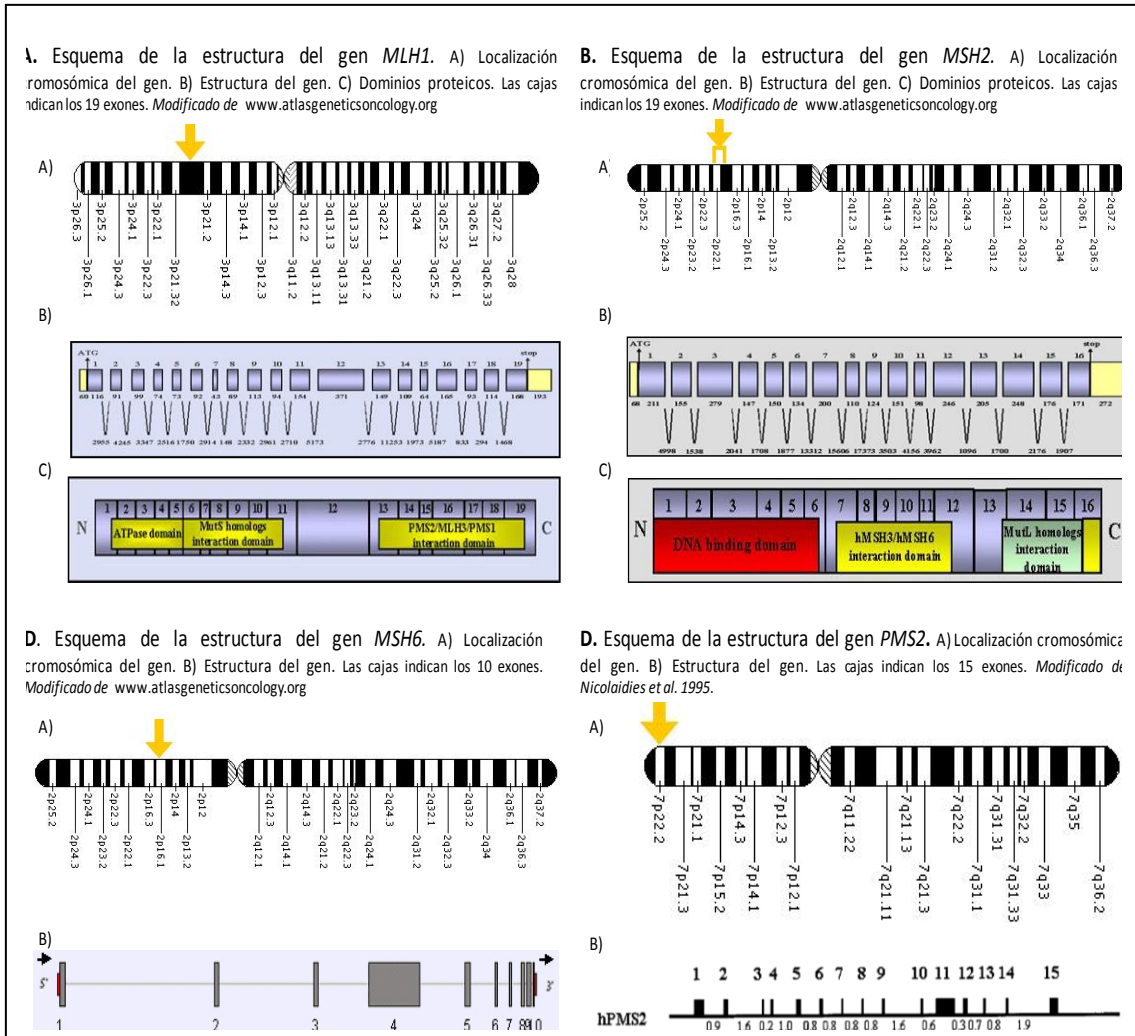


Figura 12: Localización, estructura y localización dominios proteicos de los genes MMR con más importancia en el desarrollo del Síndrome de Lynch. Modificado de www.ghr.nlm.nih.gov.

Otros genes *MMR* serían: *MSH3* (OMIM*600887, 5q11.2-q13.2.), *PMS1* (OMIM*600258, 2q31-q33), *MLH3* (OMIM*604395, 14q24.3) y *MSH4* (OMIM*602105, 1p31) y *MSH5*(OMIM*603382).

• **ESPECTRO MUTACIONAL Y CORRELACIONES GENOTIPO/FENOTIPO:**

La mayoría (95%) de las mutaciones asociadas al HNPCC se concentran en 4 de los 9 genes *MMR* descritos hasta el momento: *MLH1* y *MSH2* (90%)^{260,261} siendo menos frecuente la aparición de *MSH6* (7-10%)^{260,262,263} y *PMS2* (<5%) y casi despreciable en. (*PMS1*, *MSH3*, *MSH4* y *MSH5*)²⁶⁴. Las mutaciones patógenas más frecuentemente encontradas en los genes reparadores son del tipo *nonsense*, *frameshift* o grandes reordenamientos (figura13)

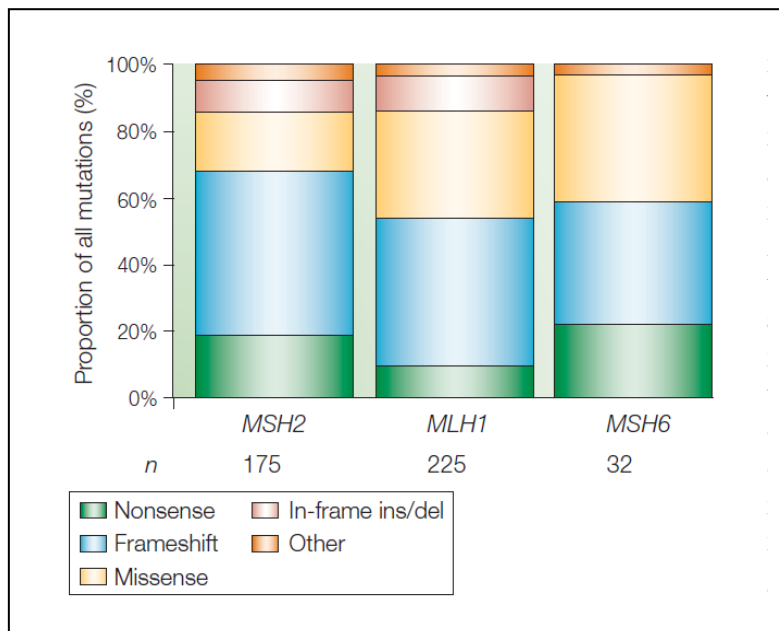


Figura 13: Distribución de frecuencias de mutaciones en los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*. Adaptado de De la Chapelle et al. 2004²

El resultado es la disrupción de la pauta de lectura, y con ello la génesis de un transcrito generalmente inestable que es degradado por la maquinaria celular mediante el sistema conocido como "*nonsense-mediated RNA decay*"²⁶⁵. Una alta proporción de sustituciones exónicas del tipo *missense* o sinónimas son rutinariamente localizadas en los genes reparadores con valores de 30% en *MLH1*, 25% en *MSH2*, y más de un 50% en *MSH6* y *MLH3* de las cuales la gran mayoría permanecen como VUS debido a que no se ha podido definir claramente su efecto patogénico en la alteración del *splicing*²⁶⁶.

La frecuencia de grandes reordenamientos en genes *MMR* en pacientes con Síndrome de Lynch oscila 5%-20%^{267,268} siendo los genes más frecuentemente afectados *MSH2* (60%), *MLH1* (27%) mientras que es menor en *MSH6* (4%) y *PMS2* (8%). La variabilidad en la incidencia de grandes reordenamientos que observamos a lo largo de la bibliografía viene determinada por la metodología empleada y la heterogeneidad en los criterios de selección de los individuos²⁶⁹. Estos grandes reordenamientos parecen tener su origen principalmente en fenómenos de recombinación homóloga mediado por secuencias *Alu*^{270,271}.

De todos los pacientes con HNPCC alrededor de un 80% de los hombres y un 40% de las mujeres son portadores de mutaciones en alguno de los genes *MMR* de susceptibilidad²⁷². La penetrancia de CCR asociado a mutaciones en los genes *MMR* es menor del 100% (80%),

por lo que un 80% de los portadores de estas mutaciones desarrollará cáncer a los 75 años pero existen individuos con mutaciones en *MMR* que nunca desarrollan el tumor. El riesgo acumulado de desarrollar cáncer en portadores de mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2* a los 80 años es del 65%-90%²⁵³ el cual aumenta hasta un 73% en portadores de mutaciones en el gen *MSH6*²⁷³. La edad de diagnóstico de CCR en pacientes portadores de mutaciones en *MLH1* y *MSH2* ronda los 43-46 años siendo en portadores de *MSH6* más elevadas 51-57 años²⁵³. En el síndrome de Lynch el establecimiento de correlaciones genotipo/fenotipo es mucho más compleja que en el caso de la poliposis, de hecho esta enfermedad se caracteriza por poseer una gran heterogeneidad fenotípica²¹⁰. Las mutaciones en cada uno de los genes *MMR* pueden generar diferentes manifestaciones fenotípicas o clínicas y en general parece ser que los individuos portadores de mutaciones bilélicas o en homocigosis presentan fenotipos más severos y más precoces debido a que se produce una proteína con función residual o nula. Esta correlación genotipo-fenotipo en portadores bialélicos es muy discutida, ya que no siempre una mutación severa ha de esta asociada con un fenotipo severo²¹⁰. El análisis de mutaciones reportadas asociadas a familias con HNPCC/S. de Lynch, muestran que la mayoría de las mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2* se asocian con un fenotipo clásico de HNPCC, que cumplen los criterios estrictos de Ámsterdam I y que por lo tanto presentan un alto riesgo de desarrollo de cáncer. Las mutaciones en *MSH6*, *PMS2* y *MLH3* se asocian con fenotipos más atípicos que cumplen criterios clínicos de Bethesda²⁷⁴.

Las mutaciones en el gen *MSH2* generalmente se asocian con una mayor incidencia de manifestaciones extracolónicas²⁷⁵ que las del gen *MLH1*, además de ser las más frecuentemente asociadas al fenotipo Muir-Torre²⁷⁶. Las mutaciones en *MSH6* suelen asociarse a fenotipos más atípicos y suelen reflejar un fenotipo ligeramente atenuado del HNPCC, de aparición de CCR más tardía que en caso de pacientes con mutaciones en *MLH1* y *MSH2*, una localización generalmente distal, aparición de cáncer de endometrio y/o bajo grado de inestabilidad de micosatélites. La L-MSI parece ser explicada debido a la redundancia funcional de MutLβ en la reparación de *loops* generados por inserciones y deleciones²⁴⁸ (esto se ve claramente en los casos de HNPCC en los que las mutaciones en el gen *MSH2* tienen una mayor penetrancia que las alteraciones en el *locus MSH6*). Las mujeres HNPCC con mutaciones en *MSH6* presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de cáncer de endometrio^{236, 275, 277}, muchísimo mayor que en el caso de portadoras de mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2*²⁶³. Se han descrito mutaciones en *MSH6* en pedigrís con una menor agregación de cáncer colorrectal que no cumplen criterios de Ámsterdam y que presentan H-MSI L-MSI o ambos por igual^{262, 273-279}.

La frecuencia de mutaciones en el gen *PMS2* es mayor de lo que se estimaba en un principio^{280, 281}. Las mutaciones en *PMS2* suelen causar una aparición temprana del Síndrome de Lynch asociada a tumores cerebrales siendo reportadas en familias diagnosticadas con el Síndrome de Turcot^{240, 275}. La herencia de mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en *PMS2* parecen explicar los cánceres en niños al igual que ocurre con los homocigotos y heterocigotos compuestos en otros genes *MMR* y así los heterocigotos para *PMS2* suelen asociarse a cáncer colorrectal esporádico sin historia familiar, aunque existe

descrito el caso de una familia con criterios de Ámsterdam II y mutación en heterocigosis en el *PMS2*²¹⁰.

También se han localizado mutaciones en el gen *MSH3*, cuyas consecuencias clínicas y funcionales no están claras, y mutaciones en *MLH3* en pacientes con MSI variable, aunque no se tiene clara el papel de este gen en la predisposición al HNPCC²⁸². No existe ninguna evidencia de la participación de *PMS1*, *MSH3*, *MSH4* y *MSH5* en el HNPCC²⁷⁴.

I.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN FAMILIAS CON SOSPECHA DE CCR HEREDITARIO.

La identificación de los individuos en situación de riesgo de padecer un síndrome hereditario es fundamental para disminuir la morbilidad/mortalidad de CCR. La identificación de estos pacientes y el diagnóstico genético de este tipo de síndromes ha de realizarse siempre en el contexto de una unidad de consejo genético.

La base principal para llegar al diagnóstico de un síndrome de predisposición hereditaria al cáncer colorrectal es la recogida de una completa historia familiar. El objetivo es identificar las siguientes características que sugieren un síndrome de predisposición hereditaria al cáncer: edad precoz al diagnóstico, múltiples familiares afectos del mismo tipo de cáncer o asociados entre ellos, transmisión vertical de la enfermedad, presencia de otras anomalías benignas o malignas que se engloban dentro de un síndrome conocido.

Los síndromes de predisposición al CCR son en su mayoría entidades con expresión en la edad adulta. Muchos de los síndromes de cáncer hereditario se caracterizan por presentar un fenotipo complejo donde el cáncer es un rasgo más de un fenotipo en el que son comunes defectos del desarrollo mayores y menores. El cáncer aparece a edades variables aunque es infrecuente observar cánceres congénitos. El cáncer hereditario suele aparecer entre 10-20 años antes de la edad en la que es frecuente ese mismo tipo de cáncer en su forma esporádica. Generalmente se observa cómo el mismo tipo de cáncer (colon, próstata, mama, gástrico o cualquier otro) aparecen en una generación y en la siguiente, de acuerdo a un modelo de herencia autosómica dominante (la más frecuente en los síndromes hereditarios) o recesiva. No es raro observar que los tumores hereditarios se inician de manera independiente en varios focos repartidos por el órgano donde asientan, en vez de aparecer en un único foco. Así mismo tampoco es raro detectar varios tipos de cáncer en el mismo individuo.

La identificación de familias con síndromes de predisposición al CCR es clínicamente relevante, ya que el riesgo de sus miembros para desarrollar cáncer es muy elevado (familias de alto riesgo). Actualmente existen programas que nos permiten la identificación de los portadores de riesgo basados en el cálculo de la probabilidad de ser portador de una mutación concreta en un determinado gen. El primer diseño de este tipo fue realizado por Wijnen *et al.*²⁸³. Este método permitía calcular la probabilidad de identificar una mutación en *MMR* en

pacientes HNPCC de teniendo en cuenta la edad de aparición del tumor, la presencia de cáncer de endometrio y el cumplimiento de de los criterios clínicos de Ámsterdam. La aplicación de este método permitió mejorar la detección de portadores de mutaciones en *MLH1* y *MSH2* hasta un 84% de las familias analizadas para probabilidades >25%²⁸⁴. Actualmente se conocen varios modelos (tabla11) para la detección de pacientes con riesgo de ser portador de mutaciones en los genes *MMR*.

Tabla 11: Modelos de predicción de riesgo en pacientes HNPCC.

Modelo	Genes	Tipo de mtuaciones detectadas	Tumores incluidos	Método	Referencia
<i>Two-Stage Predictive Model</i>	<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> y <i>MSH6</i>	Puntuales: <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> y <i>MSH6</i> Grandes reordenamientos: <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> .	Colon y endometrio	Regresión logística y reafirmación de resultados con IHQ y MSI	285
MMR-pro	<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i>	Mutaciones puntuales: <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> y <i>MSH6</i> Grandes reordenamientos: <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> y <i>MSH6</i>	Colon y endometrio	Análisis mendeliano y bayesiano incorporando al penetrancia y prevalencia de las mutaciones y el valor predictivo de los estudios de IHQ y MSI	286
PREMM1, 2	<i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	Mutaicones puntuales: <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> Grandes reordenamientos: <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	Colon, endometrio, neoplasias asociadas al Síndrome de Lynch y adenomas colónicos	Regresión logística multivariante.	287

Sin una adecuada historia familiar, muchos síndromes de este tipo pueden no ser identificados y ser considerados como tumores de carácter esporádico. La historia familiar (árbol genealógico) es sin duda la herramienta más eficaz para determinar la probabilidad de que una determinada familia tenga alto riesgo de desarrollar CCR, ya que en ella podemos identificar las características típicas de los síndromes hereditarios. Cuando una familia se cumplen los criterios clínicos de sospecha de un síndrome hereditario (familia de alto riesgo) se procede a la realización del análisis genético en el probando (figura 14).

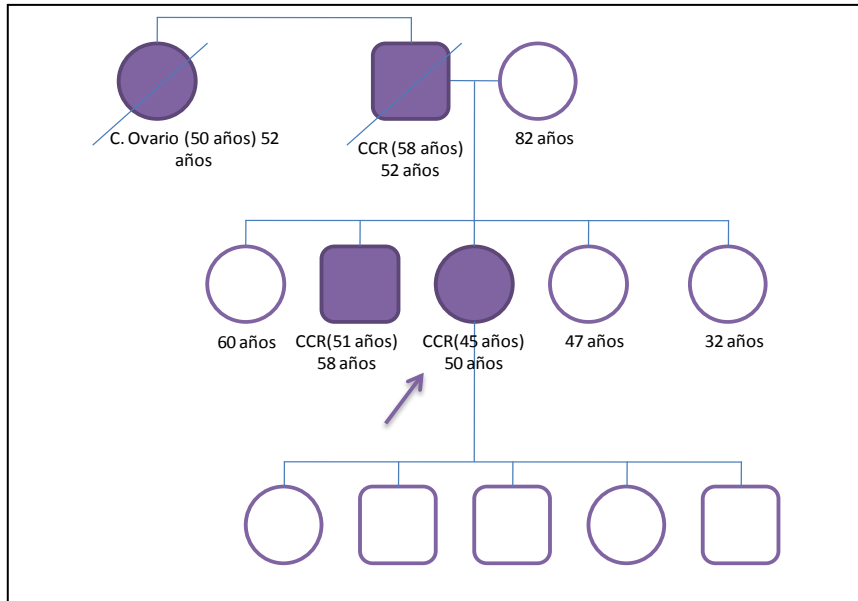


Figura 14: Árbol genealógico de una familia con un patrón de herencia autosómico dominante. Se marca con una flecha el individuo probando.

En general suele escogerse como probando o caso índice a la persona afectada con mayor probabilidad de ser portador y a ser posible, el de mayor afectación y menor edad al diagnóstico²³⁴. Tras la realización del análisis se pueden obtener tres tipos de resultados:

1. Resultado positivo: Un resultado es positivo cuando tras el análisis molecular se identifica la mutación causal.
2. Resultado no informativo: Cuando no se detecta ninguna mutación o cuando se identifica una variante genética cuya implicación en el desarrollo de la enfermedad no está claro. En este caso no se puede ofrecer test genético predictivo a los familiares.
3. Resultado verdadero negativo: Este resultado es consecuencia de la no detección de una mutación previamente identificada en la familia.

La identificación de individuos portadores de mutaciones germinales es fundamental para ofrecer medidas preventivas y/o de diagnóstico precoz con el fin de evitar la aparición de la enfermedad o facilitar su identificación en un estadio potencialmente curable. En algunas familias de alto riesgo se identifican cambios sinónimos y missense de las que se desconoce su implicación en la enfermedad. Estas variantes se denominan de significado incierto (*VUS, Variants of Uncertain Significance*) e incluyen tanto variantes codificantes (*missense* o sinónima) como intrónicas. En relación a las variantes codificantes, tradicionalmente se consideraban patógenas aquellas *missense* que afectaban a la carga polar del aminoácido o que se encontraban en dominios de la proteína altamente conservados evolutivamente. En cambio, las variantes sinónimas, se clasificaban como variantes raras o polimorfismos sin aparente efecto funcional sobre la proteína. Hoy en día se ha visto que tanto las variantes *missense* como las sinónimas también pueden tener un efecto deletéreo sobre la función de la proteína, por lo que debe atenderse no sólo al cambio aminoacídico sino también al cambio

nucleotídico que ocurre en el DNA²⁸⁸. Cuando se identifica una VUS es imprescindible la clasificación de la misma en patológica o neutra/baja importancia clínica para ofrecer consejo genético. Para ello se realizan varias aproximaciones imprescindibles para la clasificación de estas variantes genéticas²⁸⁹:

1. Estudios genéticos en población control, en los que se estudia si las frecuencias alélicas de la variante analizada se desvían del equilibrio Hardy-Weinberg en población sana.
2. Realización de estudios de co-segregación en familias, en los que al analizar familiares del probando, tanto afectados como sanos, se observa si la variante segrega con la enfermedad o se hereda de forma independiente. Estas aproximaciones resultan útiles sobre todo para establecer la no patogenicidad de una variante. En ocasiones esta estrategia no se puede seguir por falta de familiares afectados en la familia o cuando las familias tienen un tamaño pequeño. Es importante tener en cuenta las limitaciones de este tipo de estudios y considerar la posible existencia de fenocopias y de penetrancias parciales.
3. Estudios genético-evolutivos *in silico* que predicen el impacto del cambio aminoacídico sobre la estructura tridimensional de la proteína.
4. Predicciones *in silico* del efecto patógeno de la variante.
5. Estudios de RNA.
6. Estudios funcionales, cuando se conoce la función de la proteína.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El cáncer colorrectal (CCR) constituye la segunda localización tumoral en importancia tanto en hombres como en mujeres en el mundo occidental. En la población general el riesgo acumulado a lo largo de la vida de padecer CCR se calcula próximo al 6%, pero a mayor número de familiares con esta enfermedad, mayor será el riesgo personal de desarrollar cáncer colorrectal. Este riesgo se incrementa de forma dramática en aquellos individuos portadores de mutaciones germinales que predisponen a padecer entidades como la poliposis adenomatosa familiar (FAP) o el cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC), principales síndromes de predisposición hereditaria al CCR. En estos casos el riesgo acumulado puede alcanzar el 100% en el caso de la FAP y el 60-80% en el caso de HNPCC. Estos dos síndromes están causados por mutaciones germinales de alta penetrancia y baja frecuencia en población en genes de susceptibilidad al cáncer colorrectal *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *APC*, *MYH*... En un estudio reciente en población española un 5% de casos de CCR se incluyeron en estas formas hereditarias clásicas. La identificación de individuos portadores de mutaciones germinales en estos genes es fundamental para ofrecer medidas preventivas y/o de diagnóstico precoz individualizado que eviten la aparición de la enfermedad o al menos faciliten su identificación en un estadio potencialmente curable

Los objetivos de este trabajo de tesis son los siguientes:

1. Caracterizar el espectro de mutaciones causales en los genes de susceptibilidad al CCR hereditario en población gallega. Para ello, se realizará un análisis molecular de los genes *APC*, *MUTYH*, *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* en las familias con sospecha clínica de esta enfermedad.
2. Analizar la contribución al desarrollo del CCR hereditario de grandes reordenamientos génicos en *APC*, *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*, mediante la técnica de MLPA.
3. Identificar las variantes genéticas de significado incierto en las familias analizadas, y clasificarlas en deletéreas o neutras siguiendo diversas aproximaciones (predicciones *in silico*, estudios poblacionales, estudios de co-segregación...).
4. Optimizar y adecuar a la población gallega las estrategias de estudio genético y diagnóstico molecular de los síndromes de predisposición hereditaria al CCR.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 SELECCIÓN DE PACIENTES Y CONTROLES.

Se han estudiado un total de 191 muestras de pacientes gallegos con sospecha de CCR hereditario remitidas a la FPGMX por varios centros sanitarios de Galicia para realizar su estudio genético. Cada una de las muestras utilizadas para este estudio cumple las exigencias de protección de datos personales que se establecen en el consentimiento informado vinculado a cada una de ellas. Siempre que fue posible cada una de las muestras remitidas vino asociada a su correspondiente árbol genealógico, en el que se reflejaba la historia familiar del paciente con los datos de de edad y sexo, edad de aparición de la enfermedad, tipo de cáncer y, si procedía, la edad de fallecimiento.

Se analizaron 48 familias que presentaban una clínica de Poliposis Adenomatosa Familiar clásica (FAP > 100 pólipos) o Poliposis Adenomatosa Familiar atenuada (AFAP < 100 pólipos). Además se analizó el gen *MUTYH* en 9 familias previamente estudiadas para el gen *APC*²⁹⁰. Para la evaluación molecular de estos pacientes se ha seguido el algoritmo que se muestra en la figura 15.

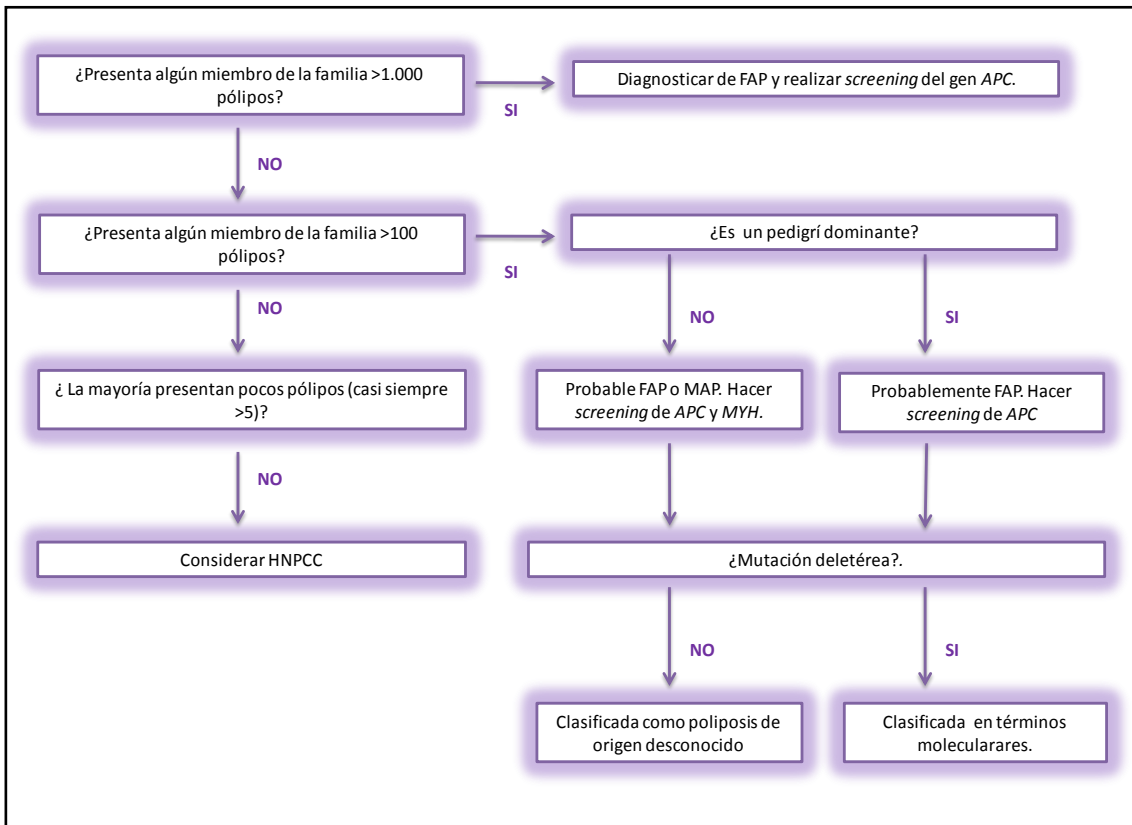


Figura 15: Algoritmo utilizado para la evaluación molecular de los pacientes FAP. Adatado de Libro del Cáncer Hereditario de la SEOM²³⁴.

También fueron analizadas 143 familias con sospecha de Síndrome de Lynch/HNPCC. Los criterios clínicos utilizados para la selección de las familias vienen dados por los Criterios de Ámsterdam I, Criterios de Ámsterdam II, Criterios de Bethesda y Criterios de Bethesda modificados. El algoritmo utilizado para la evaluación molecular de estos pacientes se muestra en la figura 16

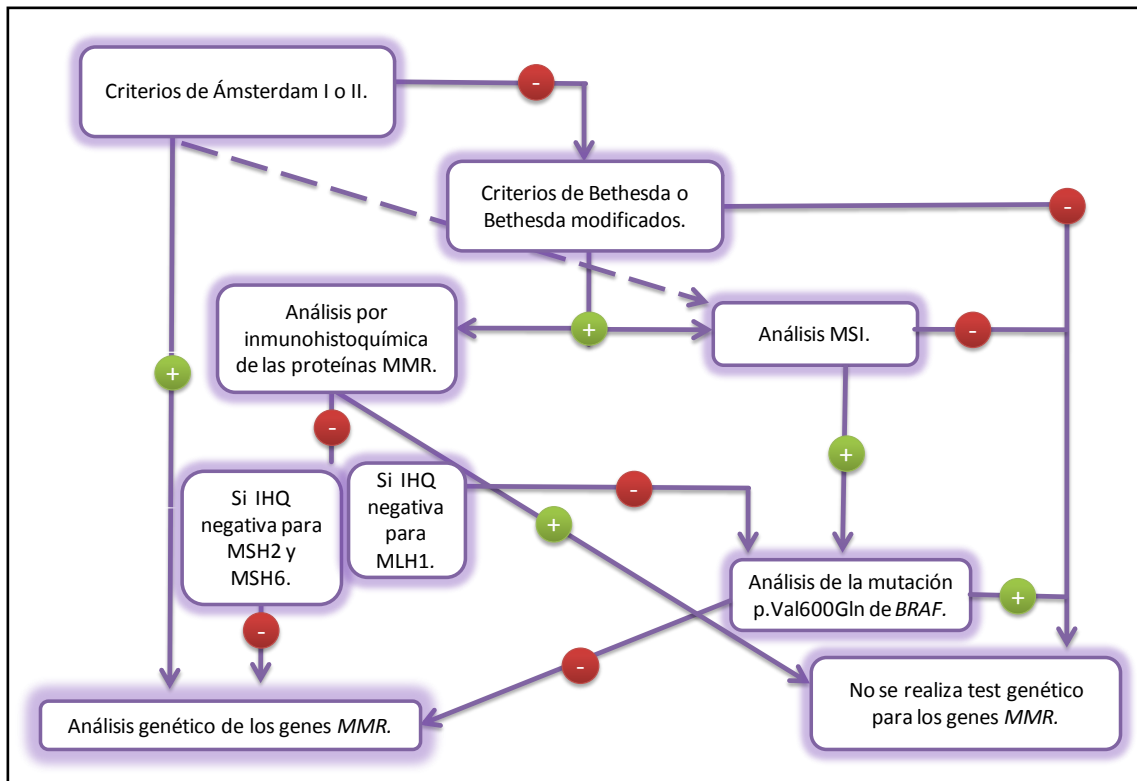


Figura 16: Algoritmo utilizado para la evaluación molecular de los pacientes con sospecha de Síndrome de Lynch. Adaptado de Libro de Cáncer Hereditario de la SEOM²³⁴.

Los estudios poblacionales se han realizado en muestras de DNA pertenecientes a población control sin antecedentes personales de cáncer y familiares de CCR.

III.2 EXTRACCIÓN DE DNA.

III.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.

Para cada uno de los pacientes estudiados se extrajeron 10ml de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA, el cual fue almacenado en nevera a 4°C hasta su extracción.

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de de sangre periférica mediante la utilización de dos protocolos diferentes: extracción manual con el *Wizard DNA Extraction Kit*

(Promega, Madison, WI) y extracción mecánica con *Chemagic DNA Blood 100 Kit* (Chemagen AG, Baesweiler, Germany) mediante la utilización del robot *Chemagic Magnetic Separation Module 1* (Chemagen AG, Baesweiler, Germany). El DNA extraído de sangre periférica se conservó en nevera a 4°C hasta su análisis.

III.2.1.1 EXTRACCIÓN MANUAL CON WIZARD DNA EXTRACTION KIT.

La base experimental del *Wizard DNA Extraction Kit* (Promega, Madison, WI) reside en cuatro pasos: Lisis celular y nuclear, precipitación proteica, precipitación del DNA y rehidratación.

El protocolo de extracción seguido en este caso fue el indicado por el fabricante. El volumen final de muestra extraído y utilizado para nuestro análisis fue de 300 µL y su rendimiento está entre 5-15µg de DNA, dependiendo de la cantidad de leucocitos presentes en la muestra de sangre original.

III.2.1.2 EXTRACCIÓN MECANICA CON CHEMAGIC DNA BLOOD 100 KIT.

Esta técnica se fundamenta en la utilización de partículas magnéticas que se unen a los ácidos nucleicos de la muestra de partida permitiendo su separación mediante la atracción de éstas por una barra metálica magnetizada. Este protocolo consta de dos fases: una de lisis y otra de purificación del DNA. Durante esta última fase la barra magnética desplaza los ácidos nucleicos, unidos a ella a través de las bolas, por 7 *buffer* de lavado constituidos por una base de etanol y una concentración de sales decreciente. En cada uno de los lavados el electroimán es desmagnetizado permitiendo que el DNA quede en suspensión para ser posteriormente recapturado al magnetizarse de nuevo a la barra. Finalmente se liberan las partículas de DNA por el mismo proceso en el *buffer* de elución. El protocolo seguido fue el indicado por el fabricante. El volumen de partida para nuestro análisis es de 100 µl de muestra y su rendimiento ronda valores de 2-4 µg de DNA.

III.2.2 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE MUESTRA DE TEJIDO INCLUIDA EN PARAFINA.

En las muestras de tumores colorrectales incluidas en parafina la obtención del DNA se hizo mediante la utilización del *QIAamp DNA Micro Kit* (Qiagen, Hilden, Germany). Este proceso de extracción consiste en una desparafinización del tejido con xileno (paso 1), lisis celular y nuclear seguida de una cromatografía en columna que permite la separación del DNA del resto de los componentes celulares (paso 2). Cada uno de los dos pasos descritos se lleva a cabo en días sucesivos siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. A continuación se citan las modificaciones que se han realizado en dicho protocolo:

1. Desparafinar con xileno:
 - a) Tomar un trozo muy pequeño de tumor (no más de 10mg) en un tubo 1,5ml y dar un *spin*.
 - b) Añadir 1.200µl de xileno y agitar vigorosamente.
 - c) Centrifugar a 1400 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - d) Desechar el sobrenadante
 - e) Añadir 1200µl de Etanol (96% o 100%) al precipitado para eliminar el xilol y vortear.
 - f) Centrifugar a 1400 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - g) Desechar el sobrenadante con cuidado de no llevarse el precipitado.
 - h) Repetir los pasos e, f y g dos veces.
 - i) Evaporar el etanol a 37°C a temperatura ambiente durante 5-10 minutos con el tubo abierto.
2. Extracción de DNA de tejidos: Previo al inicio del proceso de extracción indicado en el *kit* hemos añadido 1 µl de RNA *carrier* para aumentar el rendimiento de las extracciones realizadas a partir de poca muestra de tejido.

En el caso del DNA extraído a partir de parafina, el DNA es almacenado desde su extracción a -20°C.

III.2.3 CUANTIFICACIÓN Y CONSERVACION DEL DNA.

La calidad y concentración de las muestras de DNA fueron determinadas con el espectrofotómetro *NanoDropTM1000*, que mide la absorbancia a las longitudes de onda del UV y Vis con una alta reproducibilidad. El rango de medida de concentración se establece entre 2-3700 ng/ul (dsDNA) y no necesita de una previa dilución de la muestra. El proceso de medida consiste en la introducción de 1,5-2 µl de muestra en el *NanoDropTM1000*, que mide la absorbancia de la muestra a 230nm, 260nm y 280nm. La absorbancia del DNA es máxima a 260nm por lo que nos va a permitir determinar la concentración del mismo en la muestra mediante la utilización de la siguiente fórmula:

$$\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (\text{Abs}_{260} \times \text{FD} \times 50) / 1000$$

Donde: Abs_{260} es la absorbancia de la muestra a 260nm; FD es el factor de dilución de la muestra; 50 es el factor que indica que una absorbancia de 1.0 si se tienen 50 µg/mL de DNA de doble cadena y 1000 es el factor de conversión de mL a µL.

El valor de la lectura a 230nm (longitud de onda mínima de absorbancia del DNA) está influenciado por la cantidad de sales presentes en la muestra y la longitud de onda a 280nm es

específica para las proteínas. Como consecuencia atendiendo a las relaciones de absorbancia a 260/280 y 260/230 se puede establecer el grado de pureza de la muestra.

III.3 INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI).

El análisis de MSI se realizó en las muestras de tumores colorrectales pertenecientes a pacientes con sospecha de Síndrome de Lynch. La valoración de la inestabilidad de microsatélites se realizó por comparación visual directa de los patrones de picos obtenidos en el DNA normal (sangre periférica o tejido normal adyacente al tumor) y tumoral, respectivamente. Se consideró como indicativo de inestabilidad la presencia de uno o más alelos nuevos. Esto se manifestó como una diferencia en el patrón electroforético entre el DNA normal y tumoral. En cada uno de los análisis de inestabilidad siempre se incluyó un control positivo de MSI y otro negativo.

III.3.1 LOCI ANALIZADOS Y CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN.

El análisis de MSI se realiza mediante una PCR multiplex utilizando el *MSI Analysis System, Version 1.2 Kit* (Promega, Madison, USA). Este *kit* permite la amplificación simultánea de 7 *loci* microsatélites (figura 17.A). En el análisis de MSI se realiza el estudio de 5 marcadores mononucleotídicos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y MONO-27) que, debido a que son *loci* monomórficos, presentan una alta sensibilidad en la detección de MSI^{291,292}. Estos 5 *loci* están considerados como marcadores MSI de referencia del NIH, de acuerdo con *International Guidelines for the Evaluation of MSI in Colorectal Cancer*. También se realiza el análisis de dos *loci* con repeticiones pentanucleotídicas (Penta C y Penta D). Estos *loci*, debido a su alto grado de polimorfismo y baja sensibilidad a la MSI, se utilizan únicamente como control de contaminación y de cruce de muestras.

Las condiciones de la PCR multiplex se citan en la figura 17.B. Los termocicladores utilizados, indistintamente según su disponibilidad, fueron Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y DNA Engine Dyad® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ambos válidos para placas de 96 pocillos.

III.3.2 DETECCIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR.

La electroforesis capilar se realizó en el secuenciador ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA). El polímero utilizado como matriz en la electroforesis fue POP7, lo que nos permite separar fragmentos de DNA de cadena sencilla que se diferencian en una única base. Los *primers* utilizados para la amplificación del panel de *loci* microsatélites están marcados con

3 fluorocromos diferentes lo que va a permitir que el láser del dispositivo detecte la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de DNA fluorescente y la traduzca en la secuencia correspondiente. Para que tenga lugar este proceso la muestra precisa de un tratamiento previo consistente en la mezcla de 2 μ l de ésta con 10 μ l de formamida desionizada (Hi-Di™, Applied Biosystems, Foster City, CA) y con 1 μ l de del marcador interno ILS600 (Promega, Madison, USA). Esta mezcla es desnaturalizada a 95°C durante 3 minutos, metida en hielo durante otros 3 minutos e inmediatamente introducida en el secuenciador (figura 17.C.).

El marcador interno ILS600 consta de 22 fragmentos de DNA de 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550 y 600 pb marcados con carboxi-X-rodamina (CXR) que es detectada como una señal de color rojo por el secuenciador.

III.3.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS Y ANÁLISIS DE DATOS.

Tras la electroforesis los datos resultantes se procesaron utilizando el *software GeneMapper v3.7* (Applied Biosystems, Foster City, CA), que nos proporciona un electroferograma de picos que representa a cada uno de los marcadores de inestabilidad utilizados (figura 17.D). El programa detecta todos los picos que están por encima de una intensidad proporcionando datos cuantitativos acerca de cada uno de los fragmentos amplificados: longitud del fragmento en pares de bases (calculado a partir de los estándares de peso molecular) la intensidad de los picos (detectada en unidades de fluorescencia) y altura y área del pico. Cada uno de los *loci* microsatélite aparece marcado con un fluorocromo diferente y presenta un tamaño diferente, por lo que resulta sencilla la identificación cada uno de los *loci* y por lo tanto la determinación de su grado de inestabilidad. Se realizó en todos los casos una evaluación visual de los electroferogramas para comprobar la calidad de la amplificación, determinar los picos alélicos en muestra de sangre y tumor, identificar los patrones anómalos y excluir artefactos inespecíficos de la PCR o electroforesis. Los marcadores que aparecen alterados en la muestra tumoral, y no lo hacen en la normal, son los que nos van a indicar el grado de MSI (MSI-L, MSI-H, MSS).

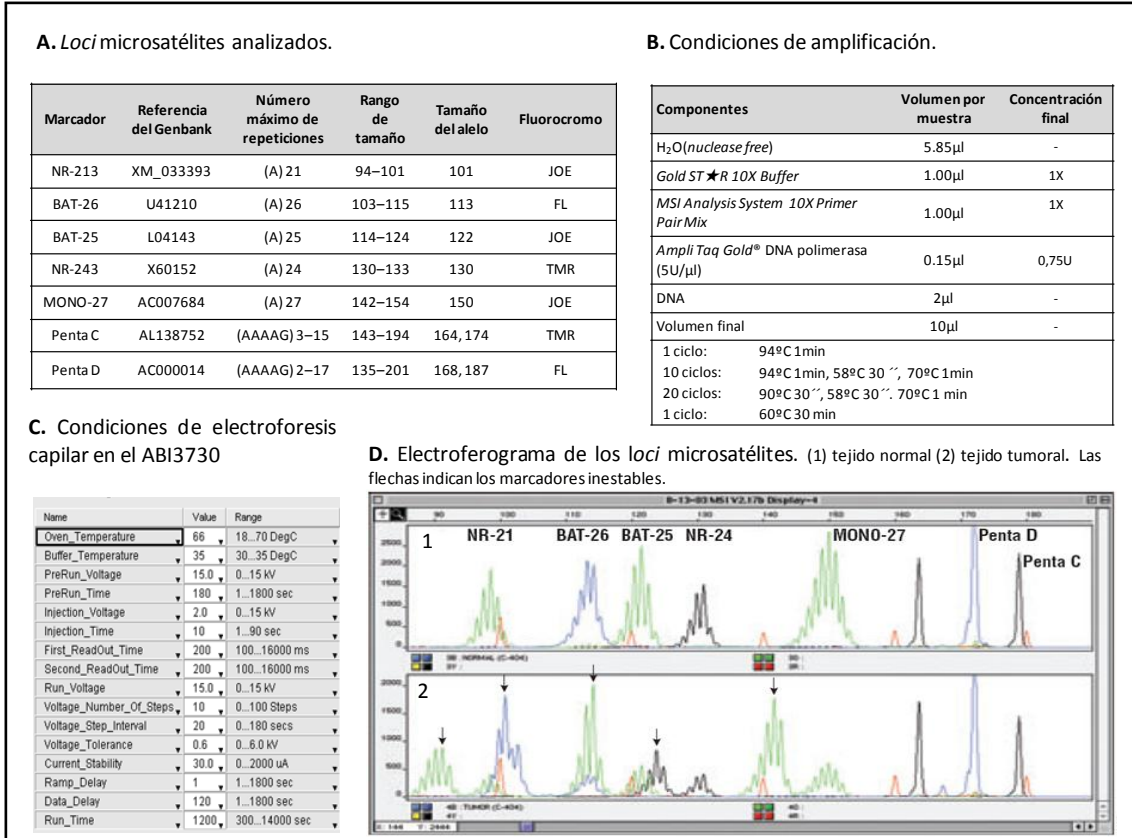


Figura 17: Análisis de inestabilidad de microsatélites (MSI).

III.4 ANÁLISIS DE MUTACIONES PUNTUALES EN LOS GENES: APC, MUTYH, MLH1, MSH2 Y MSH6.

III.4.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES APC, MUTYH, MLH1, MSH2 Y MSH6.

A partir del DNA genómico de sangre periférica se procedió a la amplificación y secuenciación de los genes APC, MUTYH, MLH1, MSH2 y MSH6. Utilizando el programa Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/>) se diseñaron los primers específicos para la amplificación de los exones y las regiones intrónicas adyacentes de cada uno de los genes analizados. Para el análisis del gen APC se utilizaron los primers descritos por Ruiz-Ponte et al.²⁹⁰. La secuencia de los primers para cada uno de los genes se indica en los anexos I, II, III, IV y V.

Para todas las PCR siempre se utilizó un control negativo (blanco de PCR) y un control positivo de amplificación. Los termocicladores utilizados, indistintamente según su disponibilidad, fueron Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

DNA Engine Dyad® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y TC-312 Techne Thermal Cycler ambos válidos para placas de 96 pocillos.

III.4.1.1 AMPLIFICACIÓN DEL GEN APC.

Las condiciones de amplificación de los 15 exones del gen APC se indican en la figura 18. Los exones del 1 al 14 han sido amplificados utilizando la *Mastermix-1000 Rxns* (5 PRIME, Hamburgo), de tal modo que el protocolo de PCR es el mismo para todos los exones, variándose únicamente la temperatura de *annealing* (Ta) para cada uno de los exones (figura 18.A). El exón 15 ha sido dividido para su amplificación en 6 fragmentos solapantes (figura 18.C). El protocolo de PCR y las condiciones de la misma son idénticos para cada uno de los fragmentos tan sólo variando la Ta (figura 18.B). La polimerasa utilizada en este caso fue la *Taq Expand Long PCR System* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

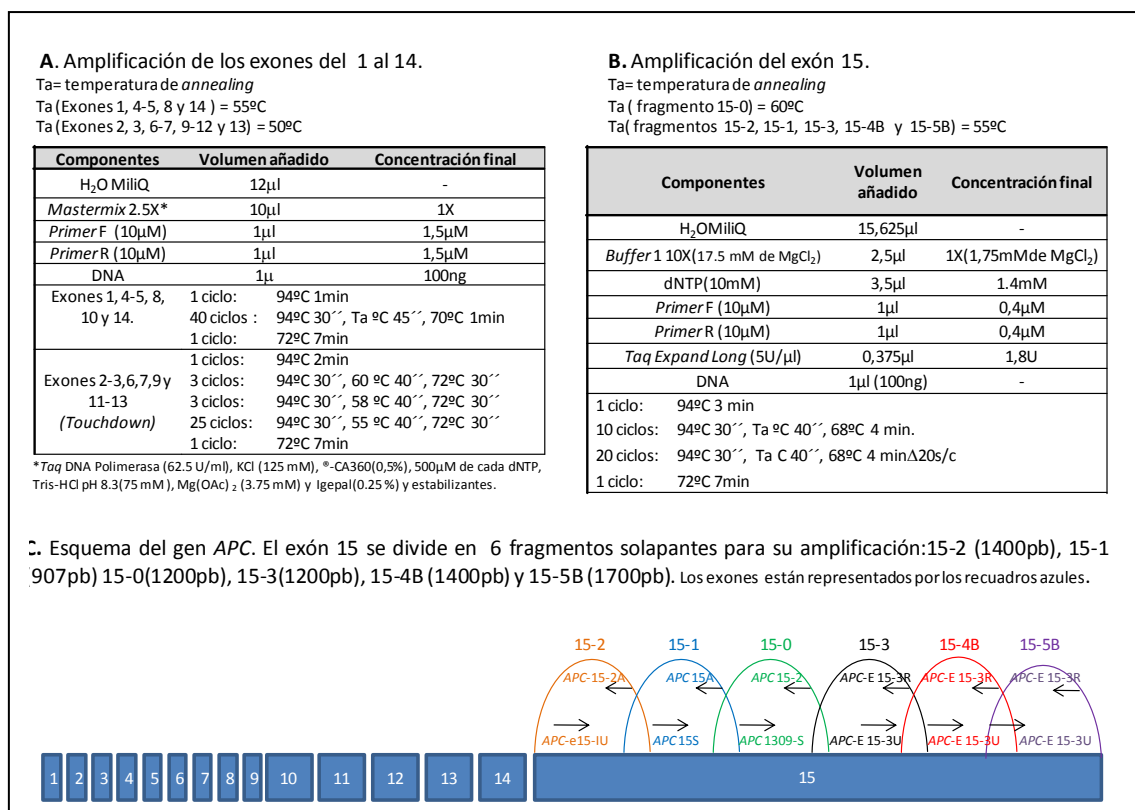


Figura 18: Amplificación del gen APC.

III.4.1.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN MUTYH.

Las condiciones de amplificación de los 16 exones del gen *MUTYH* se detallan en la figura 19. La amplificación de los exones 1, 2, 15 y 16: se realizó con la *Taq Flexi DNA Polimerasa* (Promega, Madison, WI) siguiendo un único protocolo de amplificación para todos

estos exones (figura 19.A). Los exones 3 al 14 se amplificaron con la *Taq Expand Long PCR System* (Figura 19.B) y para ello fueron divididos en 3 fragmentos solapantes (Figura 19.D). En algunas muestras se han genotipado simplemente los dos *hotspots* del gen *MUTYH*, p.Y165C y p.G382D, (figura 19.C). Los primers utilizados en la realización de estos genotipados se describen en el ANEXO II.2.

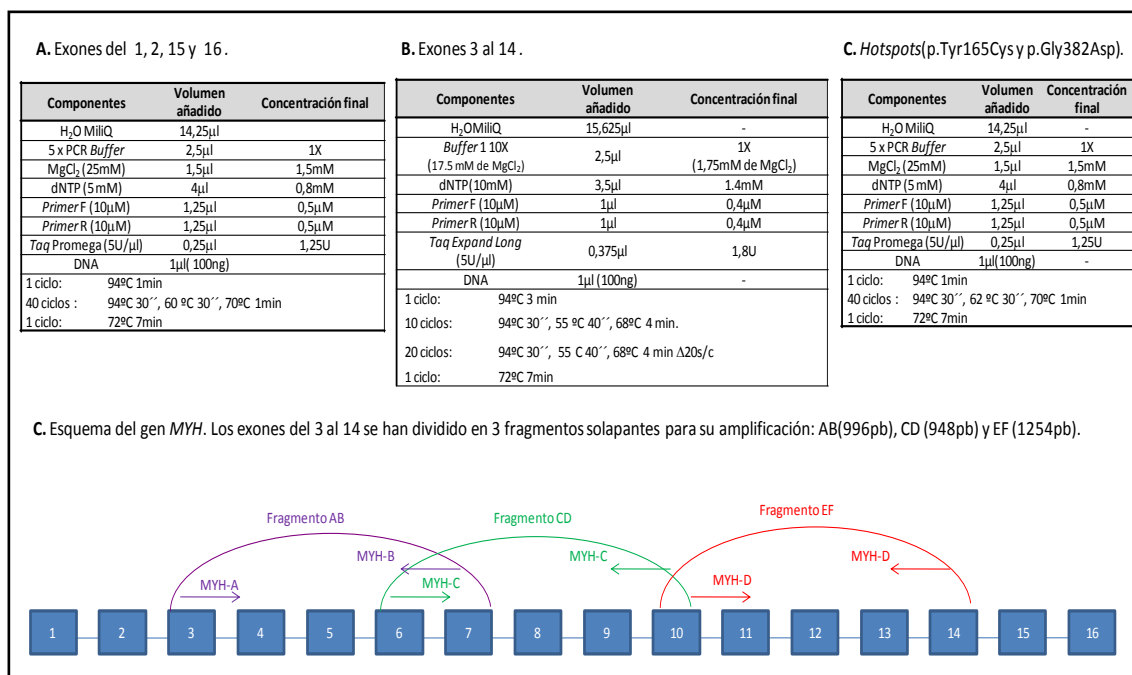


Figura 19: Amplificación del gen *MUTYH*.

III.4.1.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *MLH1*.

Los 19 exones del gen *MLH1* se amplifican siguiendo las condiciones que se detallan en la figura 20. Todos los exones, a excepción del exón 12, fueron amplificados utilizando la *Taq Flexi DNA Polimerasa* con unas condiciones de PCR que variaron dependiendo del exón amplificado (figuras 20.A y 20.B). El exón 12 (figura 20.C) tuvo que ser amplificado utilizando la polimerasa *Taq Expand Long PCR System*.

A. Exones 2, 4-11, 13-14 y 16-19.			B. Exón 12.			C. Exones 1, 3 y 15.		
Componentes	Volumen añadido	Concentración final	Componentes	Volumen añadido	Concentración final	Componentes	Volumen añadido	Concentración final
H ₂ O MilliQ	10,75µl	-	H ₂ O MilliQ	15,625µl	-	H ₂ O MilliQ	9,25µl	-
5 x PCR Buffer	5µl	1X	Buffer 1 10X (17,5 mM de MgCl ₂)	2,5µl	1X (1,75mM de MgCl ₂)	5 x PCR Buffer	5µl	1X
MgCl ₂ (25mM)	1,5µl	1,5mM				MgCl ₂ (25mM)	3µl	3mM
dNTP (5 mM)	4µl	0,8mM	dNTP (10mM)	3,5µl	1,4mM	dNTP (5 mM)	4µl	0,8mM
Primer F (10µM)	1,25µl	0,5µM	Primer F (10µM)	1µl	0,4µM	Primer F (10µM)	1,25µl	0,5µM
Primer R (10µM)	1,25µl	0,5µM	Primer R (10µM)	1µl	0,4µM	Primer R (10µM)	1,25µl	0,5µM
Taq Promega (5U/µl)	0,25µl	1,25U	Taq Expand Long (5U/µl)	0,375µl	1,8U	Taq Promega (5U/µl)	0,25µl	1,25U
DNA	1µl (100ng)	-	DNA	1µl (100ng)	-	DNA	1µl (100ng)	-
1 ciclo: 94°C 1min 40 ciclos: 94°C 30'', 50 °C 30'', 70°C 1min 1 ciclo: 72°C 7min			1 ciclo: 94°C 3 min 10 ciclos: 94°C 30'', 55 °C 40'', 68°C 4 min. 20 ciclos: 94°C 30'', 55 C 40'', 68°C 4 min Δ20s/c 1 ciclo: 72°C 7min			1 ciclo: 94°C 1min 40 ciclos: 94°C 20'', 55 °C 20'', 70°C 40'' 1 ciclo: 72°C 7min		

Figura 20: Amplificación del gen *MLH1*.

III.4.1.4 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *MSH2*.

El gen *MSH2* está constituido por 16 exones de los cuales, a excepción del exón 3, todos se han amplificado siguiendo un único protocolo de PCR utilizando la *Taq Flexi DNA Polymerasa* (figura 21.A). Las condiciones de PCR también fueron diferentes para cada exón según la temperatura de *annealing* óptima en cada caso. El exón 3 fue amplificado con la polimerasa *Taq Expand Long PCR System* (figura 21.B).

A. Exones 1, 2, 4-8, 10-14 y 16.			B. Exón 3.		
Ta= temperatura de <i>annealing</i> . Ta(Exones 10,13 y 14) = 50°C; Ta (Exones 2,6,7,8 y 11) = 55°C ;Ta (Exones 9,4,5 y 12) = 55°C; Ta (Exones 15 y 16) = 60°C					
Componentes	Volumen añadido	Concentración final	Componentes	Volumen añadido	Concentración final
H ₂ O MilliQ	9,25µl	-	H ₂ O MilliQ	15,625µl	-
5 x PCR Buffer	5µl	1X	Buffer 1 10X (17,5 mM de MgCl ₂)	2,5µl	1X (1,75mM de MgCl ₂)
MgCl ₂ (25mM)	3µl	3mM			
dNTP (5 mM)	4µl	0,8mM	dNTP (10mM)	3,5µl	1,4mM
Primer F (10µM)	1,25µl	0,5µM	Primer F (10µM)	1µl	0,4µM
Primer R (10µM)	1,25µl	0,5µM	Primer R (10µM)	1µl	0,4µM
Taq Promega (5U/µl)	0,25µl	1,25U	Taq Expand Long (5U/µl)	0,375µl	1,8U
DNA	1µl (100ng)	-	DNA	1µl (100ng)	-
Exones 2,6,8y 11 1 ciclo: 94°C 1min 35 ciclos: 94°C 20'', Ta °C 20'', 70°C 40'' 1 ciclo: 72°C 7min			1 ciclo: 94°C 3 min 10 ciclos: 94°C 30'', 55 °C 40'', 68°C 4 min. 20 ciclos: 94°C 30'', 55 C 40'', 68°C 4 min Δ20s/c 1 ciclo: 72°C 7min		
Exones 1, 4-5, 7, 10, 12-14 y 16 1 ciclo: 94°C 1min 30 ciclos: 94°C 30'', Ta °C 30'', 70°C 1 min 1 ciclo: 72°C 7min					

Figura 21: Amplificación del gen *MSH2*

III.4.1.5 AMPLIFICACIÓN DEL GEN MSH6.

Para la amplificación de los 10 exones del gene *MSH6* se establecieron 3 protocolos de PCR diferentes (figura 22). Los exones 1- 3 y 5-7 se amplificaron con la *Taq Flexi DNA Polymerasa*. El diseño de los *primers* para el exón 7 fue complejo debido a la presencia de una cola de poliT en la región intrónica más próxima al inicio de este exón. Las condiciones de amplificación de estos exones pueden verse en la figura 22.A.

El exón 8 al 10, debido al pequeño tamaño de los exones e intrones, se amplificó en un único fragmento (8-10) de PCR de 1247pb cuyo protocolo de amplificación se detalla en la figura 22.B. El exón 4 debido a su gran tamaño tuvo que ser dividido en 3 fragmentos denominados 4I, 4J y 4K. Los fragmentos 4I y 4J se han amplificado en una única PCR de protocolo y condiciones idénticas a las del fragmento constituido por los exones del 8 al 10, con la polimerasa *Taq Expand Long PCR System*. El fragmento 4K (1247pb) tiene un protocolo de amplificación independiente y diferente de los anteriores ya que a su vez se subdividió en 3 fragmentos (4KJ, 4KI y 4K2) amplificados según el protocolo tomado de Kolodner *et al.*²⁷⁸ para su amplificación (figura 22.C).

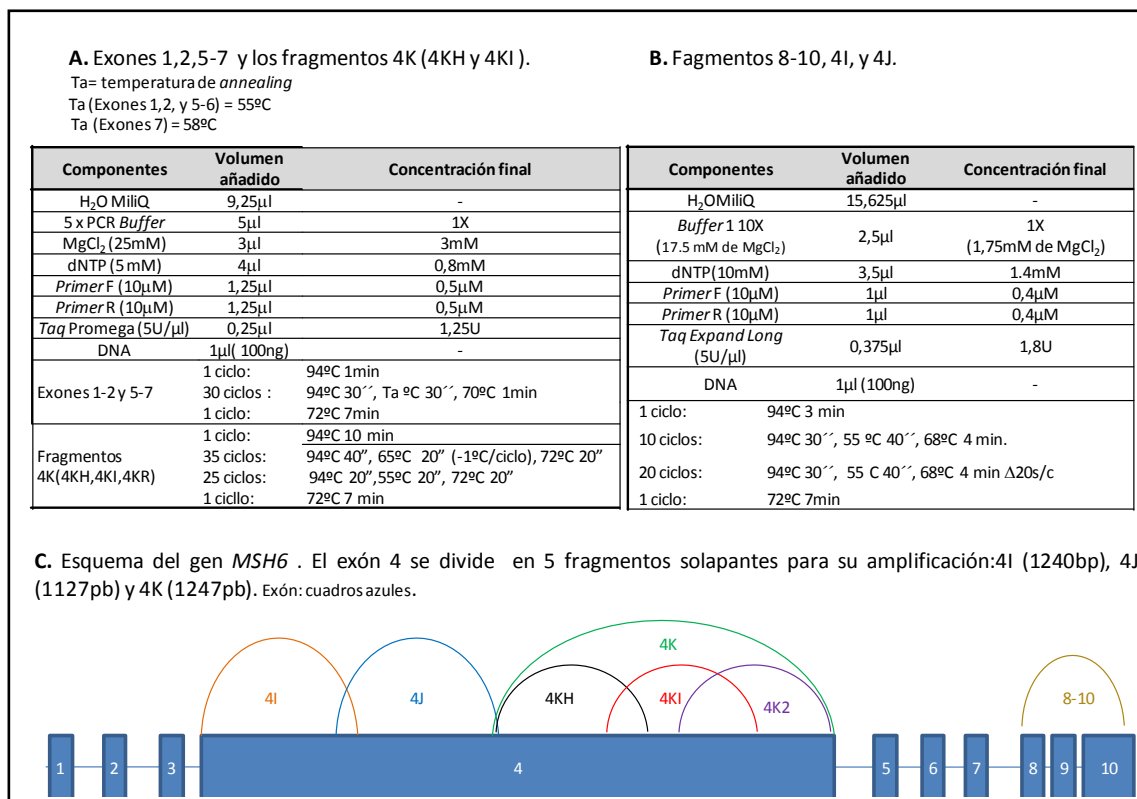


Figura 22: Amplificación del gen *MSH6*.

III.4.2 CHEQUEO Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.

Tras la amplificación se ha procedido al chequeo de los productos amplificados mediante la utilización de geles de agarosa *E-Gel*® 96 1% Agarose (GP) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para el chequeo de los controles negativos de amplificación se utilizaron geles de poliacrilamida (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Una vez confirmados los correctos resultados de la PCR, los productos de PCR son purificados mediante un protocolo enzimático con *EXOSAP-IT*® (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA). El *Exosap-it* es un compuesto de dos enzimas hidrolíticas, exonucleasa I recombinante y fosfatasa alcalina de camarón (*Pandauls borealis*), formuladas en un *buffer* especial. La exonucleasa degrada los residuos monocatenarios de los *primers* o de cualquier otro DNA producido en la PCR mientras que la fosfatasa se encarga de hidrolizar los dNTPs sobrantes de la mezcla de PCR. Las cantidades utilizadas para esta reacción fueron de 2,15 µL de producto amplificado y 0,85 µL de *Exosap-it*. Para llevar a cabo esta reacción, el termociclador mantiene la placa: 37°C durante 15 minutos (fase de tratamiento) y a 80°C otros 15 minutos (fase de inactivación). Los termocicladores utilizados para la purificación de las secuencias fueron los utilizados en los apartados anteriores.

III.4.3 REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN.

La reacción de secuencia se fundamenta en el método enzimático de Sanger. Los dideoxinucleótidos están marcados con distintos fluorocromos, en lugar de isótopos radiactivos, que van a permitir que el secuenciador automático determine la secuencia del gen. Para ello utilizamos el *BigDye terminator v.3.1. Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) que facilita la secuenciación, ya que permite llevar a cabo la reacción en un solo pocillo en el que se añaden los cuatro terminadores marcados. La secuenciación se realizó tanto en sentido *forward* como *reverse* y para ello se necesitaron las siguientes cantidades de reactivos/pocillo: 1 µL de *primer* (ANEXOS 1, 2, y 3 según el gen), 5,5 µL de agua *nuclease free*, 2,5 µL *BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer 5x* y 0,5 µL de *BigDye Terminator v3.1*. Las condiciones para la reacción fueron: 1 ciclo a 96°C durante 3min, 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 3'', *anealing* a 50°C durante 15'' y extensión a 60°C durante 4 minutos. Los termocicladores utilizados para la obtención de las secuencias fueron los ya descritos.

III.4.4 ELECTROFORESIS CAPILAR Y ANÁLISIS DE DATOS.

Los productos de secuenciación son separados mediante una electroforesis capilar utilizando el ABI3730, un secuenciador automático de 96 capilares que funciona de manera

totalmente automática inyectando las muestras en un capilar previamente cargado con un polímero(POP7) que funciona como un gel de secuencia. Esto permite separar fragmentos de DNA de cadena sencilla que se diferencian en una única base. A una altura determinada el láser del dispositivo detecta la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de DNA fluorescente y traduce dicha emisión en la secuencia correspondiente.

Para el análisis de las secuencias se utilizó el *software Staden Package 2003.0b1* (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK), en concreto los programas *Pregap4* y *Gap4*, que mediante la utilización de algoritmos matemáticos facilitan el manejo de las secuencias procedentes del secuenciador permitiendo su alineamiento automático y posterior análisis (figura 23). Este programa nos permite la comparación base a base de la secuencia alineada con respecto a su correspondiente secuencia de referencia *GenBank* : *APC* (NM_000038), *MUTYH* (MN_012222) *MLH1* (NM_000249.2), *MSH2* (NM_000251.1) y *MSH6* (NM_000179.1), permitiéndonos así determinar la existencia de cambios nucleotídico en cada una de las secuencias. Cada una de las mutaciones localizadas ha sido comprobada con una segunda extracción de DNA, amplificación y secuenciación con *primers forward y reverse*.

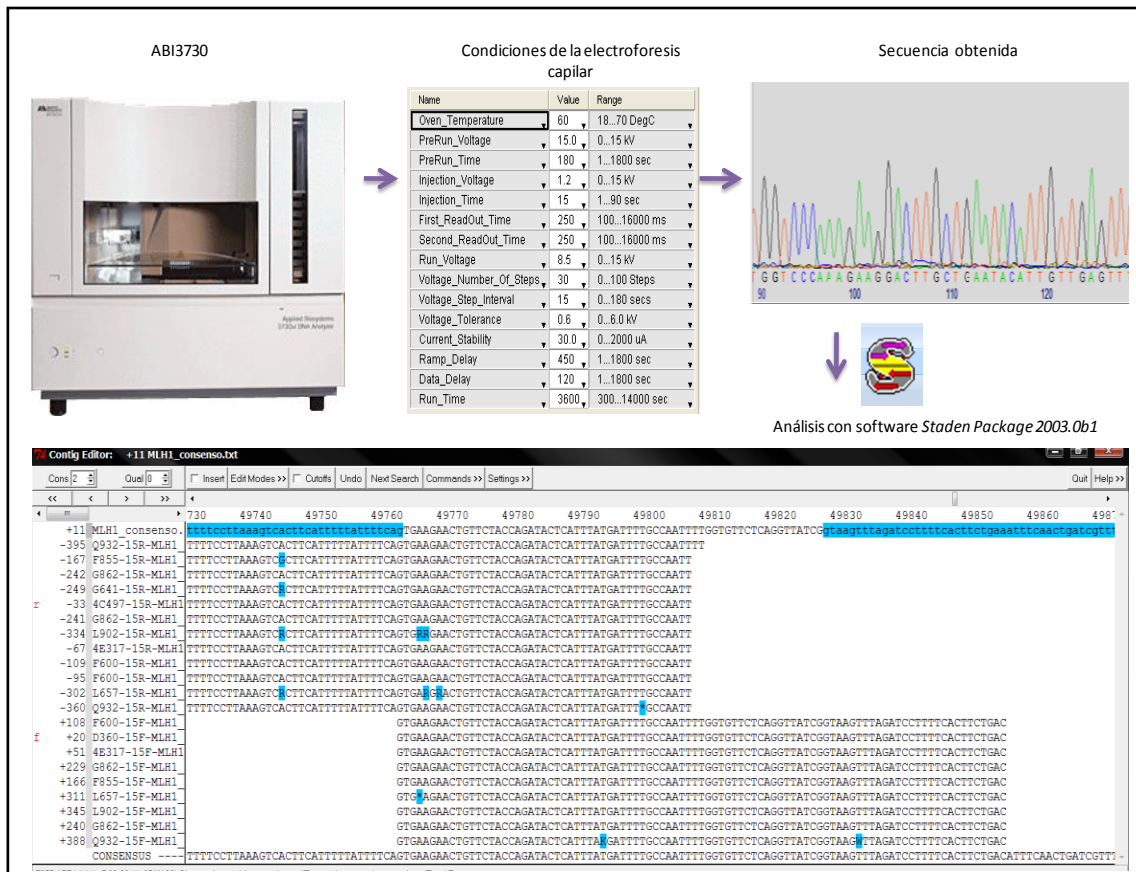


Figura 23: Secuenciación de productos PCR y análisis de datos.

III.5 ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS GENÓMICOS EN LOS GENES *APC*, *MLH1*, *MSH2* Y *MSH6*.

III.5.1 MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA).

El MLPA es una técnica creada para la detección de variaciones en el número de copias (delecciones/duplicaciones) de más de 40 secuencias diferentes en una misma reacción. Las diferentes sondas hibridarán en diferentes puntos de la región de interés, se ligarán 2 a 2 y posteriormente se amplificarán utilizando el mismo par de *primers* (PCR-*multiplex*).

El protocolo consiste en la hibridación del DNA con las sondas, que están divididas en dos mitades (figura 24.A): la *primera* es la región que se une a la secuencia diana específica flanqueada por la secuencia de un *primer* universal, y la segunda contiene estas dos mismas partes separadas por un fragmento de longitud variable que permite la generación de productos de amplificación de un tamaño lo suficientemente distinto como para ser separados por electroforesis. Las dos mitades están diseñadas de modo que ambas sondas puedan ser unidas a través de una ligasa si existe hibridación, generando una sonda continua flanqueada por los sitios de unión al *primer* que permite su amplificación por PCR (figura 24.B). Las cantidades de sonda ligadas, serán pues proporcionales al número de copia de la secuencia diana. Mediante un análisis de fragmentos y aprovechando la diferencia de tamaño de cada una de las sondas debido a un fragmento cebador de tamaño, se podrán identificar pérdidas o ganancias de material genético, atendiendo a la normalización de las áreas de cada pico con respecto a un control²⁹³.

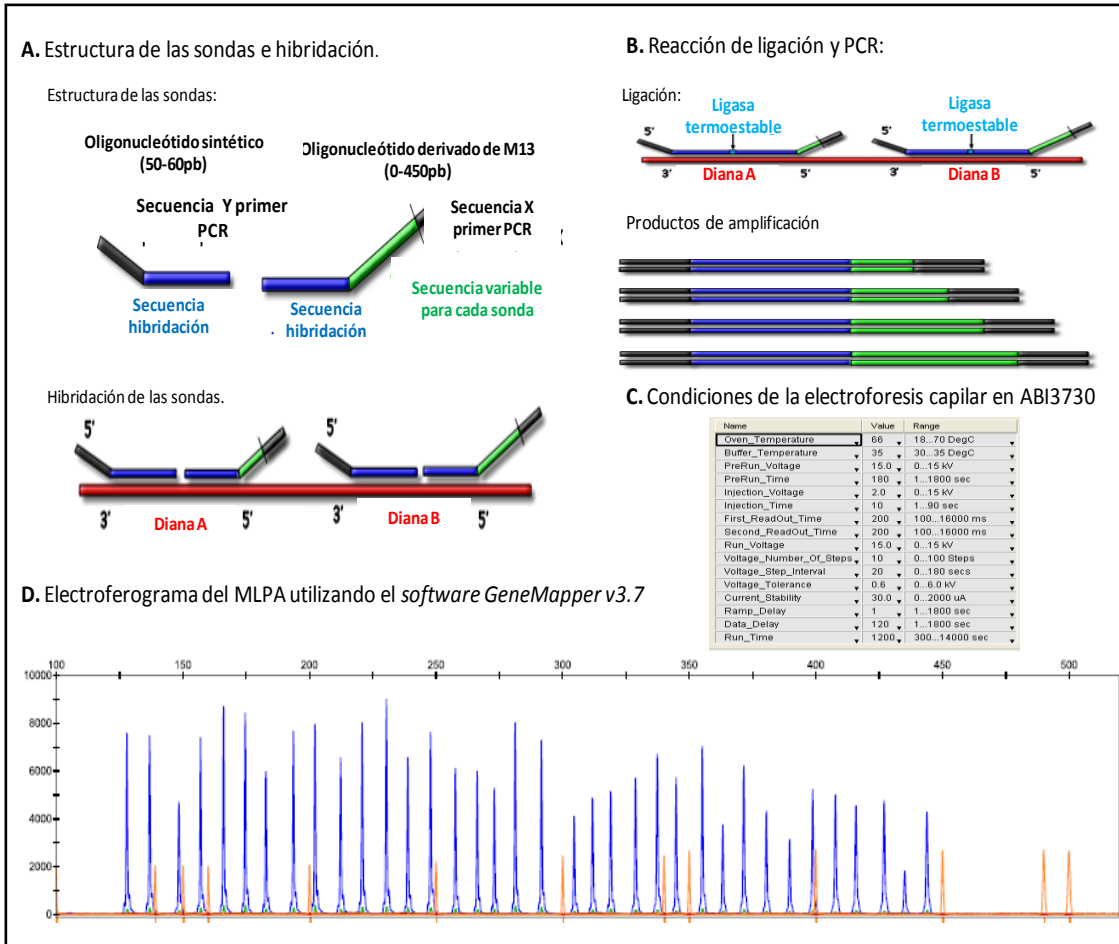


Figura 24: Análisis de grandes reordenamientos con MLPA.

Para nuestro estudio hemos utilizado cuatro kits MLPA de la casa comercial MRC-Holland (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), cada uno de los cuales contiene las sondas específicas para uno de los genes utilizados además de sondas control de amplificación que generan productos menores de 120pb, sondas control de cantidad de muestra (fragmentos Q) y sondas de control de desnaturalización (fragmentos D). Los kits fueron los siguientes:

3. SALSA MLPA KIT P043 APC: Está constituido por 36 sondas específicas diferentes que generan productos de amplificación comprendidos entre 130-445pb. De estas 36 sondas 23 se localizan distribuidas a lo largo de los distintos exones del gen APC mientras que las 13 sondas restantes presentan otras localizaciones cromosómicas, sirviendo así de controles negativos para los grandes reordenamientos Además contiene 2 fragmentos control que generan productos de amplificación menores de 120pb, cuatro fragmentos Q y un fragmento D dependiente de la ligación que actúa como control de ésta. Las sondas utilizadas se citan en el ANEXO VI.1

4. SALSA MLPA KIT P003 *MLH1-MSH2*: Este *kit* está constituido por 43 sondas de MLPA diferentes que generan productos de amplificación entre las 130-472pb. Además contiene 7 sondas control que generan productos menores de 120pb, 4 fragmentos Q y 3 fragmentos D. Las sondas utilizadas se citan en el ANEXO VI.2
5. SALSA MLPA KIT P248 *MLH1-MSH2*: Este *kit* se utilizó para la confirmación de grandes reordenamientos en los genes *MLH1* y *MSH2*. Contiene 45 sondas que generan fragmentos de amplificación de entre 130 - 463 nt. Estas sondas son específicas para los 19 exones de *MLH1*, los 16 exones de *MSH2*. y para 10 regiones cromosómicas distantes de estos dos genes (a excepción de dos sondas específicas para los genes *LRRFIP2* y *KCNK12* localizados en las proximidades de los genes *MLH1* y *MSH2* respectivamente). Además contiene 5 sondas control que generan productos menores de 120pb, 4 fragmentos Q y 3 fragmentos D. El listado detallado de las sondas se adjunta en el ANEXO VI.3
6. SALSA MLPA P008 *MSH6_PMS2*: Consta de 48 sondas específicas que generan productos de amplificación comprendidos entre los 130-463pb pertenecientes a los 10 exones del gen *MSH6* y a regiones concretas de los genes *PMS2*, *APC*, *MUTYH*, *MLH3*, *MSH3*, *MSH2*, *TACSTD1* y *MLH1*. También contiene 7 sondas control que generan productos menores de 120pb, los 4 fragmentos Q y los 3 fragmentos D. Las sondas que componen este *kit* se encuentran adjuntas en el ANEXO VI.4 El uso de este *kit* nos permitió analizar la presencia de grandes reordenamientos en el gen *MSH6* y el análisis de ciertos exones de alguno de los genes implicados en las rutas de reparación del DNA y que han sido descritos como posibles genes de susceptibilidad al HNPCC (*PMS2*, *APC*, *MUTYH*, *MLH3*, *MSH3*, *MSH2*, *TACSTD1* y *MLH1*).

El protocolo seguido es el proporcionado por el fabricante para todos los *kits* de MLPA al que se le han practicado unas pequeñas modificaciones para la optimización y mejora de los resultados. Estas modificaciones consisten en: el aumento del tiempo de desnaturalización de 5 a 8 minutos a 98°C, en la etapa desnaturalización del DNA, y en la modificación de la temperatura de *annealing* a de 60°C a 65°C, en la etapa de PCR. Es esencial el uso de un termociclador con la tapa calentada (105°C).

III.5.2 DETECCIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.

Los productos de PCR son separados mediante una electroforesis capilar utilizando el ABI3730 (figura 24.C). Para ello es necesaria una previa preparación de la muestra que implica la mezcla de 1 µl de ésta con 24µl de formamida desionizada (Hi-Di™) y con 1 µl de un marcador estándar interno denominado LIZ 500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). El marcador interno LIZ500 consta de 16 fragmentos de DNA de 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 y 500pb marcados con el fluoróforo LIZ500 que es detectada como una señal de color rojo por el secuenciador. La muestra es desnaturalizada

entonces a 95°C durante 3 minutos e inmediatamente metida en hielo durante 3 minutos. Esta desnaturalización ha de ser inmediatamente previa a introducción de la muestra en el secuenciador para la electroforesis capilar.

III.5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS Y ANÁLISIS DE DATOS.

Los datos resultantes de la electrophoresis capilar fueron analizados utilizando el *software GeneMapper v3.7*, lo que nos proporciona un patrón electroforético característico para cada muestra en el que aparecen cada una de las sondas analizadas representadas como picos de altura y áreas determinadas (figura 24.D). Previo al análisis numérico de alturas de los picos se comprobó el éxito de experimento mediante el análisis del patrón electroforético de cada muestra correspondientes a los productos no específicos de amplificación, los *primer-dimer*, los cuatro picos control de cantidad de DNA (controles DQ) y los 3 controles dependientes de ligación (controles DD).

Una vez comprobado el éxito de la reacción de MLPA, se procedió al análisis matemático de los resultados. Este análisis se realizó con el programa de cálculo *Excel de Microsoft Office* y consistió en una normalización de las áreas/alturas para una posterior comparación de estos valores entre diferentes muestras, siendo el pico de cada producto de amplificación el reflejo del número de copia relativo de la secuencia diana de la sonda en la muestra analizada. Esto generaría un gráfico de barras para cada uno de los picos analizados en cada muestra. Así oscilaciones en los valores normalizados en un 20% implicarían ganancia o pérdida de dosis génica en la región de unión de la sonda correspondiente. El electroferograma fue además evaluado visualmente para comprobar la concordancia con los resultados numéricos. Las muestras que presentaban cambios aparentes fueron analizadas en un segundo experimento. Todos los resultados positivos fueron confirmados por otra técnica como cDNA o FISH.

III.6 ESTUDIOS DE cDNA.

III.6.1 EXTRACCIÓN DEL RNA.

La extracción de RNA se realizó a partir de linfocitos de sangre periférica con RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Esta purificación necesita de un pretratamiento y homogenización de la muestra que consiste en una lisis celular con *Buffer RLT (RNAlater RNA Stabilization Reagen)* seguida de una extracción de RNA en columnas de silica (Qiagen RNeasy[®] Maxi Columns) capaces de aislar hasta 100ug de RNA. El protocolo de extracción fue el indicado por el fabricante. El volumen final de muestra de RNA obtenida es de 30µl. La conservación de este tipo de muestras se realizó a -80°C.

III.6.2 SINTESIS DEL cDNA.

La síntesis de cDNA se basó en la realización de una RT-PCR utilizando la reversotranscriptasa *SuperScript™ Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA), que permite conseguir cDNA de hasta 10kb a partir de RNA (figura 25.A y figura 25.B). El volumen final de muestra de cDNA obtenida es de 10µl.

III.6.3 DISEÑO DE PRIMERS Y CONDICIONES DE AMPLIFICACION.

Hemos realizado análisis de cDNA para la confirmación de las deleciones encontradas en los genes *APC* y *MLH1* (figura 25.C). Los *primers* utilizados se indican en el ANEXO VII. Los termocicladores utilizados fueron los anteriormente descritos para otras técnicas. Para la optimización y realización de las PCRs siempre se utilizó un control negativo (blanco de PCR) y un control positivo de amplificación en el que no está presente el reordenamiento a estudiar.

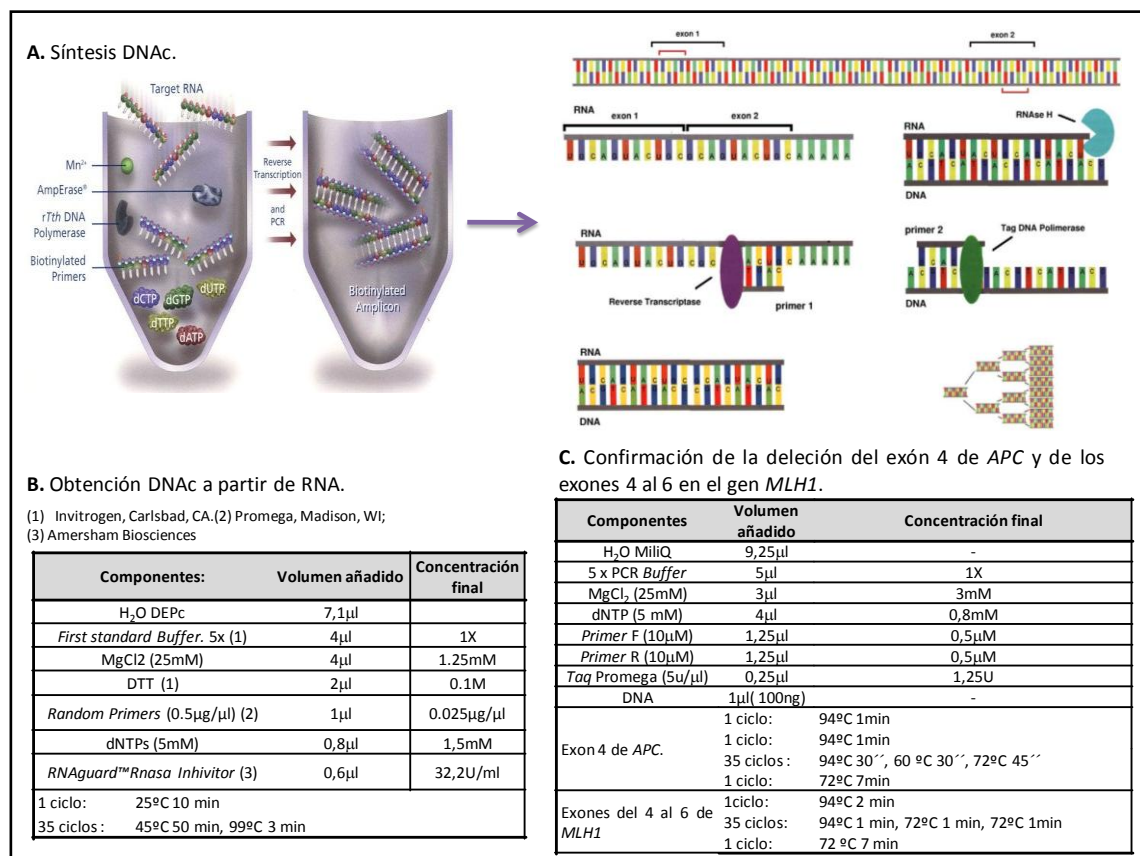


Figura 25: Estudios de cDNA.

III.6.4 SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO Y ANÁLISIS DE DATOS.

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados, secuenciados y analizados según los procedimientos anteriormente descritos para DNA genómico. Para el análisis de las secuencias se utilizó el *software Staden Package 2003.0b1*. Las secuencias de referencia *GenBank* utilizadas fueron las siguientes: *MLH1* (NM_000249) y *APC* (NM_001127511).

III.7 ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN p.Val600Gln DEL GEN *BRAF*.

Todas las muestras de tumores colorrectales en las que se detectó MSI fueron analizadas para la mutación p.Val600Glu del gen *BRAF*. La aparición de esta mutación está asociada con la hipermetilación del promotor del gen *MLH1*. Para ello se amplificó el exón 15 del gen *BRAF* y las regiones intrónicas adyacentes (Figura 26.A). Los *primers* utilizados para su amplificación y posterior secuenciación se diseñaron con el *Primer3* software (<http://frodo.wi.mit.edu/>) y se adjuntan en el ANEXO VIII. Los termocicladores utilizados fueron los descritos en anteriores apartados.

Los productos de PCR fueron chequeados, purificados y secuenciados en el ABI3730 tal y como describió anteriormente. El análisis de secuencias se realizó también con el *software Staden Package 2003.0b1* mediante comparación con la secuencia de referencia NM_004333 (figura 26.B).

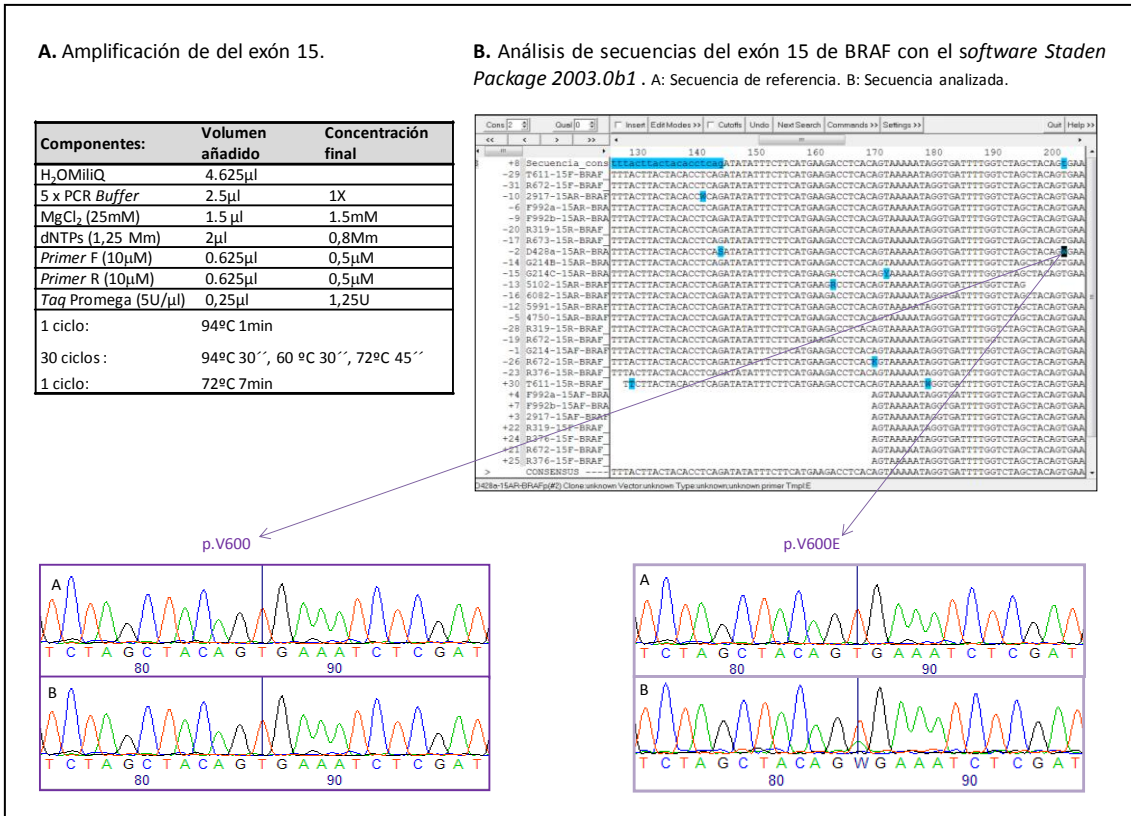


Figura 26: Análisis de la mutación p.Val600Gln de BRAF.

III.8 ESTUDIO DE VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (VUS).

Para el estudio de las variantes de significado incierto fue necesaria la recaudación de información, para lo que se acudió a

las diversas bases de datos específicas para los genes analizados (INSIGHT, HGMD, *Mismatch Repair Genes Variant Database*, *MMR Gene Unclassified Variants Database*, etc...) con el fin de obtener información sobre ellas: si estaba descrita, si existían estudios funcionales, el número de veces que había sido reportada en la bibliografía, etc. Mediante la utilización de las base de datos de polimorfismos de HapMap y dbSNP también se comprobó si estas variantes eran frecuentes en población caucasoide, en cuyo caso se tomaron los datos de frecuencias en población europea. Para la clasificación de VUS se realizó un análisis basado en una aproximación múltiple que combinó las predicciones bioinformáticas (de alteración del *splicing*, grado de conservación aminoacídico posible alteración de la actividad y función proteica, posible interrupción de elemento *cis* (ESE, ESS)), con estudios poblacionales, de cosegregación, con información fenotípica del portador y una revisión bibliográfica.

III.8.1 ESTUDIOS *in silico*.

Se han utilizado diferentes *softwares* para la predicción *in silico* de las *VUS* dependiendo del tipo de *VUS* (*missense*, sinónima o de *splicing*) localizada:

I. Variantes codificantes: Para las variantes *missense* localizadas se han utilizado 6 *softwares* basados en el grado de conservación aminoacídica entre las distintas especies, afectación a la estructura y función proteica y posible interrupción de los elementos *cis exónicos* (*ESE ESS*) implicados en la regulación del *splicing*. En el caso de las variantes sinónimas, la existencia de un cambio nucleotídico y no aminoacídico impide la realización de estudios de conservación interespecífica y de alteración de la estructura y función proteicas, tan sólo pudiéndose realizar predicciones sobre la posible interrupción de elementos *cis*.

1. *Align-GVGD* (http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php). Este programa atendiendo a las características biofísicas de los aminoácidos y a la realización de alineamientos múltiples entre especies establece un *score* que predice el impacto del cambio aminoacídico en la proteína, y por tanto el grado de patogenicidad (deletérea o neutra) de las sustituciones *missense*. Este programa nos permite por tanto valorar el grado de conservación aminoacídico del cambio analizado, ya que las regiones con importancia funcional se conservan evolutivamente. Así según el *score* se establecen rangos que estiman la patogenicidad de la variante: siendo el C_0 la de menos probabilidad de patogenicidad y el C_{65} la mayor probabilidad de patogenicidad.
2. *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*, <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>). Este algoritmo permite conocer los posibles efectos de una sustitución aminoacídica sobre la función proteica en base a homología entre secuencias y las propiedades físicas de los aminoácidos. El programa busca secuencias similares, las alinea y posteriormente calcula los *scores* en base a los diferentes aminoácidos que aparecen en en cada posición del alineamiento proporcionando el resultado de si afecta o no a la función de la proteína.
3. *PMut* (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) La predicción del grado de patogenicidad se basa en la determinación del grado de conservación de la sustitución proteica y posible alteración de la estructura 3D de la proteína. Este algoritmo genera un valor o *score* que es designado como patógeno para valores $>0,5$, y neutro para valores inferiores. Esta herramienta ha sido utilizada para la predicción de la patogenicidad de todas las variantes *missense* localizadas en el estudio.
4. *PolyPhen* (*Prediction of Functional Effect of Human nsSNPs*, <http://geneticsbwh.harvard.edu/pph/>). La predicción del grado de patogenicidad se basa en la realización de tres tipos de aproximaciones: caracterización de la secuencia donde se produce la sustitución, grado de conservación de la sustitución proteica, posible alteración de la estructura 3D

de la proteína. Atendiendo a estas predicciones el Polyphen establece las siguientes clasificaciones:

- a) Probablemente deletérea: Alta probabilidad de patogenicidad por afectar a la estructura o función proteica.
 - b) Posiblemente deletérea: Se supone que la sustitución aminoacídica puede afectar a la función o estructura proteica.
 - c) Benigna: Alta probabilidad de que no tenga ningún efecto deletéreo.
 - d) Incierto: Cuando no existen datos suficientes para que el programa realice una predicción.
5. MAPP_MMR (<http://mappmmr.blueankh.com/Impact.php>) se ha utilizado únicamente para la predicción de la patogenicidad de las variantes *missense* localizadas en los genes *MLH1* y *MSH2*. Se designan como patógenas aquellas variantes con un *score* >4.55.
 6. PESX (Putative *exonic splicing enhancers/silencers*, <http://cubweb.biology.columbia.edu/pesx/>). Este algoritmo identifica las secuencias susceptibles de funcionar como elementos *cis* en la regulación del *splicing: enhancer (ESE)* o *silencer (ESS)*. La alteración de alguno de estos elementos *cis* por el cambio aminoacídico podría producir la alteración del *splicing*.
 7. ESE-FINDER²⁹⁴ (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>): Sus predicciones se basan la determinación del grado de afectación que produce el cambio aminoacídico sobre la unión de las proteínas SR, y por tanto la posibilidad de que el cambio funcione como disruptor de elementos *cis*.
1. Variantes intrónicas: El estudio *in silico* de las variantes intrónicas y su posible implicación en la alteración del *splicing* requirió de la utilización de dos *softwares*: *NN splice (BDGP)*: http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) y *Gen Splicer* (http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html), algoritmos que permiten la identificación de secuencias que pueden funcionar como donadores y aceptores de *splicing* por homología y grado de conservación con otras especies.

III.8.2 ESTUDIOS EN POBLACIÓN CONTROL.

Con el fin de estimar la frecuencia de las variantes de significado incierto descritas en este estudio fueron genotipadas en una cohorte de 250 individuos controles sin historia personal de cáncer, con el fin de establecer su frecuencia en la población de estudio. Los *primers*, protocolo de PCR y condiciones de la misma utilizadas fueron las que se corresponden con el exón y gen correspondiente, ya han sido descritas en apartados anteriores.

III.8.3 ESTUDIOS DE COSEGREGACION.

En aquellas muestras en las que se detectaron VUS se intentó realizar estudios de cosegregación para comprobar si la variante cosegrega con la enfermedad. Para ello se analizaron los familiares afectos de menor edad pertenecientes a la misma generación del probando o a generaciones anteriores- Este tipo de análisis presenta una serie de limitaciones asociadas a la presencia de fenocopias o penetrancias parciales de las variantes estudiadas. Normalmente este tipo de estudios se utiliza para descartar la patogenicidad de una mutación y no para confirmarla.

III.9 NOMENCLATURA DE LAS MUTACIONES.

La nomenclatura de las distintas mutaciones y variantes localizadas sigue la normativa propuesta por la HGSV²⁹⁵ como secuencias de referencia los cDNA de los genes *APC* (NM_000038), *MUTYH* (U63329), *MLH1* (NM_000249.2), *MSH2* (NM_000251.1), *MSH6* (NM_000179.1) y *BRAF* (NM_004333). La utilización de la secuencia de referencia U63329 en lugar de la NM_012222 para el gen *MUTYH* permite comparar nuestros datos con los de otras publicaciones anteriores. Todas las mutaciones y variantes detectadas en este estudio han sido confirmadas en dos extracciones independientes, lo que confirma la fiabilidad de los resultados obtenidos y la validación de las diferentes técnicas utilizadas.

III.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se ha utilizado la herramienta estadística Ji-Cuadrado o χ^2 (utilizando las correcciones de Yates y Fisher) para analizar las diferencias de frecuencias de mutaciones entre en los genes *APC*, *MUTYH* y *MMR* en población gallega y otras poblaciones españolas. Todos estos análisis fueron realizados con la ayuda del paquete (SPSS Inc., Chicago IL).

IV. RESULTADOS

IV.1 SÍNDROMES POLIPÓSICOS: POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR Y POLIPOSIS ASOCIADA A *MUTYH*.

IV.1.1 ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *APC*:

Se analizó el gen *APC* en 48 familias, de las que un 39,6% (19/48) resultaron positivas al detectarse 19 mutaciones causales en este gen: 15 mutaciones puntuales y 4 grandes reordenamientos.

Las mutaciones puntuales en el gen *APC* son responsables de un 31,25% (15/48) de los casos FAP. En su mayoría estas mutaciones fueron del tipo *nonsense* y *frameshift* y se asociaron con fenotipos clínicos heterogéneos como se puede observar en la Tabla 12. Los pacientes GAL-07, GAL-17 y GAL-25 fueron portadores de tres nuevas mutaciones *frameshift*, c.147_150del/ACAA (p.Lys49AsnfsX20), c.2900delT, (p.Val967AlafsX13) y c.4219_4220delAG (p.Ser1407XfsX1), todas ellas deleciones de unos pocos nucleótidos que generan la alteración de la pauta de lectura y la aparición de un codón de parada (X) prematuro. El fenotipo de estos pacientes presenta una mayor severidad cuando las mutaciones se localizan al inicio y mitad del exón 15 (GAL-17 y GAL-25), con respecto a las localizadas en los extremos 3' y 5' del gen (GAL-07). Se ha descrito una nueva mutación *nonsense* c.1402 G>T (p.Glu468X) en el paciente GAL-19 asociada a un fenotipo AFAP (en base a su número de pólipos, 20-50), aunque esta mutación se localiza en una región asociada a fenotipo FAP.

Los dos *hotspots* descritos en población caucásica en el gen *APC* (codones 1061 y 1309) han sido detectados tan sólo en un 5,26% (1/19) de los pacientes *APC*-positivos. El análisis de cada uno de estos *hotspots* por separado permitió observar la ausencia del codón 1061 entre los pacientes *APC*-positivos (frecuencia del 0%), mientras que el codón 1309 apareció tan sólo en uno (GAL-24) (5,26%, 1/19) de los pacientes gallegos estudiados portadores de mutaciones puntuales en el gen *APC*. Hemos realizado un análisis mediante X^2 con corrección de Fisher para cada uno de los dos *hotspots* con el fin de determinar si la frecuencia para estas dos mutaciones entre población gallega es diferente a la de otras poblaciones españolas. La comparación se realizó con población catalana, donde estos dos *hotspots* representan el 38,46% (5/13) de las familias *APC* positivas, 23,07% (3/13) para la deleción de 5pb en el codón 1061 y 15,38% (2/13) para el 1309²⁹⁶. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la frecuencia de la variante 1061 ($p=0,058$) pero no para la 1309 ($p=0,356$).

Tabla 12: Mutaciones identificadas en el gen APC* pacientes gallegos con poliposis colónica y características fenotípicas asociadas.

ID	ED	Número de adenomas	CCR	Manifestaciones Extracolónicas.	Historia familiar (edad)**	Mutación	Exón	Ref.
GAL-16	23	100	No	TD,OST	ND	c.(?_-30)_(*220_?)del	Alelo completo	129
GAL-27	42	>100	No	No	Padre: CCR (36). Abuela: CCR (60).	c.(?_-30)_(*220_?)del	Alelo completo	129
GAL-14	20	>100	No	ND	No	c.1-?-8532+?del	1-15	132
GAL-07	50	15	No	No	Madre CCR (?).	c.147-150delACAA (p.Lys49AsnfsX20)	2	296
GAL-15	33	>100	No	ND	No	c.423-?-531+?del	4	149
GAL-11	41	>100	Si	No	Padre: CCR (?).	c.646C>T (p.Arg216X)	6	123
GAL-26	15	>100	No	No	Padre: FAP+CCR (47).	c.646 C>T (p.Arg216X)	6	123
GAL-09	33	12	No	No	No	c.994C>T (p.Arg332X)	9	149
GAL-10	64	50	Si	No	Madre CCR (68).Tía: CCR (60).	c.1072C>T (p.Gln358X)	9	297
GAL-19	ND	20-50	No	No	Madre: CCR (46).	c.1402 G>T (p.Glu468X)	10	296
GAL-13	20	>100	Si	No	No	c.1620_1621dupA (p.Gln541ThrfsX19)	12	298
GAL-18	33	>50	No	No	Padre: CCR (42).	c.1682dupA (p.Thr562AsnfsX19)	13	290
GAL-02	30	0	No	CP	No	c.1756 A>T (p.Lys586X)	14	128
GAL-01	23	<100	No	No	Hermano: FAP (20s).	c.2413C>T (p.Arg805X)	15	155
GAL-17	41	100	Si	OST	Padre: CCR (45). Hermana: CCR (34).	c.2900deIT (p.Val967AlafsX13)	15	296
GAL-12	34	<100	No	No	Padre: CCR (40s). Tío: CCR (40s). Abuelo: CCR (40s).	c.3467_3470delAAGA (p.Glu1156GlyfsX8)	15	138
GAL-24	52	>100	No	CHRPE	No	c.3927_3931delAAAGA (p.Glu1309AspfsX4)	15	138
GAL-04	60	>100	Si	Otras	No	c.4033G>T (p.Glu1345X)	15	299
GAL-25	43	>100	Si	No	ND	c.4219-4220delAG (p.Ser1407XfsX1)	15	296

*La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del GenBank *NM_000038.3 (APC)*. Se marcan en negrita aquellas mutaciones descritas por primera vez en este estudio.

**Se refiere a la edad de diagnóstico de la enfermedad.

ID: Identificación del paciente. ED: Edad de diagnóstico de la poliposis. Ref: Referencias bibliográficas. TD: Tumores desmoides. OST: osteomas. ND: no disponible. CP: Carcinoma papilar de tiroides. CHRPE: Hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de la retina. Otras: Tumor en ovario y adenoma suprarrenal. ND: No disponible.

La frecuencia de los reordenamientos es del 8,3%(4/48), lo que representó un 12% (4/48-15) de los casos de poliposis en los que no se habían detectado mutaciones en el gen *APC* mediante la utilización de técnicas convencionales (*APC*-negativos). Estos grandes reordenamientos fueron grandes deleciones de uno o más exones y han sido identificados en 4 familias mediante MLPA. Se detectaron 3 deleciones distintas en *APC*: una deleción del exón

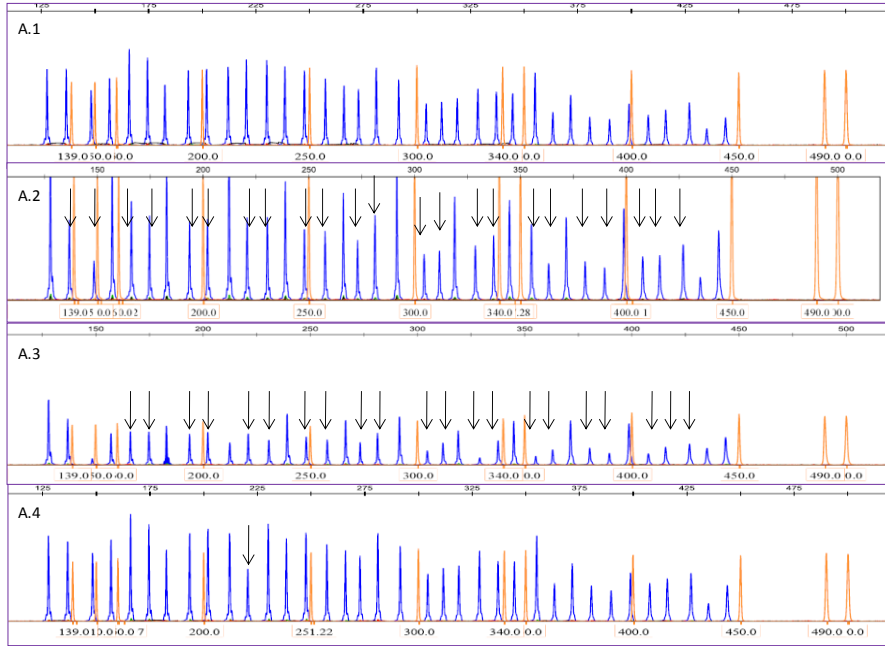
4(c.423-?_531+?del) (GAL-15), una deleción de los exones 1 al 15 (c.1-?_8532+?del) (GAL-14) y dos deleciones del gen completo (c. (?_-30)_(*220_?)del) (GAL-27 y GAL-16), incluyendo el promotor (figura 27). Estas 4 familias presentaron un fenotipo clásico con más de 100 pólipos, una mediana de edad de aparición de la enfermedad de 28 años (con un rango de 20-42 años) y manifestaciones extracolónicas, del tipo tumores desmoides y osteomas, en el caso de paciente GAL-16 que porta la deleción total del gen.

Los resultados obtenidos para los grandes reordenamientos fueron replicados en al menos dos experimentos independientes y confirmados mediante la utilización de otras técnicas: análisis de RNA en el caso de la deleción del exón 4 y FISH en el caso de la deleción total (figura 28). La deleción del exón 4 abarca en el *cDNA* desde el primer hasta el último nucleótido del exón 4, lo que supone un cambio en la pauta de lectura que daría lugar a una proteína truncada por la aparición de un codón de parada prematuro en la posición 148 de la proteína mutada (figura 28.A). La deleción total del gen fue corroborada mediante ensayo FISH (figura 28.B).

Además se han descrito 10 variantes de significado incierto y 11 cambios sin implicaciones clínicas (ANEXO IX). El estudio de las VUS localizadas en el gen *APC* se llevará a cabo en apartados posteriores.

A. Electroferograma de productos de MLPA

A.1) control normal; A.2) delección del gen completo incluyendo el promotor; A.3) una delección de los exones 1 al 15; A.4) una delección del exón 4. Las flechas señalan los picos disminuidos indicativos de las regiones delecionadas.



B. Resultados del análisis en Excel del MLPA.

B.1) Muestra control; B.2) Delección total del gen. B.3) Delección de los exones 1 al 15; B.4) Delección del exón 4 de APC. En amarillos se marcan los valores correspondientes a las delecciones en alguno de los exones del gen APC.



Figura 27: Resultados de grandes reordenamientos del gen APC mediante la utilización de la técnica MLPA.

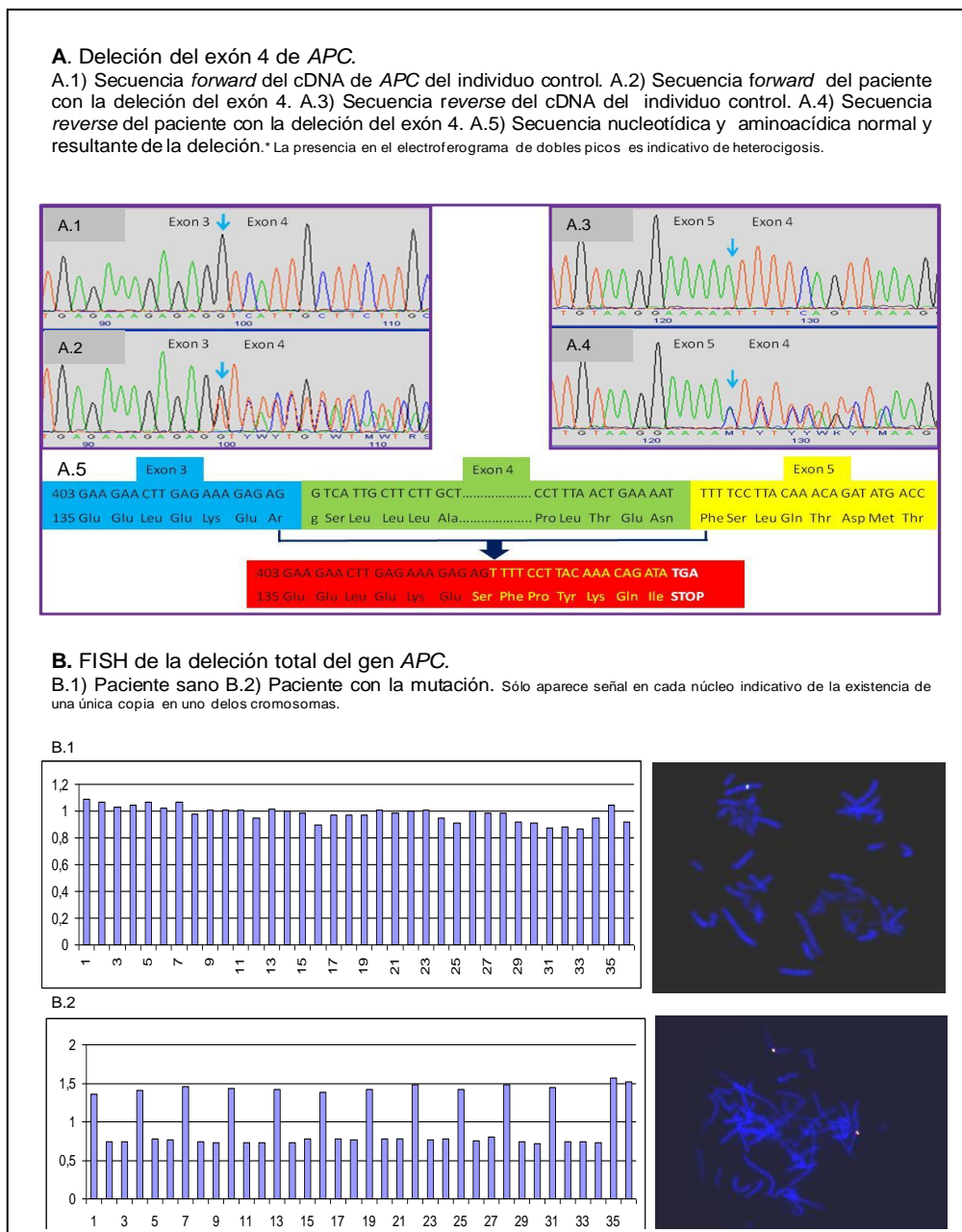


Figura 28: Confirmación de los resultados de grandes reordenamientos en el gen APC.

IV.1.2 ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN MUTYH:

En las 29 familias en las que no se detectaron mutaciones causales en el gen APC se analizó el gen *MUTYH*. Además en este estudio se incluyeron 9 familias pertenecientes a un estudio anterior que tampoco habían presentado mutaciones en el gen *APC*²⁹⁰. Así, en las 38 muestras analizadas, se detectó un 21% (8/38) de portadores bialélicos. Las mutaciones *missense* fueron las predominantes con un 81,25% (13/16), seguidas de *frameshift* con un 12,5% (2/16) y *nonsense* con un 6,25% (1/16). En la tabla 13 podemos observar el espectro

mutacional asociado a este gen para nuestra cohorte de estudio, siendo las mutaciones p.Tyr165Cys y p.Gly382Asp (*hotspots* característicos de población caucásica) los mayoritariamente representados. La frecuencia alélica para estas dos variantes en pacientes con MAP es de un 81%(13/16), siendo la frecuencia del alelo p.Tyr165Cys y p.Gly382Asp similar (37,5% vs 43,7%).

Tabla 13: Mutaciones identificadas en el gen *MUTYH* *en portadores bialélicos y sus correlaciones fenotípicas.

ID	EM	Número de adenomas	CCR	ME	Historia familiar (edad)**	MUTYH		Ref.
						1 ^{er} Mutación	2 ^a Mutación	
GAL-08	43	25-30	Si	No	No	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	52
GAL-21	52	<100	No	No	No	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	52
GAL-22	ND	40-60	No	No	Dos hermanos y la madre: CCR (50s).	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	52
GAL-05	58	<100	Si	No	ND	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	52
GAL-06	ND	40-100	No	No	Hermana: AFAP (?).	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	52
GAL-20	45	<100	No	No	Dos hermanos: AFAP (¿)+CCR (?).	c.1131 C>T (p.Gln377X)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	52,169
GAL-03	44	31-100	Si	No	No	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	52
GAL-23	62	>30	Si	No	No	c.1186_1187insGG (p.Glu396GlyfsX43)	c.1186_1187insGG (p.Glu396GlyfsX43)	164

*La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del GenBank U63329 (*MUTYH*). ID: Identificación del paciente.

**Se refiere a la edad de diagnóstico de la enfermedad.

EM: Edad de manifestación de la poliposis. Ref: Referencias. CCR: Cáncer colorrectal. ME: Manifestaciones extracolónicas. ND: No disponible.

Los individuos portadores de mutaciones bialélicas en *MUTYH* presentan un fenotipo atenuado de poliposis (<100 pólipos), con una mediana de edad de diagnóstico de la poliposis de 48,5 años (con un rango de 43 a 62 años), ausencia de manifestaciones extracolónicas y un patrón de herencia de poliposis recesivo o aparente aparición esporádica. Si bien el paciente GAL-22 presentó una aparente transmisión vertical de la enfermedad.

Se han detectado 2 pacientes (GAL-70, GAL-80) portadores monoalélicos (5,3% ,2/38) de mutaciones de relevancia funcional en el gen *MUTYH* (p.Tyr165Cys y p.Gly382Asp) que no han sido incluidos como pacientes *MUTYH*-positivos. Además también se han localizado en el gen *MUTYH* 5 VUS y 7 variantes sin aparente relevancia clínica (ANEXO IX). El estudio de estas VUS se lleva a cabo en el siguiente apartado.

IV.1.3 ESTUDIO DE VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (VUS) EN LOS GENES *APC* Y *MUTYH*.

El análisis de mutaciones realizado para los genes *APC* y *MUTYH* resultó en la identificación de 15 VUS, de significado clínico desconocido (tablas 14, 15 y 16). Dentro de este grupo de VUS se localizaron tanto missense (con posible efecto patogénico al implicar un cambio aminoacídico), variantes intrónicas (con una posible implicación en la alteración del proceso de *splicing*) como alteraciones sinónimas.

Identificamos 10 VUS en el gen *APC*, 8 codificantes (p.Lys150Lys, p.Ile544Thr, p.Ala571Ala, p.Arg653Arg, p.Ile1055Met, p.Arg1786Thr, p.Gln2291His y p.Ser2621Cys) y 2 intrónicas (c.423-3 T>G y c.1803+3 A>G) (tabla 15 y 16). Las variantes c.423-3 T>G, p.Ile544Thr, c.1803+3 A>G, p.Ala571Ala, p.Ile1055Met, p.Arg1786Thr y p.Gln2291His del gen *APC* se describen por primera vez en este estudio.

Se ha podido establecer el carácter probablemente neutro de las variantes p.Ala571Ala, p.Arg653Arg y p.Ser2621Cys. Las variantes p.Arg653Arg y p.Ser2621Cys del gen *APC* fueron encontradas tras analizar 250 controles con una frecuencia del 1,2%. Los estudios de predicción de alteración de la función y estructura proteica les asignaron un carácter neutro que fue avalado por datos bibliográficos de estudios *in vitro* (tabla14). En el caso de la variante p.Ser2621Cys se pudo conseguir sangre de los familiares de paciente GAL-28, lo que nos permitió realizar un estudio de cosegregación de la variante con la enfermedad (figura 29). Los resultados obtenidos mostraron que la variante no cosegregaba con la enfermedad, por lo que se descartó la posible patogenicidad de este cambio alélico. Resultó relevante la localización en la primera base del exón 15 del gen *APC* de la variante p.Arg653Arg (c.1959 G>A), ya que esta región se encuentra implicada en la definición de los bordes exónicos. Las predicciones *in silico* del *splicing* indicaron un posible efecto deletéreo como resultado de la alteración del mismo, aunque estudios funcionales *in vitro* negaron esta posible implicación (tabla 14). En el caso de la variante p.Ala571Ala los estudios *in silico* indicaron un carácter totalmente neutro que se vieron ratificados con el hecho de que este cambio apareció en un paciente portador de una mutación bialélica en el gen *MUTYH*, que sería la responsable del fenotipo de poliposis de este paciente.

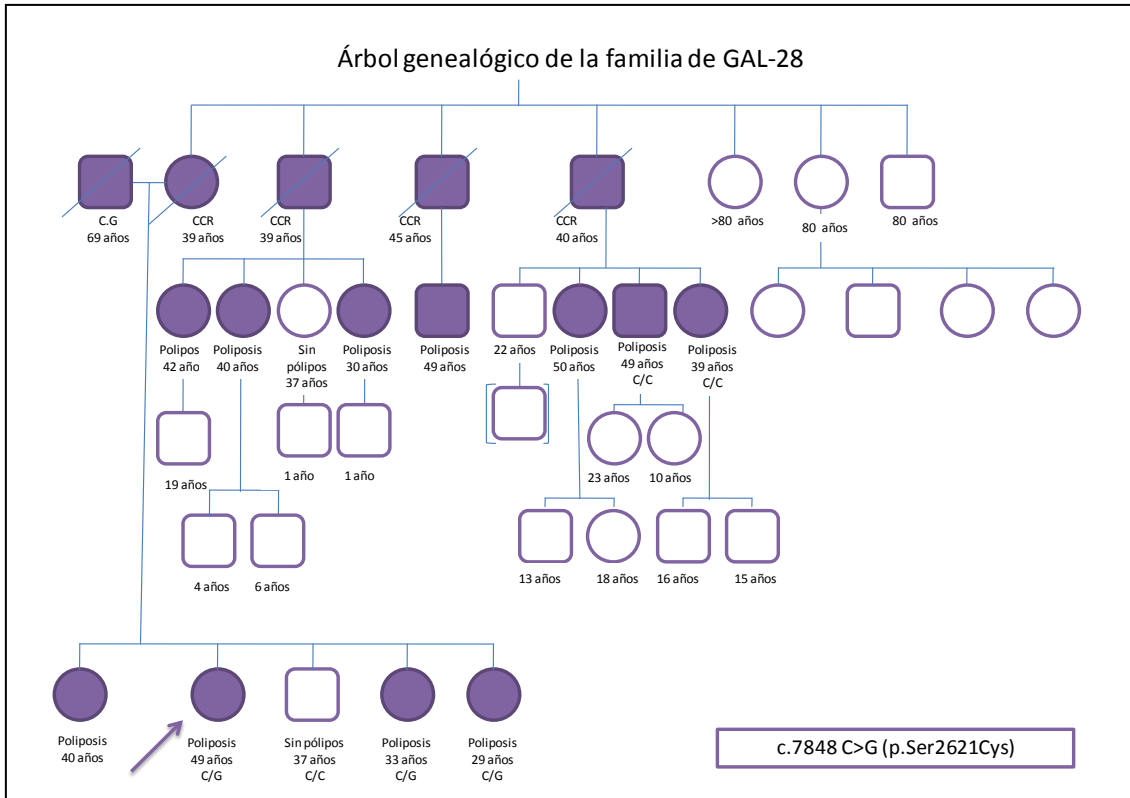


Figura 29: Árbol genealógico de la familia portadora de la variante p.Ser2621Cys del gen APC.

En cuanto a las demás variantes de *APC* (c.423-3 T>G, p.Lys150Lys, p.Ile544Thr, c.1803+3 A>G, p.Ile1055Met, p.Arg1786Thr y p.Gln2291His) han permanecido como VUS a espera de la realización de estudios funcionales. Todas estas variantes también fueron genotipadas en población control, no apareciendo representadas en ninguno de los 500 cromosomas analizados.

La variante p.Gln2291His presentó unas predicciones que parecen evidenciar un probable carácter neutro del cambio, aunque no existen estudios funcionales que defiendan esta posibilidad. Los resultados de los estudios *in silico* asignarían quizá cierta patogenicidad a las variantes p.Ile544Thr, p.Ile155Met y p.Arg1786Thr, ya que se localizan en aminoácidos alta o moderadamente conservados y algunas de las predicciones establecieron una posible alteración de la función y la estructura proteica. Sin embargo la variante p.Lys150Lys según los estudios *in silico* tendría un papel neutral, aunque la ausencia de estudios funcionales no nos permitió corroborar este papel. Resultó interesante el hecho de que las variantes p.Lys150Lys, p.Ile544Thr y p.Gln2291His fueran detectadas en un mismo paciente (GAL-43) diagnosticado de poliposis (>10 pólipos) a los 65 años y con historia familiar de CCR (tabla 17).

Tampoco se ha podido establecer resultados conclusivos en el caso de las variantes intrónicas c.423-3 T>G y c.1803+3 A>G. Las predicciones bioinformáticas establecieron un carácter neutro de estas variantes, pero la ausencia de estudios funcionales y su localización en posiciones altamente conservadas de la región de unión exón-intrón pusieron en duda esta presunta neutralidad (tabla 16). Estamos pendientes de la realización de estudios de RNA para estas variantes.

RESULTADOS

Tabla 14: Variantes de significado incierto codificantes descritas el gen APC*.

Gen	Variante	Exón	Variante	NCa	FrCa	Nco	FrCo	SNP	DP ^a	Predicciones <i>in silico</i>										C.M (gen)
										G.C ^b	GVGD ^c	SIFT ^d	pMut ^e	Poly Phen ^f	ESE-Finder ^g	PESX ^h	Splicing ⁱ		<i>in vitro</i> ^(k)	
																	Gen Splicer	BDGP		
APC	c.540 A>G (p.Lys150Lys)	4	Sinónima	1/48	2%	0/250	0%	No	1	NE	NE	1	NE	NE	(+)SRp40	1	No	No	No	No
	c.1631 T>C (p.Ile544Thr)	13	Missense	1/48	2%	0/250	0%	No	1	+	1	1	1	2	(+)SRp40	NR	No	No	No	No
	c.1713 A>G (p.Ala571Ala)	13	Sinónima	1/48	2%	0/250	0%	No	1	NE	NE	1	NE	NE	NR	1	No	No	No	Si (MUTYH)
	c.1959 G>A (p.Arg653Arg)	15	Sinónima	2/48	4,2%	3/250	1,2%	No	1	NE	NE	1	NE	NE	(-)SRp40,(+) SF2/ASF (+) AF2/ASF-(IgM-BRCA)	NR	Si	No	SP/N (1)	No
	c.3165 A>G (p.Ile1055Met)	15	Missense	1/48	2%	0/250	0%	No	2	+	1	1	1	1	(-)SRp55(+) SF2/ASF (+) AF2/ASF-(IgM-BRCA)(-)SRp40	2	No	No	No	No
	c.5357 G>C (p.Arg1786Thr)	15	Missense	1/48	2%	0/250	0%	No	-	≈	1	1	2	2	(+) SRp55	NR	No	No	No	No
	c.6873 A>T (p.Gln2291His)	15	Missense	1/48	2%	0/250	0%	No	3	NE	1	1	2	1	NR	NR	No	No	No	No
	c.7848 C>G (p.Ser2621Cys)	15	Missense	1/48	2%	3/250	1,2%	No	-	≈	1	1	2	1	(+)SRp40	NR	No	No	SP/N (2)	No

*La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del *GenBank* NM_000038.3 (*APC*). Las variantes descritas por primera vez en este estudio están destacadas en negrita. Nca= Número de casos en los que se ha encontrado la variante. Fca= Frecuencia de la variante en casos. Nco= Número de controles en los que se ha localizado la variantes. Fco= Frecuencia de la variante en controles. NE: no evaluable.

^aDP: Dominio proteico. (1) Armadillo. (2) Repeticiones de 15 aminoácidos (3) Dominio básico de *APC*. (-): Ninguno.

^bGrado de conservación aminoacídica. (-) residuo poco conservado. (≈) Residuo moderadamente conservado. (+) Residuo altamente conservado. NE: No evaluable.

^cPredicción GVD: (1) Clase 0 o bajo riesgo; (2) C0> clase < C65 o riesgo moderado, (3) Clase >C65 o riesgo alto, NE= No evaluable.

^dPredicción SIFT: (1) No afecta a la proteína, (2) Afecta a la proteína.

^ePredicción pMut: (1) Score <0,5, neutra, (2) Score >0,5, patógena.

^fPredicción con PolyPhen: (1) Benigna, (2) Posiblemente deletérea. (3): Probablemente deletérea.

^gESE-finder: (+) Génesis de un lugar de unión para proteína SR. (-) Eliminación de un lugar de unión para proteínas SR, NR: No relevante.

^hPredicción PESX: (1) Presunto *enhancer*, (2) Presunto *silencer*, NR: No relevante.

ⁱPredicciones acerca de la alteración del *splicing*.

^jEstudios *in vitro*: SP: Estudios de *splicing* en RNA. N: Neutra. No: No existen estudios.

^kReferencias: (1) Aretz *et al.* 2004¹³¹. (2) Kaufmann *et al.* 2009³⁰⁰.

^lCoocurrencia con mutación deletérea.

En el gen *MUTYH* hemos localizado 5 VUS, 4 codificantes (p.Ala13Ala, p.Val232Phe, p.Pro320Pro y p.Arg412Arg) y una variante intrónica (c.568-5 A>G) de las cuales las variantes p.Ala13Ala, p.Pro320Ala, y c.568-5 A>G se describen por primera vez en este estudio. No se han encontrado representadas en la cohorte control ninguna de las VUS estudiadas del gen *MUTYH* (tabla 15 y 16), lo que no implica estrictamente la patogenicidad de éstas. Nuestro estudio no ha permitido establecer ningún resultado concluyente acerca de las variantes de significado incierto detectadas, permaneciendo como tales.

En el caso de las variantes p.Ala13Ala y c.568-5 A>G, aunque las predicciones *in silico* no indican ningún efecto deletéreo para estos cambios, su localización en la tercera base del primer triplete del exón 2 y 5ª base del intrón (región de definición exónica) respectivamente le asignarían un posible carácter deletéreo que será comprobado con la realización de estudios de RNA. Además los pacientes portadores (GAL-31 y GAL-62) presentaron poliposis y CCR (67 y 64 años, respectivamente) además de una historia familiar de CCR (tabla 18).

En el caso de la variante p.Pro320Ala los resultados *in silico* indicaron una posible neutralidad del cambio, aunque la ausencia de estudios funcionales que lo avalen no nos permitió establecer ninguna conclusión acerca de su posible categoría patogénica. Sin embargo las variantes p.Val232Phe y p.Arg412Cys sí que mostraron una posible alteración de la función proteica en los estudios *in silico*, aunque sólo en el caso de la variante p.Val232Phe los estudios funcionales *in vitro* apoyan un carácter patógeno del cambio mientras que los estudios *in vivo* resultaron inconclusivos (tabla 15).

RESULTADOS

Tabla 15: Variantes de significado incierto codificantes descritas el gen *MUTYH* *.

Gen	Variante	Exón	Variante	NCa	FrCa	Nco	FrCo	SNP	DP ^a	Predicciones <i>in silico</i> .								<i>in vitro</i> ^(j)	<i>in vivo</i> ^(k)	C.M ^m (gen)
										G.C ^b	GVGD ^c	SIFT ^d	pMut ^e	PolyPhen ^f	Splicing ^g		PESX ^h			
															Gen Splicer	BDGP				
<i>MUTYH</i>	c.39 C>T (p.Ala13Ala)	2	Sinónima	1/62	1,6%	0/250	0%	No	-	NE	-	1	-	-	No	No	NR	No	No	No
	c.694 G>T (p.Val232Phe)	9	Missense	1/62	1,6%	0/250	0%	No	1	≈	3	2	1	1	No	No	NR	FP/D (1) AP/D (1)	CA/IC (1)	No
	c.958 C>G (p.Pro320Ala)	12	Missense	1/62	1,6%	0/250	0%	No	-	-	1	1	1	1	No	No	NR	No	No	No
	c.1234 C>T (p.Arg412Cys)	13	Missense	1/62	1,6%	0/250	0%	No	2	-	2	1	2	2	No	No	1	No	No	No

* La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del *GenBank* U6332 9(*MUTYH*). Las variantes descritas por primera vez en este estudio son las resaltadas en negrita. Nca= Número de casos en los que se ha encontrado la variante. FrCa= Frecuencia de la variante en casos. NCo=Número de controles en los que se ha localizado la variantes. FrCo= Frecuencia de la variante en controles.

^a DP: Dominio proteico. 1= DNA-glicosilasa. 2=*Núdx* hidroxilasa.

^b Grado de conservación aminoacídica: - = residuo poco conservado. ≈ = Residuo moderadamente conservado. += Residuo altamente conservado. NE: No evaluable.

^c Predicción GVGD: 1= Clase 0 o de bajo riesgo. 2= CO> clase < C65 o riesgo moderado. 3= Riesgo alto o clase >C65. NE: No evaluable.

^d Predicción SIFT: 1= No afecta a la proteína. 2= Afecta a la proteína.

^e Predicción pMut: 1= Neutra. 2= Deletérea.

^f Predicciones del PolyPhen: 1= Benigna. 2= Posiblemente deletérea.

^g Predicciones sobre la posible alteración del *splicing*.

^h Predicción PESX: 1= Presunto *enhancer*. 2= Presunto *silencer*. NR = No relevante.

ⁱ Estudios *in vitro*: FP= Función proteica. AP= Abundancia proteica. No= No existen estudios.

^j Referencia bibliográfica: 1= Bai *et al.* 2005¹⁶⁶.

^k Estudios *in vivo*: CA: Estudios de complementación de actividad proteica en bacterias. N=Neutro. D= Deletéreo. IC= Inconclusiva.

^m Coocurrencia con mutación deletérea.

Tabla 16: Variantes de significado incierto intrónicas detectadas en los genes APC y MUTYH*.

Gen	Variante	Localización	Nca	FrCa	Nco	FrCo	SNP	Predicciones <i>in silico</i>		<i>in vitro</i> ^b	C.M ^c
								Gen Splicer	BDGP		
APC	c.423-3 T>G	IVS3	1/48	2%	0/250	0%	No	No	No	No	No
	c.1803+3 A>G	IVS13	1/48	2%	0/250	0%	No	No	No	No	No
MUTYH	c.568-5 A>G	IVS7	1/38	2,6%	0/250	0%	No	No	No	No	No

*La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del GenBank NM_000038.3 (APC) y U63329 (MUTYH). Las variantes remarcadas en negrita son descritas por primera vez en este trabajo. IVS: Región intrónica Nca= Número de casos en los que se ha encontrado la variante. FrCa= Frecuencia de la variante en casos. NCo=Número de controles en los que se ha localizado la variantes. FrCo= Frecuencia de la variante en controles.

^a Predicciones sobre la alteración del *splicing*.

^b Estudios *in vitro*. No: No existen estudios.

^c C.M: Coocurrencia con mutación deletérea.

En la Tabla 17 se muestran las características clínicas de los pacientes portadores de las VUS identificadas en el gen APC. Estos pacientes presentan una historia familiar de cáncer, fenotipo generalmente atenuado (<100 pólipos), edad de diagnóstico de la poliposis alta (mediana de 65 años con un rango de 30 a 66). Los portadores de las VUS c.423-3 T>G (GAL-42) p.Ile1055Met (GAL-47) y p.Ser2621Cys (GAL-28) son los que presentan una menor edad de diagnóstico y un mayor número de pólipos.

Tabla 17: Características clínicas de los pacientes portadores de VUS en el gen APC*.

Gen	Variante	ID	ED	Número de adenomas	CCR (edad)**	Manifestaciones extracolónicas	Historia familiar(edad)**
APC	c.540 A>G (p.Lys150Lys)	GAL-43	65	>10	No	No	Hermano: CCR (62). Hermano: CP (61). Hermana: CCR (65).
	c.1631 T>C (p.Ile544Thr)	GAL-43	65	>10	No	No	Hermano: CCR (62). Hermano: CP (61). Hermana: CCR (65).
	c.1713 A>G (p.Ala571Ala)	GAL-45	47	50	Si	No	Gemela: CCR (45).
	c.1959 G>A (p.Arg653Arg)	GAL-50	66	10-25	ND	No	Padre: CCR(¿)
	c.3165A>G (p.Ile1055Met)	GAL-47	46	31-100	Si	No	Padre con 3 pólipos(¿)
	c.5357 G>C (p.Arg1786Thr)	GAL-35	ND	15	Si	No	Antecedentes familiares de CCR
	c.6873 A>T (p.Gln2291His)	GAL-43	65	>10	No	No	Hermano CCR a 62 años. Hermano: CCR (62). Hermano: CP (61). Hermana: CCR (65).
	c.7862C>G (p.Ser2621Cys)	GAL-28	30	>100	ND	ND	Madre: CCR (39). Hermanos poliposis (29, 40,49). Familiares 2º grado con poliposis o CCR.
	c.423-3 T>G	GAL-42	50	>100	ND	No	Padre: CCR(50s)
c.1803+3 A>G	GAL-29	27	ND	ND	ND	Padre FAP+CCR (?)	

*La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del GenBank NM_000038.3 (APC).

**Se refiere a la edad de diagnóstico de la enfermedad.

ID: Identificación del paciente. ED: Edad de diagnóstico de la poliposis. ND: No determinado. CP: Cáncer de páncreas.

En el caso de las VUS del gen *MUTYH* todas ellas, a excepción de la variante intrónica c.568-5 A>G, han sido localizadas como heterocigotos simples, no pudiéndose establecer el riesgo asociado a estas variantes al funcionar como monoalélicas. La VUS c.568-5 A>G se encuentra en homocigosis en un paciente que tuvo 4 tumores sincrónicos de CCR (64 años), que cumple criterios clínicos de Ámsterdam pero que es MSS y MMR negativo.

Las características fenotípicas de los portadores monoalélicos de VUS en *MUTYH* (tabla 18) presentan una mediana de edad de diagnóstico de la enfermedad fue de 65 años (rango de 55-67 años) y ausencia de manifestaciones extracolónicas (a excepción del paciente GAL-38 que presenta cáncer de mama a los 61 años). Resultó relevante el patrón de transmisión vertical del portador de la variante c.568-5 A>G en homocigosis (GAL-62) y el elevado número de pólipos del paciente GAL-31, portador de la variante p.Ala13Ala.

Tabla 18: Características clínicas de los portadores de VUS en el gen *MUTYH.**

Gen	Variante	ID	ED	Número de adenomas	CCR (edad)**	Manifestaciones extracolónicas	Historia familiar (edad)**
<i>MUTYH</i>	c.39 C>T (p.Ala13Ala)	GAL-31	67	>200	Si(67)	No	ND
	c.727 G>T (p.Val243Phe)	GAL-38	55	15	No	Cáncer de mama (61)	ND
	c.992 C>G (p.Pro331Aala)	GAL-41	65	<100	Si(66)	No	Familiares de primer grado con FAP(¿) +CCR (¿)
	c.1267 C>T (p.Arg423Cys)	GAL-58	65	15	Si	No	ND
	c.568-5 A>G	GAL-62	64	<5	Si (64). Sincrónicos	No	Madre: CCR (66). Hermano: CCR (69). Hermana: CCR(66)

*La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del GenBank U63329 (*MUTYH*).
**Edad de diagnóstico de la enfermedad. ID: Identificación del paciente. ED: Edad de diagnóstico de la poliposis. ND: No disponible.

IV.2 CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO/ SÍNDROME DE LYNCH.

IV.2.1 ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES MMR (*MLH1*, *MSH2* Y *MSH6*) EN PACIENTES CON SOSPECHA DE SÍNDROME DE LYNCH.

En este estudio analizamos 143 familias gallegas con sospecha de Síndrome de Lynch, de las cuales 29 cumplían Criterios de Ámsterdam I/II, 112 cumplían Criterios de Bethesda y 2 pacientes presentaron Síndrome Muir-Torre. La valoración molecular de estos pacientes se realizó siguiendo un algoritmo basado bien en el cumplimiento de los criterios clínicos diagnósticos del Síndrome o en los resultados obtenidos de la realización de análisis MSI, IHC y análisis del codón p.Val600Glu (exón 15) de *BRAF*. Se realizó análisis molecular de los genes *MMR* en todos los pacientes que cumplen Criterios de Ámsterdam, independientemente del

grado de inestabilidad tumoral, y en aquellos pacientes que cumplieron Criterios de Bethesda en los que los tumores fueron inestables (MSI) y el análisis del exón 15 de *BRAF* no indicó una posible hipermetilación del promotor de *MLH1*.

De los 29 pacientes analizados que cumplieron Criterios de Ámsterdam se detectaron mutaciones en alguno de los genes *MMR* en un 41.4% (12/29) de los casos. No se detectaron mutaciones germinales en el 10.3% (3/29) de los pacientes que cumplieron Criterios de Ámsterdam con tumores MSI. Se observó un 48,3% (14/29) de pacientes, que aún siendo Ámsterdam positivos presentaron tumores MSS y/o ausencia de mutaciones en los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*. Este grupo de pacientes se caracterizó por la existencia de un patrón de herencia autosómico dominante, incidencia de CCR y ausencia de otro tipo de tumores.

Con respecto a las familias analizadas que cumplen Criterios de Bethesda (112) se detectó MSI en el 10.7% (12/112) de los pacientes, y de estos se detectaron alteraciones genéticas en el 50% (6/12) de los casos. De las dos familias Muir-Torre analizadas el 50% (1/2) presentaron mutaciones en el gen *MSH2*.

Así el algoritmo establecido para el análisis molecular de pacientes sospechosos de Síndrome de Lynch indicó el análisis de los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* en 43 familias (29+12+2) identificándose un total de 19 mutaciones en los genes *MMR*: 7%(3/43) en el gen *MLH1*, un 37% (16/43) en el gen *MSH2* y un 0% en el gen *MSH6*. Los resultados obtenidos para este análisis se muestran en la tabla 19.

Las mutaciones puntuales localizadas en el gen *MLH1*, 4.6% (2/43), fueron del tipo *frameshift* (50%) y *nonsense* (50%), siendo identificadas en su totalidad en pacientes Ámsterdam positivos. No se detectó ninguna mutación de *splicing* en este gen. Con el fin de determinar si la frecuencia de mutaciones encontradas en *MLH1* en pacientes con Síndrome de Lynch gallegos es diferente de la reportada en otros estudios realizados en población española, hemos realizado una comparación con los datos publicados recientemente en población de Castilla y León³⁰¹ donde, las mutaciones puntuales en *MLH1* representan un 2,7%(6/216). El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas ($p= 0.8683$) en la frecuencia de mutaciones en *MLH1* entre ambas poblaciones al realizar el test χ^2 con corrección de Yates.

La tasa de grandes reordenamientos en el gen *MLH1* fue del 2.3% (1/43). Esta frecuencia de reordenamientos no presenta diferencias estadísticamente significativas con la frecuencia establecida en población española³¹⁵ (0/142, $p= 0,5253$) ni con la observada en otras poblaciones como la población del País Vasco³¹⁶ (2/29, $p= 0.7258$) o la de Castilla y León (0/216, $p= 0.3685$)³⁰¹ Se detectó un único reordenamiento génico en este gen consistente en la delección de los exones 4 al 6 del gen (c.307-?_c.515+?*del*) (figura 30) en una única familia que cumplió Criterios de Bethesda y cuyo probando presentó (GAL-34) tumor inestable y un fenotipo asociado a CCR y a tumores ginecológicos (cáncer de ovario y cáncer de endometrio).

Estos resultados fueron cotejados con un otro ensayo independiente de MLPA y corroborados a nivel de RNA, observándose la delección de los exones 4, 5 y 6 en el cDNA del paciente portador (figura 31).

Tabla 19: Mutaciones identificadas en los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6** pacientes gallegos con sospecha de Síndrome de Lynch y características fenotípicas asociadas.

Gen	ID	Criterios clínicos	Manifestaciones (edad)**	MSI	IHQ		Mutación	Localización	Referencia
					MLH1	MSH2			
<i>MLH1</i>	GAL-34	Bethesda	CCR (49), CU+CO(52)	+	ND	ND	c.307-?_c.515+? <i>del</i>	E4-E6	269
	GAL-39	Ámsterdam I	CCR(26)	ND	ND	ND	c.665 <i>delA</i> (p.Asn222MetfsX7)	E8	302
	GAL-63	Ámsterdam I	CCR(49)	ND	ND	ND	c.1459 C>T (p.Arg487X)	E13	303
<i>MSH2</i>	GAL-33	Ámsterdam II	CE(29)	+	ND	ND	c.(?- 30)_(*220_?) <i>del</i>	Alelo completo	304
	GAL-54	Ámsterdam I	CCR(39)	+	+	-	c.1077-?_ 2805+? <i>del</i>	E7-E16	305
	GAL-66	Ámsterdam II	CCR+CE+CG (69)	+	ND	ND	c.212-?_645+? <i>del</i>	E2-E3	306
	GAL-49	Ámsterdam II	CCR(39)+CE (28)	+	ND	ND	c.363 T>G (p.Tyr121X)	E2	307
	GAL-37	Ámsterdam II	CCR(49)	+	ND	ND	c.687 <i>dupA</i> (p.Ala230SerfsX2)	E4	308
	GAL-65	Ámsterdam II	CE(34)	ND	ND	ND	c.1076+1 G>A	IVS6	309
	GAL-40	Bethesda	ND	+	ND	ND	c.1076+1 G>A	IVS6	309
	GAL-30	Bethesda	CCR (¿)	+	ND	ND	c.1147. C>T (p.Arg383X)	E7	310
	GAL-51	Ámsterdam II	CCR(38), CE+CO (33)	+	+	-	c.1203 <i>dupA</i> (Gln402ThrfsX15)	E7	311
	GAL-56	Ámsterdam II	CCR(56),CE(29)	+	+	-	c.1216 C>T (p.Arg406X)	E7	312
	GAL-57	Bethesda	CCR (33)	+	+	-	c.1225_1226 <i>delAG</i> (p.Gln409ArgfsX7)	E7	313
	GAL-67	Ámsterdam II	CO (35)	ND	ND	ND	c.1225_1226 <i>delAG</i> (p.Gln409ArgfsX7)	E7	313
	GAL-53	Ámsterdam II	CCR(39)	+	+	-	c.1237 C>T(p.Gln413X)	E7	Este estudio.
	GAL-55	Bethesda	CCR(35)+CCR(53)	+	ND	ND	c.1633 C>T (p.Gln545X)	E10	Este estudio.
	GAL-52	Bethesda	CCR(45)	+	+	-	c.1661+1 G>T	IVS10	314
GAL-61	Muir-Torre	CCR+QS (69)	ND	ND	ND	c.2023 A>T(p.Lys675X)	E13	Este estudio.	

*La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del GenBank NM_000249.2 (*MLH1*). NM_000251.1 (*MSH2*). Las nuevas variantes descritas se encuentran en negrita.

** Se refiere a la edad de diagnóstico de la enfermedad.

ID: Identificación del paciente. CU: Cáncer de útero. CO: Cáncer de ovario. CE: Cáncer de endometrio. CG: Cáncer gástrico QS: Quistes sebaceos. ND: No disponible. (-): No expresión de la proteína en la IHQ. (+) Expresión normal de la proteína en la IHQ. E. Exón. IVS: región intrónica.

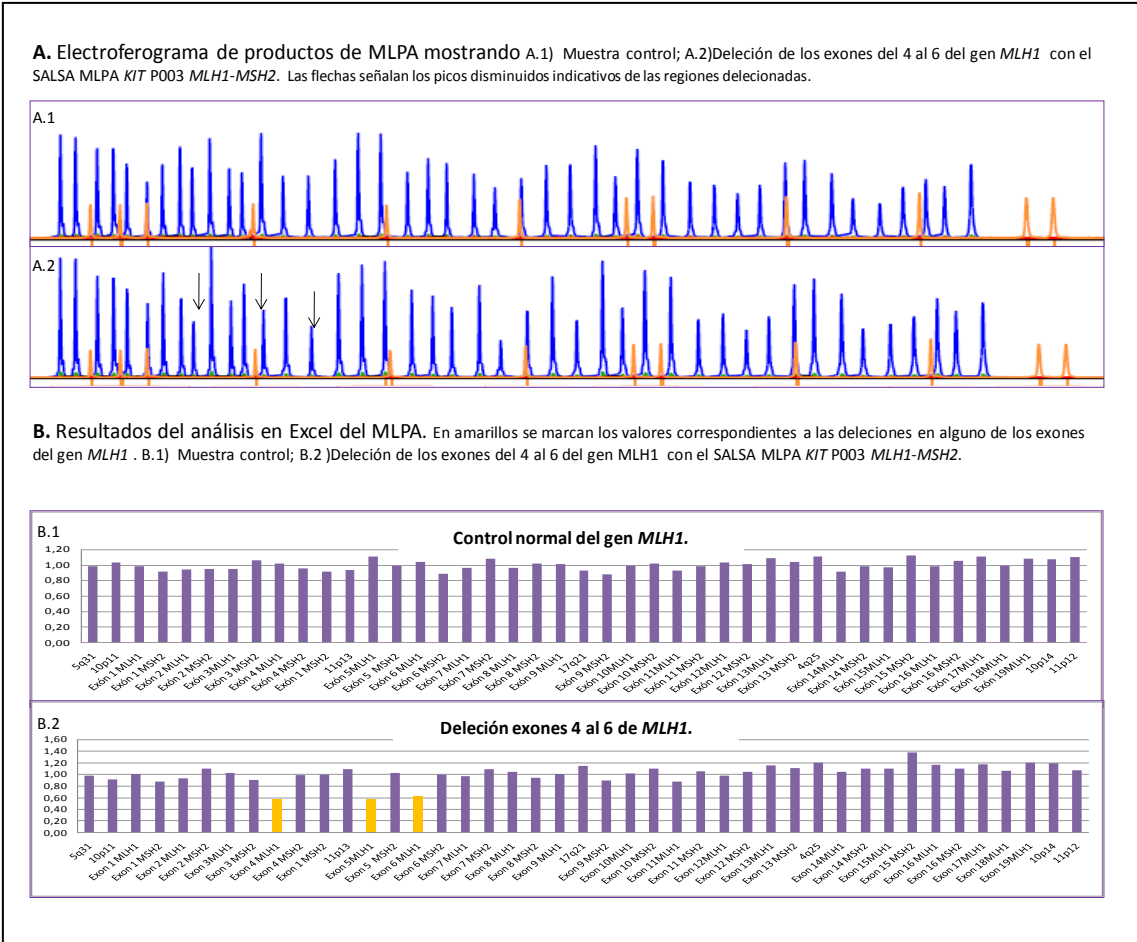


Figura 30: Resultados de grandes reordenamientos del gen *MLH1* mediante la utilización de la técnica MLPA.

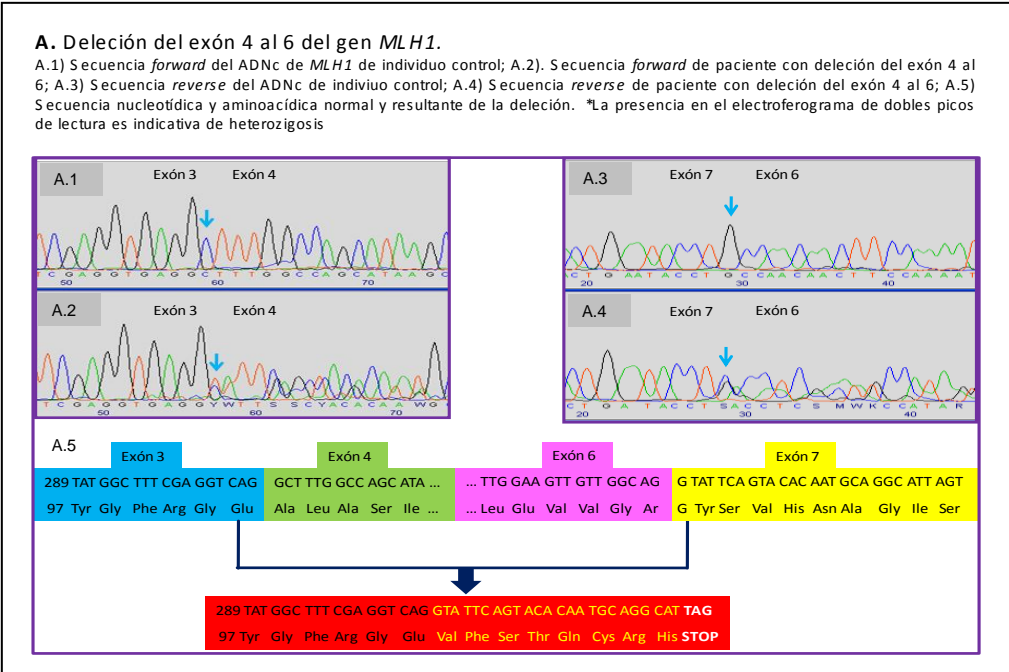


Figura 31: Confirmación de los resultados de grandes reordenamientos en el gen *MLH1*.

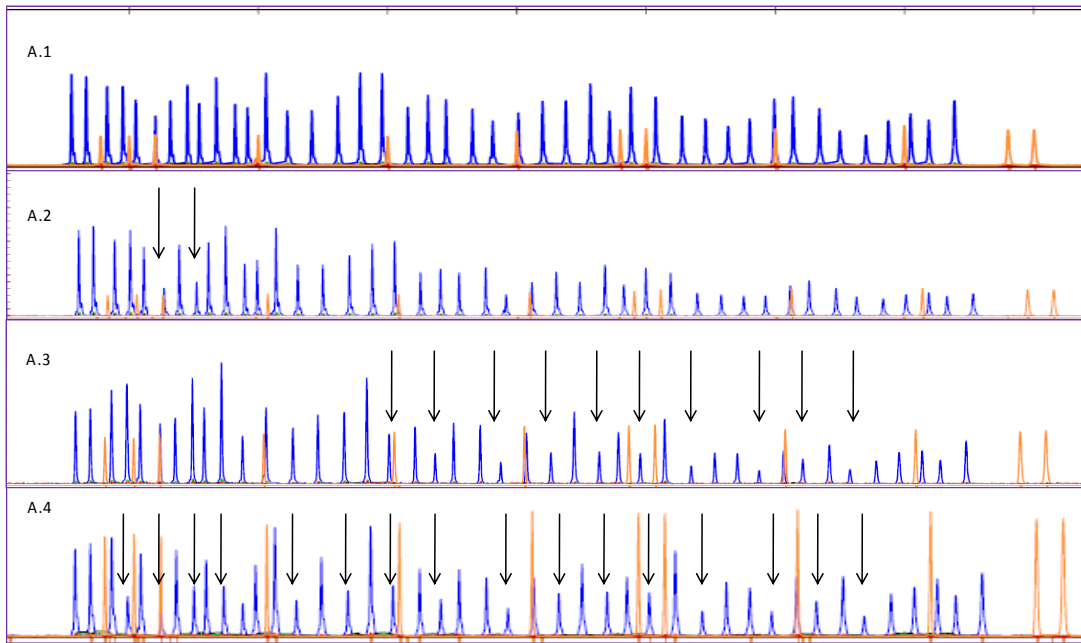
El análisis del gen *MSH2* reveló que es en este gen donde se encuentran la mayoría de los cambios patógenos en población gallega 37,2% (16/43).

Las mutaciones puntuales constituyeron el 30,2% (13/43), con una distribución del 46% (6/13) de mutaciones *nonsense*, 30,8%(4/13) *frameshift* y un 23% (3/13) de *splicing*. La frecuencia de mutaciones que encontramos en *MSH2* fue diferente a la reportada en otros estudios realizados en población de Castilla y León³⁰¹, donde las mutaciones puntuales en *MSH2* representan un 0,92%(2/216). La comparación de la frecuencia de mutaciones puntuales en este gen entre ambas poblaciones mostró diferencias significativas ($p=10^{-4}$).

Hemos descrito por primera vez 3 nuevas mutaciones en el gen: c.1237 C>T (p.Gln413X), c.1633 C>T (p.Gln545X) y c.2023 A>T (p.Lys675X). Las variantes p.Gln413X y p.Gln545X se identificaron en dos pacientes Ámsterdam (GAL-53) y Bethesda (GAL-55) positivos, respectivamente, con MSI y CCR. La mutación p.Lys675X se identificó en un paciente con Síndrome Muir-Torre (GAL-61).

La tasa de grandes reordenamientos en *MSH2* fue del 6.97% (3/43) y viene representada por 3 deleciones (figura 32): deleción de los exones 2 al 3 (c.212-?_645+?*del*), deleción de los exones 7 al 16 (c.1077-?_2805+?*del*) y una deleción total del gen (c.(?-30)_(*220_?)*del*). Si comparamos las frecuencias de reordenamientos en *MSH2* obtenidos en población gallega con los datos publicados por Castellví-Bel *et al.*³¹⁵ en población española, donde la tasa de reordenamientos de *MSH2* es del 1, 4%(2/142), vemos que no existen diferencias significativas en la frecuencia de grandes reordenamientos en este gen ($p= 0.1510$). Esta diferencia tampoco es significativa si comparamos nuestros datos con los de grandes reordenamientos en población del País Vasco (4/29) ($p= 0.5810$)³¹⁶.

A. Electroferograma de productos de MLPA mostrando A.1) Muestra control; A.2) Delección de los exones 2 y 3 del gen *MSH2*. A.3) Delección de los exones 7 al 16 de *MSH2*. A.4) Delección total del gen *MSH2*. Las flechas señalan los picos disminuidos indicativos de las regiones deletionadas.



B. Resultados del análisis en Excel del MLPA. En amarillos se marcan los valores correspondientes a las delecciones en alguno de los exones del gen *MLH1*. B.1) Muestra control; B.2) Delección de los exones 2 al 3. B.3) Delección de los exones 4 al 6. B.4) Delección total del gen.



Figura 32: Resultados de grandes reordenamientos del gen *MSH2* mediante la utilización de la técnica MLPA

La delección total del gen *MSH2* fue confirmada mediante un nuevo ensayo MLPA y con el *kit* utilizado para el estudio de grandes reordenamientos en *MSH6*, lo cual nos proporcionó la información de que esta delección comienza al menos 21Kb antes del inicio del exón 1 del gen *MSH2* (figura 33). La clínica de los portadores de grandes reordenamientos en *MSH2* (GAL-54, GAL-66 y GAL-33) se caracterizó por la aparición de tumores ginecológicos y urinarios, a edades especialmente tempranas en el caso de la delección total del gen (GAL-33) ya que el paciente presentó cáncer de endometrio a los 29 años. Hemos observado una mayor incidencia de tumores ginecológicos (cáncer de ovario y cáncer de endometrio) asociada a portadores de mutaciones en el gen *MSH2* con respecto al gen *MLH1*.

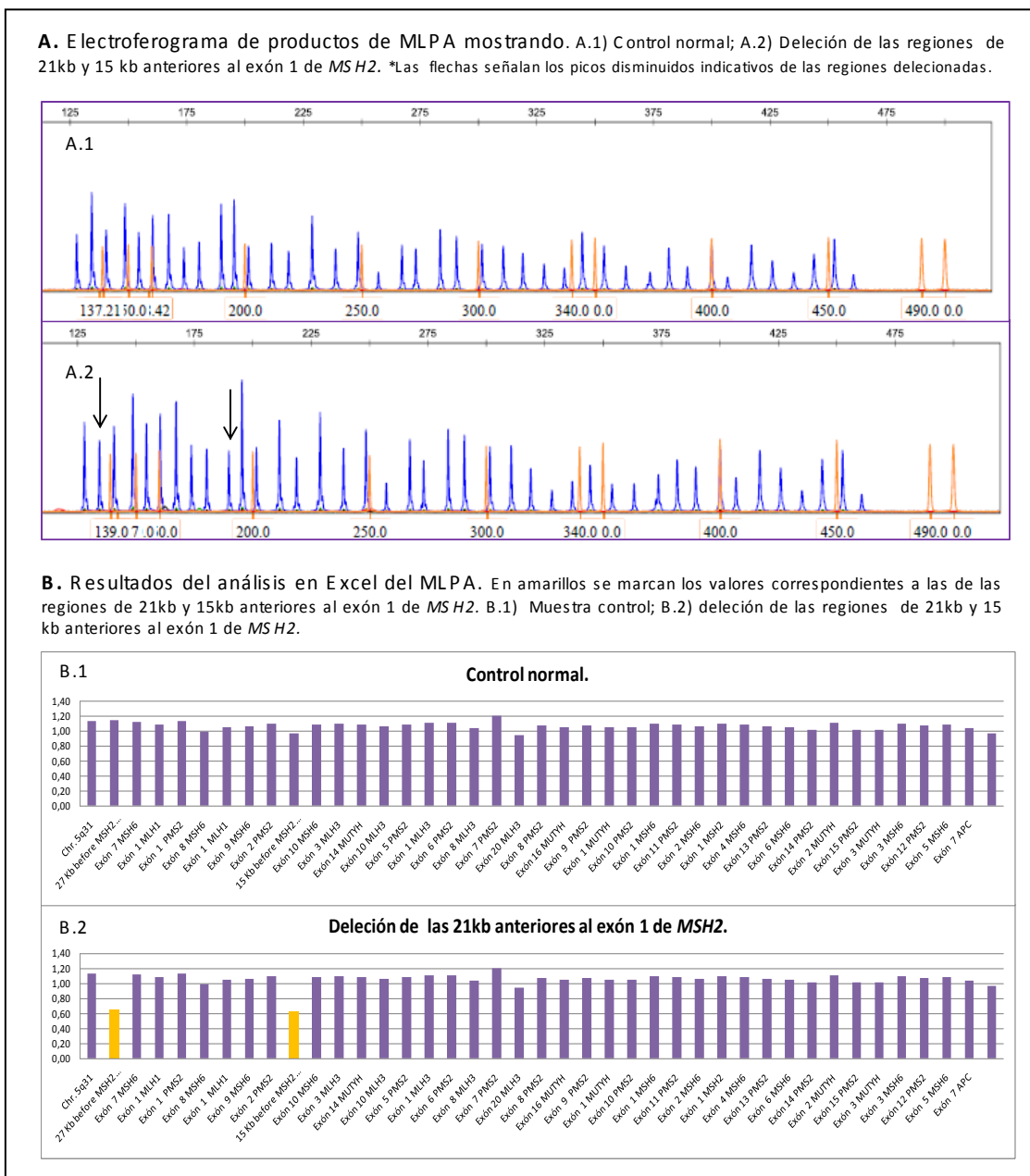


Figura 33: Confirmación de la delección total del gen *MSH2* en GAL-33 mediante la utilización del *SALSA MLPA kit P008 PMS2/MSH6*.

En las familias analizadas no se ha detectado ninguna mutación puntual ni grandes reordenamientos en el gen *MSH6*.

En el análisis de los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* también se han identificado 17 variantes de significado incierto y 40 polimorfismos (ANEXO IX). El estudio de las VUS localizadas en los genes *MMR* se llevará a próximos apartados.

IV.2.2 ESTUDIO DE VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO EN LOS GENES *MLH1*, *MSH2* Y *MSH6*.

El análisis molecular de los genes reparadores (*MLH1*, *MSH2* y *MSH6*) ha identificado 17 VUS: 52,9%(9/17) en *MLH1*, 29,4% (5/17) en *MSH2* y un 17,6% (3/17) en *MSH6*. Estas variantes fueron principalmente del tipo *missense* 41%(7/17). El modelo utilizado para el estudio de estas variantes fue el mismo que el que utilizamos para el estudio de las VUS detectadas en los genes *APC* y *MUTYH*, basado en una aproximación múltiple.

En el gen *MLH1* hemos identificado 9 variantes: 6 exónicas (p.Thr96Thr, p.Gly244Val, p.Val384Asp, p.His718Tyr, p.Arg755Ser y Val716Met) y 3 intrónicas (c.885-34 C>T, c.1039-28 T>A y c.1039-30 T>A) (tabla 20 y 21). Las variantes p.Tyr96Tyr y c.885-34 C>T se describen por primera vez en este estudio. Ninguna de las VUS codificantes ha aparecido representada en nuestra cohorte control, lo que no implica estrictamente el carácter patógeno de las mismas.

Permanecen como VUS las variantes: p.Gly244Val, p.Val384Asp, p.Hys718Tyr y p.Arg755Ser. Las predicciones *in silico* (alteración del *splicing* y posible alteración de la función proteica) de las variantes p.Gly244Val, p.Val384Asp y p.Arg755Ser del gen *MLH1* indican un probable efecto deletéreo de las mismas. Los portadores de estas variantes cumplen Criterios de Bethesda (GAL-46) y Ámsterdam I (GAL-64, GAL-44) con CCR metacrónico a los 34–43 y 49–48 años, respectivamente. Estos resultados se ven avalados por el hecho de que no coocurren con ninguna mutación en otro gen *MMR*. En el caso de la variante p.Val384Asp los estudios funcionales revelan un posible carácter neutro, resultando inconclusivos en el caso de p.Gly244Val y p.Hys718Tyr, aunque el hecho de que esta última coocorra con una mutación deletérea en *MSH2* podría evidenciar cierta neutralidad, aunque habría que comprobar si estas dos mutaciones se encuentran en *cis* o *trans* analizando a los padres del portador. En el caso de la variante p.Arg755Ser, se ha podido realizar un estudio de cosegregación en la familia del paciente GAL-44, donde pudimos observar la cosegregación de la variante con la enfermedad, aunque esto no nos permitió confirmar la patogenicidad de la misma, estando a la espera del estudio de más familiares (figura 34). Los estudios funcionales de esta variante evidenciaron neutralidad (tabla 20).

No hemos podido clasificar las siguientes variantes aunque parecen presentar un papel posiblemente neutro: p.Thr96Thr, p.Val716Met, c.1039-28 T>A y c.1039-30 T>A. La variante p.Thr96Thr cosegregó con una mutación deletérea en el gen *MSH2* y las predicciones *in silico* indicaron neutralidad al no afectar a la estructura ni función proteica ni al proceso de *splicing*.

En este caso, también habría que comprobar si ambas mutaciones se encuentran en *cis* o en *trans* en el portador. La p.Val716Met también pareció desempeñar un papel probablemente neutro, ya que el *estatus* tumoral del paciente portador (GAL-48) revela una MSS, el cambio que afecta a un aminoácido moderadamente conservado, no resulta afectado ninguno de los parámetros analizados con las predicciones *in silico* y, como se puede ver en la tabla 20, los estudios funcionales *in vivo* e *in vitro* también defienden su carácter neutro.

Las variantes intrónicas c.1039-28 T>A y c.1039-30 T>A también son probablemente neutras, ya que ninguna de las predicciones *in silico* indican carácter patógeno para estos cambios. Además todas ellas cosegregan con mutaciones deletereas en el gen *MSH2* (tabla 21) Ocorre lo mismo con las predicciones *in silico* obtenidas para la variante c.885-34 C>T, aunque el hecho de que cosegregue con una mutación deletérea en el mismo gen (GAL-63) le asignaría un papel claramente neutro.

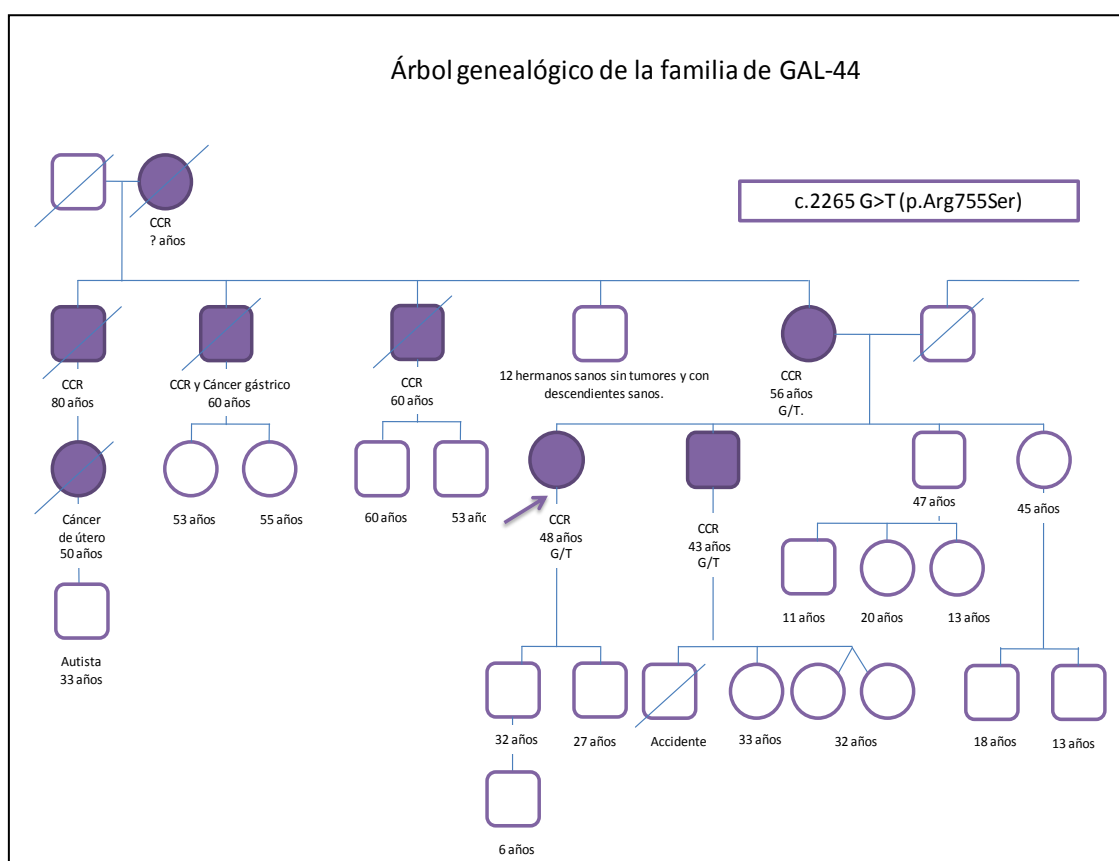


Figura 34: Árbol genealógico de la familia portadora de la variante p.Arg755Ser del gen *MLH1*.

En el gen *MSH2* concentra un 29,4% (5/17) de VUS, donde 3 de las 5 VUS descritas fueron exónicas (p.Pro196Pro, p.Ala328Ala y p.Val549Ile) y 2 intrónicas (c.367-87 A>C y c.1510+39 T>A). Las variantes Pro196Pro, p.Ala328Ala y p.Val549Ile han sido descritas por primera vez en este trabajo. Ninguna de las VUS exónicas estudiadas han sido detectada en población control.

Las variantes Pro196Pro y p.Ala328Ala presentarían un carácter probablemente neutro, ya que ninguna de ellas parece afectar a la función y estructura proteica. A pesar de que aparecen en dos pacientes Ámsterdam positivos (GAL-68 y GAL-64), la no existencia de estudios funcionales en ninguno de los dos casos no nos permitió establecer con rotundidad su categoría patogénica. Resulta relevante el hecho de que la variante p.Ala328Ala (*MSH2*) coocurre con la variantes p.Val384Asp (*MLH1*) en un mismo paciente (GAL-63) con CCR 49 años, que cumple Criterios de Ámsterdam I (tabla 22) en el que no se han detectado mutaciones en ninguno de los genes *MMR* analizados. La variante p.Val549Ile también permanecería como VUS. Aunque este cambio se localiza en un aminoácido altamente conservado, las predicciones *in silico* no le asignaron un papel deletéreo y no existieron papeles funcionales que corroborasen estos resultados. El hecho de que el paciente portador de esta variante (GAL-48) presentase tumor MSS y cáncer gástrico a una edad bastante avanzada (71 años) como se muestra en la tabla 22, nos hace pensar más en un posible efecto neutro del cambio.

Con respecto a las variantes intrónicas de del gen *MSH2*, se podría asignar un papel neutro al cambio c.1510+39 T>A debido a que las predicciones *in silico* así lo indicaron y además la variante apareció en un paciente portador de una mutación deletérea dentro del gen *MLH1* (GAL-63). La variante c.367-87 A>C se corresponde con SNP (rs12216775) validado en población caucasoide pero con una baja heterocigosidad. El hecho de que las predicciones *in silico* indicasen una posible implicación en la ateración del *splicing* y la ausencia de estudios funcionales no nos ha permitido asignar una categoría patogénica clara a esta variante, por lo que permaneció como variante de significado incierto.

En el gen *MSH6* se concentra el menor número de VUS detectadas en este estudio: 1 VUS exónica (p.Ser144Ile) y 2 intrónicas (c.-119 G>A y c.3557-20G>C). La variante p.Ser144Ile sería probablemente deletérea, ya que no ha sido detectada en población control, sus predicciones *in silico* y estudios funcionales le asignaron un posible efecto deletéreo y apareció en un paciente (GAL-59) Bethesda positivo con tumor inestable (MSI-L) que desarrolló CCR a los 44 años (tabla 22). Las predicciones *in silico* de las variantes c.-119 G>A y c.3557-20 G>C no indicaron en ninguno de los casos una posible implicación de estas en la alteración del *splicing*. Esto asignaría un papel posiblemente neutro a la variante c.-119 G>A que sería aún mas evidente en el caso de la variante c.3557-20 G>C, ya que esta ultima co-ocurrió con una mutación deletérea en el gen *MLH2* (GAL-33).

RESULTADOS

Tabla 20: Variantes de significado incierto codificantes identificadas en los genes MMR (MLH1, MSH2 y MSH6)*.

Gen	Variante	Exón	Tipo	NCa	FrCa	Nco	FrCo	MSI	IHQ		SNP	MAF	DP ^a	Predicción <i>in silico</i>										C.M ⁿ (gen)		
									MLH1	MSH2				G.C ^b	GVGD ^c	MAP-MMR ^d	SIFT ^e	pMut ^f	Poly Phen ^g	ESE-finder ^h	PPEX ⁱ	Splicing ^j			<i>in vitro</i> ^k	<i>in vivo</i> ^{m(l)}
MLH1	c.288 C>T (p.Thr96Thr)	3	Sinónimo	1/43	2,3%	0/250	0%	+	ND	ND	No	ND	(1)	ND	-	1	-	1	-	NR	NR	No	No	No	No	Si (MSH2)
	c.731 G>T (p.Gly244Val)	9	Missense	1/43	2,3%	0/250	0%	+	ND	ND	rs63750303	No validado	(2)	+	3	3	1	1	2	(-) SRp40	2	Si	No	AP/N (1)	DN/D (1)	NO
	c.1151 T>A (p.Val384Asp)	12	Missense	1/43	2,3%	0/250	0%	ND	ND	ND	rs63750447	No validado	(2)	+	3	3	2	1	3	(+) RSp55	2	Si	No	No	DN/N (1)	NO
	c.2152 C>T (p.His718Tyr)	19	Missense	1/43	2,3%	0/250	0%	ND	ND	ND	rs2020873	Monomórfico	(2)	+	1	2	2	1	3	NR	NR	No	No	AP/N (1)	DN/IC (1)	Si (MSH2)
	c.2265 G>T (p.Arg755Ser)	19	Missense	1/43	2,3%	0/250	0%	+	ND	ND	No	ND	(2)	+	3	1	2	1	3	(-) SRp40 (-) ASF2/ASF	NR	Si	No	AP/N (1)	DN/N (1)	NO
	c.2146G>A (p.Val716Met)	19	Missense	1/43	2,3%	0/250	0%	-	ND	ND	rs35831931	No validado	(2)	≈	1	1	1	1	1	(-)SC35	1	No	No	VE/N (4)	SP/N (2)	NO
MSH2	c.588 A>G (p.Pro196Pro)	3	Sinónimo	1/43	2,3%	0/250	0%	+	ND	ND	No	ND	(2) (3)	ND	-	1	-	1	-	(-) SRp40	1	No	No	No	No	NO
	c.984 C>T (p.Ala328Ala)	6	Sinónimo	1/43	2,3%	0/250	0%	ND	ND	ND	rs4987189	No validado	(2) (4)	ND	-	1	-	1	-	(-) ASF2/ASF (IgM-BRCA1)	NR	No	No	No	No	NO
	c.1645 G>A (p.Val549Ile)	10	Missense	1/43	2,3%	0/250	0%	-	ND	ND	No	ND	(2) (5) (6)	+	1	1	1	1	1	NR	NR	No	No	No	No	NO
MSH6	c.431 G>T (p.Ser144Ile)	2	Missense	1/43	2,3%	0/250	0%	+	ND	ND	rs3211299	No validado	(7)	+	1	-	2	2	2	(-)SC35 (+)Rp40		No	No	FP/D (3) FP/N(5) FP/D(6)	No	NO

La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del GenBank NM_000249.2 (MLH1), NM_000251.1 (MSH2), NM_000179.1 (MSH6). Las nuevas variantes descritas se encuentran en negrita.

NCa: Número de casos en lo que se ha detectado la variante. FrCa: Frecuencia de la variante en casos. NCo: Número de controles en los que ha aparecido la variante. FrCo: Frecuencia de la variante en controles. NE: no evaluable. MAF: Frecuencia del alelo menor en población Europea-Ceu. ND: No disponible

^a DP: Dominio proteico. (1) Dominio de unión al ATP. (2) Dominio MMR. (3) Dominio MutS II. (4) MutS III. (5) MutS IV. (6) Dominio MutS. (7) Dominio PWWP.

^b Grado de conservación (GC): (-): residuo poco conservado. (=): Residuo moderadamente conservado. (+): Residuo altamente conservado.

^c GVGD: (1) C₀ o bajo riesgo; (2) C₀> clase < C₆₅ o riesgo moderado. (3) >C₆₅ o riesgo alto.

^d MAPP-MMR: (1) Neutra. (2) En los límites de la patogenicidad. (3) Deletérea.

^e Predicción SIFT: (1) No afecta a la proteína. (2) Afecta a la proteína.

^f Predicción pMut: (1) Neutra. (2) En los límites de la patogenicidad. (3) Deletérea.

^g Predicciones del PolyPhen: (1) Benigna. (2) Posiblemente deletérea. (3) Probablemente deletérea.

^h ESE-finder: (+) Génesis de un lugar de unión para proteína SR. (-) Eliminación de un lugar de unión para proteínas SR. NR: No relevante.

ⁱ Predicción PESX: (1) Presunto enhancer. (2) Presunto silencer. NR: No relevante.

^j Predicciones sobre la posible alteración del *splicing*.

^k Estudios *in vitro*: AP: Abundancia proteica. SP: Estudios de *splicing*. FP: Estudios sobre función proteica D: deletérea. N: Neutra. IC: Inconclusiva.

^l Referencias: (1) Takahashi *et al.* 2007³¹⁷. (2) Barneston *et al.* 2008³¹⁸. (3) Tournier *et al.* 2008³¹⁹. (4) Raevaara *et al.* 2005³²⁰. (5) Kariola *et al.* 2002³²¹. (6) Kolodner *et al.* 1999²⁷⁸

^m Estudios *in vivo*: L: levadura. DN: dominante negativo. MG: minigén. VE: Vectores de expresión. D: deletérea. N: Neutra. IC: Inconclusiva.

ⁿ C.M: Cosegregación con mutación deletérea.

Tabla 21: Variantes de significado incierto intrónicas detectadas en los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*.*

Gen	Variante	Localización	NCa	FrCa	MSI	IHQ		SNP	MAF	Predicciones <i>in silico</i>		in vitro ^b	CM ^c (gen)
						MLH1	MSH2			Splicing ^a			
										Gen Splicer	BDGP		
<i>MLH1</i>	c.885-34 C>T	IVS10	1/43	2,3%	+	ND	ND	NO	-	No	No	No	Si(<i>MLH1</i>)
	c.1039-28 T>A	IVS11	2/43	4,6%	ND	ND	ND	rs9862158	No validado	No	No	No	Si(<i>MSH2</i>)
	c.1039-30 T>A	IVS11	1/43	2,3%	ND	ND	ND	rs6771325	No validado	No	No	No	Si(<i>MSH2</i>)
<i>MSH2</i>	c.367-87 A>C	IVS2	1/43	2,3%	+	ND	ND	rs17217765	0,033	No	Si	No	No
	c.1510+39 T>A	IVS9	1/43	2,3%	+	ND	ND	NO	-	No	No	No	Si(<i>MLH1</i>)
<i>MSH6</i>	c.-119 G>A	5'-UTR	1/43	2,3%	ND	ND	ND	NO	-	No	No	No	No
	c.3557-20 G>C	IVS6	1/43	2,3%	+	ND	ND	NO	-	No	No	No	Si(<i>MSH2</i>)

*Las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del GenBank (*MLH1*), NM_000251.1 (*MSH2*), NM_000179.1 (*MSH6*). Las nuevas variantes descritas se encuentran en negrita. IVS: región intrónica. NCa: Número de casos en lo que se ha detectado la variante, FrCa: Frecuencia de la variante en casos, NCo: Número de controles en los que ha aparecido la variante. FrCo: Frecuencia de la variante en controles. NE: no evaluable. MAF: Frecuencia de los alelos menor en población Europea-Ceu. ND: No disponible.

^a Predicción acerca de la posible alteración del *splicing*.

^b Estudios *in vitro*. No: No existen estudios

^c C.M: Cosegregación con mutación deletérea.

Tabla 22: Correlaciones genotipo/fenotipo de las VUS descritas para los genes MMR*.

Gen	Variante	ID	Criterios clínicos	Manifestaciones (edad)**	MSI	IHQ		
						MLH1	MSH2	MSH6
<i>MLH1</i>	c.288 C>T (p.Thr96Thr)	GAL-32	Ámsterdam II	CE(28)	+	ND	ND	ND
	c.731 G>T (p.Gly244Val)	GAL-46	Bethesda	CCR(34)+CCR(43)	+	ND	ND	ND
	c.1151 T>A (p.Val384Asp)	GAL-64	Ámsterdam I	CCR(49)	ND	ND	ND	ND
	c.2152 C>T (p.His718Tyr)	GAL-67	Ámsterdam II	CO(35)	ND	ND	ND	ND
	c.2265 G>T (p.Arg755Ser)	GAL-44	Ámsterdam I	CCR(48)	+	ND	ND	ND
	c.2146G>A (p.Val716Met)	GAL-48	Ámsterdam II	CG(71)	-	ND	ND	ND
	c.885-34 C>T	GAL-63	Ámsterdam II	CCR(49)	+	ND	ND	ND
	c.1039-28 T>A	GAL-46	Bethesda	CCR(34)+CCR(43)	+	ND	ND	ND
	c.1039-28 T>A	GAL-49	Ámsterdam II	CCR(39)+CE(28)	+	ND	ND	ND
	c.1039-28 T>A	GAL-67	Ámsterdam II	CO(35)	ND	ND	ND	ND
c.1039-30 T>A	GAL-67	Ámsterdam II	CO(35)	ND	ND	ND	ND	
<i>MSH2</i>	c.588 A>G (Pro196Pro)	GAL-68	Ámsterdam I	CCR(34)	+	ND	ND	ND
	c.984 C>T (p.Ala328Ala)	GAL-64	Ámsterdam I	CCR(34)	ND	ND	ND	ND
	c.1645 G>A (p.Val549Ile)	GAL-48	Ámsterdam II	CG(71)	-	ND	ND	ND
	c.367-87 A>C	GAL-60	Bethesda	CCR(51)	+	ND	ND	ND
	c.1510+39 T>A	GAL-63	Ámsterdam II	CCR(49)	+	ND	ND	ND
<i>MSH6</i>	c.-119 G>A	GAL-36	Ámsterdam I	CCR(44)	ND	ND	ND	ND
	c.431 G>T; p.Ser144Ile	GAL-59	Bethesda	CCR(44)	+(MSI-L)	+	+	ND
	c.3557-20 G>C	GAL-33	Ámsterdam II	CE(29)	+	ND	ND	ND

*La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del GenBank NM_000249.2 (*MLH1*), NM_000251.1 (*MSH2*), NM_000179.1 (*MSH6*). Se señalan en negrita aquellas variantes que coocurren con mutaciones deletéreas en alguno de los otros genes *MMR* analizados.

** Se refiere a la edad de diagnóstico de la enfermedad

ID: Identificación del paciente. CE: Cáncer de endometrio. ND: No determinado. CO: Cáncer de ovario. CG: Cáncer Gástrico.

IV.2.3 ANÁLISIS DEL GEN *MUTYH* EN PACIENTES CON CCR ESTABLES Y MENORES DE 50 AÑOS, Y EN FAMILIAS ÁMSTERDAM POSITIVAS SIN ALTERACIÓN DE LA VÍA MUTADORA.

Se ha procedido al análisis de los dos *hotspots* del gen *MUTYH* (p.Tyr165Cys y p.Gly382Asp) en pacientes que presentan CCR estables menores de 50 años y de pacientes que cumplen Criterios de Ámsterdam pero que no presentan alterada la vía mutadora (tumores MSS). Se ha detectado un único portador monoalélico para la mutación p.Gly382Asp del gen *MUTYH*. Este paciente (GAL-69) se caracterizó por cumplir Criterios de Bethesda, MSS y presentar CCR a los 44 años. Sin embargo, el análisis integro del gen, y el posterior análisis del gen *MSH6*, no identificó ninguna otra variante de relevancia funcional.

En el caso del paciente GAL-62 (Ámsterdam I, MSS y CCR a los 44 años) se ha realizado el análisis de todo el gen debido a que presenta una poliposis atenuada (5-10 pólipos), localizándose una VUS (c.568-5 A>G) en homocigosis cuyos análisis revelan una muy probable patogenicidad, como se explicó en el apartado de análisis de VUS en los genes *APC* y *MUTYH*.

V. DISCUSIÓN

V.1 SÍNDROMES POLIPÓSICOS: GENES *APC* Y *MUTYH*.

La Poliposis Adenomatosa Familiar es un síndrome hereditario que predispone al desarrollo de CCR. Se caracteriza por una herencia autosómica dominante asociada a mutaciones en el gen *APC*. Las familias portadores de estas mutaciones tienen un 100% de posibilidades de desarrollar CCR a lo largo de su vida¹¹⁶. Recientemente también se ha vinculado al gen *MUTYH* en el desarrollo de esta enfermedad⁵². Las mutaciones bialélicas en el gen *MUTYH* son responsables de un fenotipo clínico atenuado y herencia autosómica recesiva³²².

En el presente estudio se identificaron mutaciones en el gen *APC* en un 39,9% de los pacientes con Poliposis Adenomatosa Familiar. Se describieron 19 mutaciones causales (todas ellas responsables de la aparición de un codón de parada prematuro (X) que originaría una proteína *APC* truncada) y 10 variantes de significado incierto. A pesar del gran número de mutaciones descritas en *APC* hemos identificado 4 nuevas mutaciones (p.Lys49AsnfsX20, p.Glu468X, p.Val967AlafsX13 y p.Ser1407XfsX1)²⁹⁶.

Las mutaciones mayoritariamente identificadas fueron del tipo *nonsense* (42%) y *frameshift* (36,8%), tal y como muestran otros estudios^{128,134}. Al igual que ocurre en otras poblaciones, las mutaciones en el gen *APC* se localizaron principalmente en el exón 15. Las mutaciones p.Glu1309AspfsX4, p.Glu1345X y p.Ser1407XfsX1 se identificaron dentro de la región MCR (codones 1284-1580), típicamente caracterizada por albergar un amplio número de mutaciones somáticas³²³.

Otro fenómeno importante de inactivación del gen *APC* es la existencia de grandes reordenamientos génicos, que principalmente se producen como consecuencia de la combinación del fenómeno de recombinación homóloga mediada por la topoisomerasa y la existencia de elementos repetitivos dentro del gen¹²⁷. La frecuencia de este fenómeno en *APC* en pacientes con FAP sin mutaciones puntuales en el gen oscila entre 8% al 12%^{129,130,32}, aunque está sujeta a una gran variabilidad^{305,325}. El estudio de este proceso de inactivación génica en población gallega mediante MLPA mostró valores no muy diferentes a los descritos para otras poblaciones, con un porcentaje del 8,3%. Estos reordenamientos permiten explicar un 12% de familias con poliposis colónica sin mutaciones puntuales detectables con técnicas convencionales. Este porcentaje se debió a la detección de una delección del exón 4 (c.423-?_531+?el)¹⁴⁹, una delección de los exones 1 al 15 (c. 1-?_8532+?del)³²⁴ y dos delecciones del gen completo (c. (?_-30) _ (*220_?)del)¹⁰³. Las características del MLPA presentan esta técnica como una herramienta muy útil en investigación y diagnóstico. Generalmente las delecciones de exones contiguos identificadas por MLPA se consideran una fuerte evidencia de la presencia de reordenamientos génicos, ya que la probabilidad de falsos positivos en estos casos es casi despreciable³²⁶. Sin embargo, en el caso de las delecciones de un único exón, éstas pueden ser debidas a hibridaciones incompletas de la sonda producidas por la presencia de cambios en

una única base en el DNA molde. Este *mismatch* de la sonda impediría la ligación total de ésta y subsecuentemente la posterior amplificación, resultando en un falso positivo de delección³²⁷. La corroboración de nuestros resultados con técnicas alternativas como FISH y cDNA, nos ha permitido establecer el uso del MLPA como técnica fiable y complementaria a la secuenciación directa en el análisis de mutaciones germinales, ya que su utilización incrementa un 23% la tasa de detección de alteraciones en *APC*.

Las correlaciones existentes entre la localización del evento mutacional y las manifestaciones clínicas están claramente establecidas para el gen *APC*, tanto para el fenotipo polipósico^{128,143,148,328} como para las manifestaciones extracolónicas^{135,151,152,155}. Los portadores de delecciones completas del gen desarrollan un fenotipo de poliposis severa con una edad temprana de manifestación de la enfermedad¹²⁹. Este fenotipo también lo pudimos comprobar en los portadores de las delecciones totales del gen *APC* de nuestro estudio. La correlación entre el lugar de mutación y el fenotipo clínico también se observó en 3 de las 4 nuevas mutaciones descritas. En el fenotipo de estos pacientes se observa una mayor severidad de las mutaciones localizadas al inicio y mitad del exón 15, con respecto a las localizadas en los extremos 3' y 5' del gen, tal y como indicó Nieuwnhuis *et al*¹⁴¹. La mutación c.1402 G>T (p.Glu468X) detectada en el exón 10 del gen *APC* aparece asociada a un fenotipo AFAP (en base a su número de pólipos, 20-50), aunque esta mutación se localiza en una región asociada a fenotipo FAP. Se han observado diferencias fenotípicas acerca del número de adenomas y manifestaciones extracolónicas en pacientes portadores de la misma mutación. Esta diversidad fenotípica es característica de la FAP^{329,330} y aparece también representada en los portadores de la delección completa del gen de nuestro estudio.

Existen importantes evidencias que soportan la teoría de la modulación fenotípica mediada por genes modificadores, tanto en humanos como en ratones. Se ha observado que hermanos del mismo sexo durante sus primeras dos décadas de vida muestran diferencias fenotípicas que no pueden ser fácilmente explicadas a menos que se recurra a la existencia de los genes modificadores³³¹. Consideramos necesaria para la confirmación de este tipo de resultados el conocimiento de la historia familiar del paciente y la realización de un seguimiento exhaustivo del mismo.

El diagnóstico clínico de la FAP se ha venido basando en la identificación de más de 100 adenomas colorrectales en la segunda o tercera década de vida. Para la AFAP el número de adenomas se reduce a menos de 100, existiendo una menor incidencia de manifestaciones extracolónicas (exceptuando los adenomas gástricos y duodenales) y un retraso de 10 a 20 años en la edad de manifestación de la enfermedad con respecto a la de la poliposis⁹⁷. La gran heterogeneidad fenotípica en pacientes con FAP y AFAP ha dificultado la diferenciación entre estas dos entidades clínicas, generando una ausencia de consenso acerca de los criterios diagnósticos a utilizar. Esto ha llevado a que algunos autores hayan propuesto para esta clasificación la utilización de otros criterios clínicos como edad de desarrollo de CCR³³². La ausencia de datos clínicos en algunos pacientes de nuestro estudio, asociado a esta falta de consenso en la diferenciación de estas dos enfermedades no nos ha permitido establecer el porcentaje de mutaciones en el gen *APC* que le correspondería a cada una de estas dos entidades clínicas. En general en la literatura se estima que este porcentaje de mutaciones en

APC es de un 70% de los pacientes con FAP clásica y un 10% de los pacientes con AFAP presentan mutaciones germinales en el gen APC^{126,129,133,324}.

Para el gen APC se han descrito en población caucasoide dos puntos calientes mutacionales en los codones 1061 y 1309, con unas frecuencias del 8% y 20% respectivamente¹¹⁹. En población gallega la frecuencia de estos dos codones representó el 5,26% de las familias APC-positivas. La mutación 1309 se identificó en un único paciente del total de familias APC-positivas analizadas (5,26%). Resulta interesante el hecho de que no se haya detectado ningún paciente con alteraciones en el codón 1061 de APC en nuestra población. Resultados similares ya habían sido descritos con anterioridad en otro estudio realizado en población gallega en el que no se detectó ninguno de los dos *hotspots*. Sin embargo, en este estudio no se pudo establecer si la no detección de estas mutaciones se debía a una baja frecuencia de éstas o a un error de muestreo debido al bajo número de familias positivas identificadas²⁹⁰. Con el fin de corroborar si estas diferencias en la frecuencia son un fenómeno característico de nuestra población hemos realizado una comparación con los datos obtenidos en familias catalanas, donde estos codones representaron un 14,7% del total de familias APC-positivas analizadas (9% para 1061 y 6% para 1309)²⁹⁶. Los resultados obtenidos tras el análisis estadístico X² con corrección de Fisher, ha mostrado diferencias significativas para la delección de 5pb del codón 1061(p=0,058) pero no para la del 1309 (p=0,356). Si incluimos en el análisis los datos publicados por Ruiz-Ponte *et al.*²⁹⁰, las diferencias con población catalana siguen sin ser significativas (p=0,265), aunque sí se observa una tendencia a la baja de la frecuencia de esta variante 1309 en población gallega.

Existen multitud de estudios que revelan que el espectro mutacional del gen APC varía entre las diferentes poblaciones. Los codones 1061 y 1309 han sido descritos para todas ellas, siendo la mutación 1309 la más común⁸⁸. A pesar de ello, la delección de 5pb del codón 1309 presenta una variación de frecuencias entre los distintos países que van desde un 14% en Japón, 6-5% en Europa y hasta un 0% en Australia¹³¹. Recientemente se han descrito frecuencias, inferiores a las establecidas, del 3% para el codón 1061 en población Checa³³². La variación en la distribución de estos *hotspots* podría deberse a errores debidos al tamaño muestral de los estudios publicados, aunque en poblaciones aisladas estas variaciones de frecuencia pueden explicarse por fenómenos del tipo efecto fundador. De hecho en las islas Baleares se ha descrito un aumento de frecuencia del codón 1061 del 50% asociada a este tipo de fenómeno poblacional, que se vio ratificada mediante análisis haplotípico de las familias que compartían esta delección³³³.

La recurrencia de estas dos mutaciones está asociada a las características moleculares de la región que rodea a estos codones, ya que se localizan en regiones hipermutables constituidas por trectos de poliA que aumentan el riesgo de *slippage* de la DNA polimerasa durante la replicación generando un aumento en la frecuencia de este tipo *de* 5pb. La alta incidencia de la mutación 1309 *de novo* y el hecho de que estas alteraciones genéticas cosegregan con diferentes haplotipos asociados con la FAP soportan esta hipótesis¹³¹. Existen estudios que indican que la diversidad genética de la población gallega es en general menor que la de otras poblaciones europeas, como resultado de su aislamiento geográfico del resto de la Península Ibérica y de la alta tasa de emigración sufrida durante los últimos 2 siglos^{334,335}.

Estas características genéticas podrían haber ocasionado la selección de variantes en los genes reparadores del DNA que eliminarían más eficazmente los errores causados por el *slippage* de la DNA polimerasa. Esto tendría como consecuencia una reducción de la frecuencia de los dos *hotspots* hasta los valores observados. Fenómenos de efecto fundador han sido ya descritos en población gallega para otras enfermedades genéticas, como es el caso del gen *BRCA1* en el cáncer de mama familiar³³⁶.

En el presente trabajo también hemos estudiado la contribución de las mutaciones bialélicas en línea germinal en el gen *MUTYH* en pacientes *APC*-negativos gallegos. Las mutaciones en el gen *MUTYH* explicaron el 21% de los casos de poliposis colónica analizados. Estos datos son ligeramente inferiores a los descritos recientemente en población española donde el análisis de población gallega y catalana proporcionó una frecuencia de mutaciones en *MUTYH* del 24%²⁹⁶. El análisis independiente de estas dos poblaciones deja ver la mayor incidencia de mutaciones en este gen en pacientes catalanes con respecto a los gallegos (28% vs 21%). Este fenómeno de variabilidad en la frecuencia de mutaciones en el gen *MUTYH* en pacientes *APC*-negativos ya ha sido observado en otras poblaciones europeas^{19,98,161,165,169,185,337}.

El espectro mutacional del gen *MUTYH* en las familias analizadas se encuentra representado por los dos *hotspots* típicos de población europea (p.Tyr165Cys y p.Gly382Asp) además de las mutaciones c.1131 C>T (p.Gln377X)¹⁶⁹ y c.1186_1187insGG (p.Glu396GlyfsX43)¹⁶⁴, todas ellas localizadas en el dominio *NUDIX*-hidrosilasa de la proteína *MUTYH*. Existen estudios funcionales que revelan la alta patogenicidad de la mutación p.Gln377X, debido a que su presencia genera una proteína con un peso molecular menor (68KDa) y una reducción severa de la actividad glicosilasa y de unión a DNA¹⁸⁹. Resulta interesante la identificación de la mutación c.1186_1187insGG (frecuencia alélica del 12,5%) en un paciente de 62 años con CCR y sin historia familiar. Esta alteración genética fue descrita por primera vez en población portuguesa con una frecuencia alélica del 19%¹⁶⁴ y también recientemente en una frecuencia ligeramente superior (33%) en población catalana²⁹⁶.

Las dos mutaciones mayoritariamente representadas en nuestra cohorte fueron las mutaciones p.Tyr165Cys y p.Gly382Asp, cuya frecuencia alélica en pacientes con MAP fue del 81%, lo que se corresponde con los datos existentes en la literatura^{183,322}. La frecuencia observada para cada uno de los dos alelos fue similar (37,5% vs 43,7%). La literatura describe una tendencia al alza de la frecuencia del alelo p.Gly382Asp²⁰. Nuestros resultados parecen seguir también esta tendencia, aunque no ha podido ser confirmada debido al bajo número de familias positivas identificadas.

Es característico del espectro mutacional de *MUTYH* la existencia de mutaciones étnicas que definan a las poblaciones como la pakistani (p.Y90X)³³⁷ la india (p.Glu66X, explica el 100% de las mutaciones en *MUTYH* en hindúes)³³⁷, la italiana (c.1395delGGA)¹⁶², la portuguesa y catalana (c.1186insGG)^{164,296} y la japonesa (p.Arg231Cys)³³⁸. En nuestro caso no hemos localizado ninguna mutación que se encuentre en una frecuencia relevante en nuestra población como para explicar la mayor parte de los casos de MAP analizados.

La MAP se caracteriza en general por una edad de diagnóstico mayor que la de la FAP, una menor gravedad^{19,168} y por la ausencia de manifestaciones extracolónicas, aunque se han descrito casos con manifestaciones del tipo cáncer de esófago, cáncer gástrico, poliposis de las glándulas fúndicas, poliposis duodenal, carcinoma duodenal o cáncer de mama^{169,170}. Los portadores bialélicos de mutaciones en *MUTYH* mostraron un fenotipo de poliposis atenuada sin manifestaciones extracolónicas. La mediana de edad de diagnóstico de CCR en estos pacientes fue de 51 años (con un rango de 43 a 62 años). Por el contrario, los pacientes con FAP desarrollan CCR unos 10 años antes (mediana de 42 años y con un rango de 20 a 64 años). Los síntomas de la MAP parecen no ser tan graves como los de la poliposis asociada a *APC*, sino más similares a los de la AFAP¹⁹. Así hemos descrito dos pacientes que presentaron un fenotipo clínico ambiguo, evidenciando la heterogeneidad fenotípica característica de este síndrome, con un número de pólipos, edad de diagnóstico de la enfermedad típica de una poliposis atenuada pero desarrollan cáncer a los 40s, lo que es más característico de la FAP.

Como era de esperar, la mayoría de los portadores bialélicos de mutaciones en *MUTYH* presentaron un modelo de herencia autosómico recesivo, o en algunos casos aparentemente esporádicos. Hemos identificado un caso con aparente transmisión vertical de CCR. Este modelo de transmisión es atípico de la MAP, aunque ya había sido descrito con anterioridad en otros estudios³³⁹. No descartamos la posibilidad de que este patrón de herencia dominante sea ficticio y se deba a la existencia de fenocopias en el seno de la familia.

Los múltiples estudios realizados sobre el gen *MUTYH* en pacientes con Poliposis Adenomatosa Familiar parecen dejar claro el grado de asociación existente entre las mutaciones bialélicas en *MUTYH* y el riesgo de desarrollar CCR^{17,172,193-195}, aunque menos clara y más controvertida es la posible contribución de los heterocigotos simples en *MUTYH* a este riesgo. Por un lado se han realizado estudios^{197, 198}, reforzados con metaanálisis, que hablan de un posible incremento del riesgo de desarrollar CCR en portadores monoalélicos, aunque éste sería bajo (8% de riesgo acumulativo a los 70 años)^{193,195,196}. Este riesgo roza valores estadísticamente significativos para los portadores monoalélicos de p.Tyr165Cys¹⁷². La descripción de la interacción funcional de las proteínas *MUTYH* y *MSH6*¹⁸¹ ha permitido el planteamiento de la hipótesis de que los portadores monoalélicos de mutaciones germinales en *MUTYH* pueden modular el fenotipo clínico de los pacientes HNPCC, en particular en aquellos pacientes portadores de mutaciones *missense* en *MSH6*. En un estudio realizado en población española se ha encontrado una mayor frecuencia de mutaciones, principalmente del tipo *missense*, en el gen *MSH6* en pacientes con CCR heterocigotos simples para mutaciones en *MUTYH* con respecto a los pacientes no portadores (11.5% vs 0%, p=0.037)³⁴⁰. Estos resultados avalarían la hipótesis del efecto combinado *MSH6/MUTYH* en el aumento de riesgo de CCR, además de corroborar el papel del gen *MUTYH* como gen de baja penetrancia para el CCR¹⁷. Pero también se han realizado estudios que proponen que el riesgo asociado a portadores monoalélicos no es estadísticamente significativo en relación con el de la población normal^{172,185,194,199}, por lo que no implicaría ningún aumento de riesgo a la hora de desarrollar CCR. En nuestro estudio se han detectado mutaciones monoalélicas en un 5,26% (2/38) de los pacientes MAP, que no han sido incluidos dentro del cómputo de pacientes positivos para mutaciones en el gen *MUTYH*. Las mutaciones monoalélicas encontradas han sido la

p.Tyr165Cys y p.Gly382Asp, todas ellas consideradas de relevancia funcional^{166,188}. La frecuencia de mutaciones monoalélicas en pacientes con poliposis detectada en nuestro estudio es bastante superior a la establecida en estudios anteriores en población española (1,7%)¹⁷² y a las de otros estudios realizados en otras poblaciones 0,3%-2,7%^{170,193,199,341}. La no existencia de un consenso en el aumento de riesgo de los portadores monoalélicos hace necesaria la realización de un mayor número de estudios que permitan establecer este riesgo.

Las técnicas de *screening* de los genes responsables de la susceptibilidad a CCR en pacientes con poliposis adenomatosa familiar han permitido una gran mejora en las técnicas de cribado y con ello una mejora en la prevención de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este estudio hacen patente las ventajas que supone, a la hora de realizar el diagnóstico genético de una enfermedad en una determinada población, el conocimiento del espectro mutacional del gen de susceptibilidad implicado en el desarrollo de dicha enfermedad. La tasa de mutaciones en el gen *APC* en pacientes gallegos con poliposis colónica familiar (39,6%) hace que sea el principal gen a analizar en pacientes con más de 100 pólipos. El incremento de un 23% en la sensibilidad en la detección de mutaciones en el gen *APC* que supone el análisis de grandes reordenamientos hacen necesario su estudio como técnica complementaria a la secuenciación directa. La baja frecuencia de los dos *hotspots* del gen *APC* (1061 y 1309) tiene implicaciones directas sobre las técnicas de cribado de pacientes sospechosos de ser portadores de mutaciones en el gen *APC*, ya que dejan de ser las mutaciones más frecuentemente representadas. Los pacientes sin mutaciones detectables en el gen *APC* son explicados en un 21% por mutaciones bialélicas en el gen *MUTYH* por lo que se recomienda el análisis de *MUTYH* en todas las familias *APC*-negativas, incluso aunque no presenten un patrón de herencia recesivo.

V.2 CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO /SÍNDROME DE LYNCH: GENES MMR.

La mayoría (95%) de las mutaciones asociadas al HNPCC se concentran en 4 de los 9 genes *MMR* descritos hasta el momento: *MLH1* y *MSH2* (90%)²⁶⁰, y en menor medida en *MSH6* (7-10%)^{262,263}, y *PMS2* (<5%), siendo el riesgo atribuible a mutaciones en el resto de los genes casi despreciable²⁶⁴. A diferencia de lo que ocurre en otros genes como *APC*, los genes reparadores no presentan *hotspots* definidos hasta el momento.

El análisis molecular de los genes *MMR* (*MLH1*, *MSH2* y *MSH6*) que llevamos a cabo en familias gallegas ha tenido como resultado la identificación de un total de 19 mutaciones y 17 VUS. Ninguna de las mutaciones detectadas en nuestro estudio se presentó en una frecuencia que le asigne el papel de mutación fundadora en nuestra población.

Las mutaciones puntuales en los genes reparadores explican un 35% de los pacientes analizados con sospecha de Síndrome de Lynch. Las alteraciones genéticas mayoritarias fueron del tipo *nonsense* (46%) y *frameshift* (33,3%) y se adscriben a familias MSI positivas que

cumplen criterios clínicos de Ámsterdam o Bethesda con MSI, a excepción de un paciente Muir-Torre. La frecuencia de mutaciones *nonsense* sitúa a este tipo de mutación como la mayoritaria en genes *MMR*, al contrario que en otros estudios donde la mutación mayoritariamente representada es del tipo *frameshift*². La aparición de mutaciones *frameshift* tiene como resultado la disrupción de la pauta de lectura y con ello la génesis de un transcrito generalmente inestable que es degradado por la maquinaria celular mediante el sistema conocido como “*nonsense-mediated RNA decay*”²⁶⁵. Hemos detectado una baja incidencia de mutaciones de *splicing* en los genes *MMR* (7%). Estas mutaciones, c.1076+1 G>A y c.1661+1 G>T, se localizaron en regiones altamente conservadas implicadas en la regulación del *splicing*. La mutación c.1076+1 G>A es responsable del *skipping* del exón 6 del gen y fue detectada en dos familias (4,6%), aunque no han sido consideradas como recurrentes dentro de nuestra población. El fenotipo de los pacientes portadores de c.1076+1 G>A revela la heterogenicidad fenotípica también típica del HNPCC y la posible actuación de genes modificadores y ambiente como moduladores del fenotipo clínico en estos pacientes. Lo mismo ocurre con la mutación c.1225-1226delAG, también detectada en dos familias clínicamente diferentes.

La distribución de mutaciones asigna al gen *MSH2* un papel principal como gen de susceptibilidad al Síndrome de Lynch en población gallega, apareciendo mutado en el 37,2% de los pacientes analizados. La responsable de esta elevada frecuencia de mutaciones en el gen *MSH2* son las mutaciones puntuales (30,2%). La comparación de nuestros resultados con estudios recientes en familias de Castilla y León (0,92%)³⁰¹ revelan una diferencia estadísticamente significativa ($p=10^{-4}$) entre la frecuencia de ambas poblaciones para las mutaciones puntuales en el gen *MSH2*. Esta distribución de frecuencias hace especial a nuestra población y exige el establecimiento de un protocolo de análisis molecular ajustado a la incidencia de mutaciones puntuales en el gen *MSH2* en población gallega, siendo el primer gen a analizar en aquellos pacientes con tumores MSI de los que no se disponga de datos de IHQ. Estos valores de frecuencia no se corresponden con la observada en otros trabajos realizados en familias con Síndrome de Lynch, donde el gen *MLH1* es el más frecuentemente mutado. En nuestro estudio *MLH1* pasa a ser el segundo gen en importancia en la susceptibilidad al CCR en pacientes con Síndrome de Lynch albergando un 7% de las familias analizadas.

Asociadas al gen *MSH2* hemos descrito por primera vez 3 mutaciones nuevas (c.1237 C>T, p.Gln413X; c.1633 C>T, p.Gln545X y c.2023 A>T, p.Lys675X), todas ellas del tipo *nonsense* y que por tanto generan un codón de parada prematuro en la proteína. La mutación p.Lys675X se asoció a un fenotipo Muir-Torre, variante del Síndrome de Lynch que típicamente se vincula a mutaciones en este gen^{244,245,342,343}. Nuestros datos también nos han permitido observar la mayor incidencia de cánceres extracolónicos y ginecológicos que típicamente se vincula a las mutaciones en *MSH2*³⁴⁴.

Los grandes reordenamientos son considerados una parte importante del espectro mutacional asociado al Síndrome de Lynch. Estudios recientes apuntan a una posible evidencia de que estos fenómenos de reordenamiento génico se deban a una recombinación homóloga mediada por secuencias *Alu* (recombinaciones *Alu-Alu*)^{270,271,345}, aunque también se habla de una posible implicación de fenómenos de recombinación no homóloga mediada por la *topoisomerasa I*¹²⁷. En general la frecuencia de grandes reordenamientos en los genes *MMR* en

pacientes con Síndrome de Lynch oscila, dependiendo de las poblaciones, entre valores del 5%-20%^{267,268,346}. Esta variabilidad en la incidencia de grandes reordenamientos en la bibliografía viene determinada por la metodología empleada y la heterogeneidad en los criterios de selección de los individuos²⁶⁹. En las familias de nuestro estudio se detectó una tasa de grandes reordenamientos del 9,3% en los genes *MMR*, valores que se no se desvían de los establecidos en la bibliografía, observándose una mayor frecuencia de reordenamientos en el gen en *MSH2* con respecto al gen *MLH1* (7% vs 2,3%). Esta tendencia al alza de los reordenamientos en el gen *MSH2* ya fue descrita por muchos autores²⁷⁰ y parece deberse a la mayor densidad de secuencias *Alu* en este gen²⁶⁸. Los grandes reordenamientos detectados en nuestra población fueron: la delección de los exones 4 al 6 del gen *MLH1* (c.307-?_c.515+?del) y la detección de delección de los exones 2 al 3 (c.212-?_645+?del), 7 al 16 (c.1077-?_2805+?del) y la delección total del gen *MSH2* (c. 1-?_8532+?del). La delección de los exones 7 al 16 del gen *MSH2* (c.1077-?_2805+?del) también ha sido descrita en población vasca³¹⁶. Los datos de grandes reordenamientos obtenidos en nuestro estudio fueron comparados con los descritos en familias españolas con Síndrome de Lynch donde la tasa de reordenamientos se estableció en un 1,4%³¹⁵. El análisis estadístico χ^2 con corrección de Yates no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,5253$ para *MLH1* y $p=0,1510$ para *MSH2*) para grandes reordenamientos en ninguno de los genes *MMR* al igual que ocurrió al realizar esta comparación con los datos obtenidos en población del País Vasco³¹⁶ ($p=0,7258$ y $p=0,5810$, respectivamente). Resultó relevante la ausencia de grandes duplicaciones génicas, hecho que también ha sido descrito como evento mutacional raro en población española³¹⁵.

El gen *MSH6* es el tercero de los genes *MMR* implicado en la susceptibilidad a CCR en pacientes HNPCC con una frecuencia de mutaciones del 10% en este tipo de pacientes^{278,347,348}. En el presente estudio no se han detectado mutaciones en el gen *MSH6* en población gallega, lo que resulta de gran relevancia para el análisis molecular de pacientes con sospecha de Síndrome de Lynch esta población. Los estudios revelan que mutaciones más frecuentes en *MSH6* son del tipo *frameshift* o *missense* y que estas se distribuyen por todo el gen^{262,347}. Nosotros tan sólo hemos identificado una variante *missense* en *MSH6* (p.Ser144Ile), a la que hemos asignado como VUS debido a la controversia que existe acerca de la patogenicidad de esta variante^{277,278,318,321,349}. Las mutaciones en *MSH6* suelen asociarse a fenotipos más atenuados del HNPCC, en familias que cumplen criterios clínicos de Bethesda²⁷⁴ y con una aparición de CCR más tardía que en caso de pacientes con mutaciones en *MLH1* y *MSH2*²¹⁶. El fenotipo en estos pacientes se caracteriza por una localización generalmente distal del CCR, aparición de cáncer de endometrio y/o bajo grado de inestabilidad de microsatélites²⁴⁸. No hemos podido corroborar la clínica de las mutaciones en *MSH6* en nuestras familias al no detectar ninguna mutación en este gen. Se ha descrito un amplio rango en la frecuencia de mutaciones en *MSH6* desde valores del 18,4%(población británica)²⁸⁵, 16%(población escocesa)³⁵⁰ hasta inferiores al 5% (población sueca)³⁵¹.

En todos los tumores inestables se realizó, previo al análisis molecular de los genes *MMR*, el estudio de la mutación p.Val600Glu del gen *BRAF*. Este análisis permitió de forma indirecta detectar una posible hipermetilación de promotor de *MLH1* como responsable de la MSI del tumor. El análisis de *BRAF* como marcador molecular se debe al hecho de que es uno

de los genes (junto con *APC*, *KRAS2*, *AXIN2* y *TP53*) que acumula mutaciones cuando se produce la inactivación de alguno de los genes reparadores, según el modelo de progresión tumoral. Existen estudios que establecen una correlación directa (68,8%) entre la existencia de la mutación p.Val600Glu del gen *BRAF* y la hipermetilación del gen *MLH1* con un 100% especificidad y 48% sensibilidad^{79,83}. Ha de tenerse en cuenta que esta relación implica que las mutaciones en este gen no son una consecuencia directa de la actividad del sistema MMR *per se*⁸⁴. Los tumores inestables analizados en este estudio no presentaron la mutación p.Val600Glu, por lo que se descartó que su inestabilidad tumoral fuese causada por la hipermetilación del promotor de *MLH1*. En general se recomienda utilización del análisis de *BRAF* como paso anterior al estudio genético de los genes *MMR*, debido a la reducción significativa en el coste del análisis genético que esto implica³⁵².

Durante el análisis de las familias gallegas con sospecha de Síndrome de Lynch se detectó la existencia de un grupo de pacientes que cumplían Criterios de Ámsterdam o Bethesda con MSI para los que no se detectó la existencia de mutaciones en los genes *MMR* analizados, mediante técnicas convencionales. Estos casos constituyeron un 21% de las familias analizadas. La existencia de posibles mutaciones reguladoras en los genes *MMR*, otros genes de susceptibilidad al HNPCC no analizados en este trabajo (*PMS2*, *PMS1*, *MLH3*, *MSH3*, *MSH4*, *MSH5*, *AXINA-2*, *TGF β R2*, *EXO1*), alelos de baja penetrancia (repeticiones CA en el gen *IGF1* o la variante p.R462G en el gen *RNASEL*) u otros genes no descritos hasta el momento, podría ayudar a explicar la existencia de este grupo de pacientes. La proporción de mutaciones en *PMS2* asociada al Síndrome de Lynch ha sido subestimada en muchos estudios al no disponer de datos de IHQ, ya que no se realizó el análisis de este gen. El alto grado de inestabilidad tumoral asociado a los tumores *PMS2* positivos y el desarrollo de la técnica de IHQ para la detección de la proteína han revelado valores superiores a los esperados de mutaciones en este gen en pacientes con Síndrome de Lynch³⁵⁴. Estudios recientes revelan la existencia de alteraciones en *PMS2* en un 1,5-2,5% de tumores con historia familiar de cáncer o que cumplen uno o más criterios clínicos de Bethesda²¹⁰. Estos datos convertirían a este gen en un estupendo candidato a estudiar en este grupo de pacientes. Este es el caso de dos familias gallegas, que cumplen Criterios de Bethesda, presenta MSI y datos de IHQ negativa para la proteína *PMS2*, para las que se va a llevar a cabo el análisis molecular del gen.

También se detectó un grupo de pacientes (48,3%) caracterizados por cumplir los criterios clínicos de Ámsterdam pero no presentar alterado el sistema MMR (MSS). Estos pacientes fueron en su totalidad *MMR* negativos y presentaron un patrón de herencia autosómico dominante, presencia de CCR y ausencia de otros tipos tumorales. Pacientes con clínica similar han sido ya descritos en la bibliografía como un subgrupo dentro del cáncer hereditario con agregación familiar denominado Cáncer Familiar de tipo X²²⁶.

Basándonos en la existencia de estudios que correlacionan el desarrollo de cáncer colorrectal no-polipósico a edades tempranas (40-50 años) con mutaciones bialélicas en el gen *MUTYH*^{193,194}, hemos procedido al análisis de este gen en los pacientes Ámsterdam-positivos, MSS y en aquellas Bethesda-positivos MSS que han desarrollado cáncer antes de los 50 años. Identificamos un paciente con menos de 5 pólipos y CCR sincrónico a los 64 años en el que se

detectó una VUS (c.568-5 A>G) en homocigosis, cuyos análisis revelan una alta probabilidad de patogenicidad, a esperas del análisis a nivel de RNA. De confirmarse la patogenicidad de esta variante se confirmaría el papel del gen *MUTYH* como gen de susceptibilidad en el desarrollo del CCR en pacientes HNPCC menores de 50 años. No hemos detectado ningún portador bialélico en *MUTYH* para las mutaciones p.Tyr165Cys y p.Gly382Asp, las más frecuentes en nuestra población²⁹⁶, pero sí un portador monoalélico. Niessen *et al.*³⁵⁵ propuso un aumento de mutaciones del tipo *missense* en el gen *MSH6* en portadores monoalélicos en *MUTYH* con respecto a la población normal, lo que parece corroborarse en un estudio realizado en población española (11.5% vs 0%, p=0.037)³⁴⁰. Sin embargo, en este estudio no hemos detectado ningún cambio en *MSH6* en el paciente portador monoalélico de p.Gly382Asp en *MUTYH*. Estudios recientes en población alemana tampoco detectaron portadores monoalélicos en *MUTYH* tras analizar 19 portadores de *missense* en *MSH6*³⁵⁶.

V.3 VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO:

El análisis molecular de los genes implicados en la susceptibilidad al CCR puede establecer la existencia de alteraciones genéticas responsables de un aumento de riesgo a la hora de desarrollar esta enfermedad. En los genes *MMR* rutinariamente se detecta variantes del tipo *missense* o sinónimas con valores de 30% en *MLH1*, 25% en *MSH2*, y más de un 50% en *MSH6* y *MLH3* de las cuales la gran mayoría permanecen como variantes de significado incierto²⁶⁶. Lo mismo ocurre para los genes *APC* y *MUTYH*, aunque el número de estudios publicados al respecto nos indican que estas variantes aparecen con menor frecuencia^{131,358,300}

Hasta estos dos últimos años no se conocía mucho acerca del posible efecto de las VUS detectadas durante el análisis de muchos genes, asumiéndose un posible papel deletéreo de los cambios *missense* y un efecto neutro de los cambios sinónimos. La realización de estudios funcionales para muchas de estas variantes ha permitido comprobar que muchas *missense* (como la p.Arg653Gly y la p.Asn21026Ser del gen *APC*)^{131,362} y variantes sinónimas (p.Arg623Arg, p.Leu516Leu o p.His652His del gen *APC*) podían comportarse como cambios patógenos^{131,300,359}. El estudio de los mecanismos de *splicing* y de las regiones implicadas en la modulación del mismo ha permitido en los últimos años un mejor conocimiento de las VUS²⁶⁵. Hoy se sabe que la mayoría de las variantes de significado incierto localizadas en las regiones de unión exón-intrón y en las regiones exónicas pueden alterar el *splicing* al producir la disrupción de los elementos *cis* implicados en la regulación de éste, como son los motivos exónicos de activación (*enhancers*) y represión (*silencers*), y consecuentemente la unión de las proteínas SR (*serin-arginin-rich*)^{265,288,318,319,359,360}. De hecho se asume un muy probable efecto deletéreo de todas aquellas variantes localizadas en la región implicada en la definición de los extremos de los exones, principalmente la región 5' de *splicing* (constituida por las 3 últimas bases del exón y las 8 primeras del intrón adyacente) y 3' (constituida por las 12 últimas bases del intrón, incluyendo el tracto de pirimidinas, y las dos primeras bases del siguiente exón).Se

consideran deletéreas todas aquellas variantes intrónicas localizadas en las posiciones +1 y -1 del intrón³¹⁹.

El análisis de los distintos genes de susceptibilidad al desarrollo de CCR hereditario que hemos llevado a cabo en este trabajo detectó la presencia de 32 variantes de significado incierto (10 en el gen *APC*, 5 en *MUTYH* y 17 en los genes *MMR*). La detección de este tipo de variantes generó la necesidad de intentar establecer su posible papel en el desarrollo de la enfermedad. Con este motivo se realizó un estudio de estas VUS que implicó la utilización conjunta de predicciones bioinformáticas (la alteración del *splicing*, grado de conservación aminoacídico y posible alteración de la actividad proteica), análisis bibliográfico, estudios en población control, estudios *de* cosegregación con la enfermedad, coocurrencia con otra mutación deletérea, correlaciones con el fenotipo tumoral (MSI e IHQ) y la historia clínica familiar y personal del portador de las variantes, con el fin de establecer el carácter patógeno/neutro de las variantes. Este tipo de estudio nos permitió evidenciar mediante distintas vías el presunto carácter patógeno o neutro de las variantes analizadas. La utilización de varios métodos de aproximación proporciona una mayor robustez a los resultados obtenidos y reacuda la información necesaria para la realización de futuros estudios funcionales en las variantes que así lo requieran³⁶¹. Como se ha demostrado en otros estudios de esta índole^{266,318,319}, la utilización de herramientas bioinformáticas como predictores de patogenicidad de VUS en genes de alta penetrancia ha de ser tomada con cautela, considerándose necesaria la realización de estudios funcionales, de cosegregación y correlación con el fenotipo clínico personal y familiar a la hora de establecer una conclusión definitiva acerca de la patogenicidad de una variante²⁸⁹.

Hemos detectado 10 variantes de significado incierto en el gen *APC*, 8 exónicas (p.Lys150Lys, p.Ile544Thr, p.Ala571Ala, p.Arg653Arg, p.Ile1055Met, p.Arg1786Thr, p.Gln2291His y p.Ser2621Cys) y 2 intrónicas (c.423-3 T>G y c.1743+3 A>G). Las variantes c.423-3 T>G, p.Ile544Thr, p.Ala571Ala, p.Arg1786Thr y p.Gln2291His del gen *APC* se describen por primera vez en este estudio.

El (62,5%, 5/8) de las VUS codificantes se concentraron en el exón 15 del gen *APC*. Este dato resultó relevante ya que en general las VUS en este gen suelen presentar una distribución más dispersa por los exones 1-14³⁰⁰. Nuestro estudio establece la posible neutralidad de los cambios p.Arg653Arg, p.Ala571Ala p.Ser2621Cys. Este carácter neutro se ve reflejado en los resultados obtenidos en las predicciones *in silico* para función y alteración del *splicing* y la frecuencia del cambio en población control.

Los estudios *in silico* predicen a la variante p.Lys150Lys como neutra, aunque no existen estudios funcionales que lo corroboren. El hecho de que coocorra en un mismo paciente con dos variantes *missense* p.Ile544Thr (probablemente deletérea) y p.Gln2291His (para la que las predicciones *in silico* la dan como no deletérea) reduce bastante la posibilidad de que se trate de un cambio patógeno. En el caso de la variante p.Ala571Ala cosegrega con una mutación bialélica en el gen *MUTYH*, que sería la realmente responsable del fenotipo clínico de poliposis del portador. La presunta neutralidad de la variante p.Ser2621Cys que revelaron los estudios *in silico* han sido demostrados por estudios funcionales de RNA realizados por Kaufmann *et al.*³⁰⁰. Nuestro trabajo mediante el estudio de cosegregación que

hemos realizado permitió establecer resultados concluyentes, ya que la variante no cosegregó con la enfermedad. Los estudios de cosegregación se consideran un método bastante robusto para el análisis de variantes de alta penetrancia, aunque normalmente, debido al pequeño número de familiares que se pueden analizar y a la existencia de fenocopias, tan sólo permiten establecer la no patogenicidad de una variante cuando esta no cosegrega con la enfermedad pero nunca confirmar la patogenicidad de un cambio cuando existe cosegregación³⁶¹.

Las predicciones *in silico* sobre función proteica obtenidas para la VUS p.Arg653Arg y los estudios poblacionales (frecuencia polimórfica de 1,2%), apoyaron el papel neutro de la variante. Su localización en la primera base del exón 15 del gen *APC*, los datos *in silico* observados para la alteración del *splicing* parecen indicar un posible carácter patógeno de esta variante. Para esta variante la existencia de estudios funcionales de alteración de *splicing* nos permitió confirmar su papel neutro¹³¹. Se ha descrito otro cambio que afecta al mismo codón (c.1957 A>C, p.Arg653Arg) localizado en la penúltima base del exón 4 que altera el *splicing* del mRNA generando el *skipping* de este exón¹³¹.

Han permanecido como variantes de significado incierto: p.Ile544Thr, p.Ile1055Met, p.Arg1786Thr, p.Gln2291His, c.423-3 T>G y c.1803+3 A>G. Todas ellas evidencian, según el análisis realizado en este trabajo cierto grado de patogenicidad (a excepción de la variante p.Gln2291His) que no ha podido ser conclusivo a la luz de la información recaudada). La no publicación de estudios funcionales y la no realización de estudios de cosegregación ha impedido clasificar de un modo definitivo a estas variantes. La variante p.Ile1055Met ha sido descrita por primera vez en este estudio. Afecta a un dominio altamente conservado implicado en la unión a la β -catenina y los resultados de las predicciones *in silico* la sitúan dentro de las regiones implicadas en la regulación del *splicing*. La historia familiar y personal del paciente se corresponde con la de un portador de una mutación deletérea en *APC* (poliposis grave y edad promedio de aparición de CCR temprana, 38 años, e historia familiar de poliposis) más que con la de un paciente *APC*-negativo³²⁹, lo que aumenta las probabilidades de patogenicidad^{362,363}. Presentarían un posible carácter deletéreo las variantes p.Ile544Thr y p.Arg1786Thr, ya que ambas se localizaron en regiones alta y moderadamente conservadas, respectivamente, y generaron un cambio aminoacídico severo que podría afectar a la estructura y función proteica. En este caso tampoco existen estudios funcionales que pueden confirmar este efecto deletéreo, y además la historia familiar pese a mostrar un patrón autosómico dominante de CCR, presenta unas edades de aparición tardías (60s) de este tumor, por lo que no pudimos utilizarlas como evidencias de patogenicidad^{362,363}.

Las variantes intrónicas c.423-3 T>G y c.1743+3 A>G se han localizado dentro de la región altamente conservada implicada en la definición exónica. A pesar de que los resultados de las predicciones *in silico* no predicen ningún efecto sobre la alteración del *splicing*, ninguna de ellas ha sido detectada en la cohorte control analizada y los pacientes portadores presentan CCR con historia familiar autosómica dominante típica de alteraciones en el gen *APC*. El hecho de que no hayan sido descritas con anterioridad dificulta la interpretación de su significado clínico, al carecer de estudios funcionales. La descripción en la literatura de variantes con implicaciones clínicas localizadas en esta misma posición (como la c.1958+3 A>G que produce *skipping* del exón 14 de *APC*) o incluso en posiciones más alejadas del intrón (c.532-8G>A que

produce la aparición de un codón de parada al inicio de exón 4 de APC)¹³¹ nos hace pensar un posible efecto sobre la alteración del *splicing* de estas dos variantes. Los estudios de RNA que están siendo realizados confirmarían de un modo definitivo la patogenicidad de estos cambios.

La escasez de estudios funcionales acerca de VUS en *MUTYH* da una importante relevancia a nuestro estudio, a la vez que dificulta la interpretación de los resultados y por tanto la obtención de conclusiones acerca de la patogenicidad de las variantes analizadas. Además en *MUTYH* las evidencias de patogenicidad que aportan los estudios en población control y las correlaciones con la historia personal y familiar del paciente portador nos resultan de gran ayuda. Esto se debe principalmente al modelo de herencia autosómico recesivo de la MAP y la necesidad de dos *hits* en el gen para el desarrollo de la enfermedad.

Se ha descrito para el gen *MUTYH* una frecuencia (2,3%) de portadores monoalélicos de mutaciones puntuales en este gen en la población general española¹⁷², que puede llegar hasta valores del 2,5% y del 0,4% en otras poblaciones^{170,199}. Así la detección de una VUS con una frecuencia moderada en una cohorte control no la excluye que pueda producir una función defectiva de la proteína junto con otra mutación deletérea.

En el gen *MUTYH* hemos localizado 5 VUS, 4 codificantes (p.Ala13Ala, p.Val232Phe, p.Pro320Ala y p.Arg412Cys) y 1 intrónica (c.568-5 A>G), de las cuales las variantes p.Ala13Ala, p.Pro320Ala, y c.568-5 A>G se describen por primera vez en este estudio. La ausencia de estudios funcionales para la mayoría de estas variantes no nos ha permitido la realización de una interpretación definitiva sobre la posible patogenicidad de estos cambios, permaneciendo como VUS. La p.Ala13Ala se localiza en la tercera base del primer triplete del exón 2 del gen *MUTYH*, lo que compromete seriamente su neutralidad. Generalmente las primeras bases de los codones se relacionan con los fenómenos de *splicing* resultando necesaria la realización de estudios de RNA para confirmar su posible patogenicidad^{265,319}. También creemos conveniente la realización de este tipo de estudios para la variante c.568-5 A>G, ya que debido a su posición altamente conservada (implicada en la definición exónica), resultados de la aproximación *in silico*, fenotipo del paciente, historia familiar de CCR y a que se encuentra en homocigosis parece una buena candidata a mutación de *splicing*. La variante p.Val232Phe ha sido catalogada por nuestras predicciones de conservación aminoacídica y función proteica como de alto riesgo, lo que implicaría una alteración de la función proteica al verse alterado el dominio DNA-glicosilasa en el que se localiza. Las predicciones *in silico* y los estudios en población control no nos aportaron ninguna información acerca de sus implicaciones clínicas. Esta variante es la única para la que se han descrito estudios funcionales *in vitro* (función proteica y abundancia proteica) e *in vivo* en bacterias. Estos estudios en bacterias describen una reducción en la unión a A/8-oxoG y una deficiencia no severa su actividad glicosilasa al modificarse la interacción con MutS α (ya que esta variante se localiza en el dominio de unión con *MSH6*). Esta reducción de la actividad glicosilasa puede ser parcialmente estimulado mediante la interacción de *MUTYH* con MutS α , aunque no hasta niveles normales¹⁶⁶. La p.Arg412Cys presentó unos resultados *in silico* que evidenciaban un carácter posiblemente deletéreo y además no se detectó en población control gallega, aunque ya había sido descrita con anterioridad en población control del Reino Unido¹⁸⁵. Esta variante también carece de estudios funcionales.

Los genes *MMR* se caracterizan por presentar un alto número de variantes de significado incierto. Este hecho dificulta de una forma muy importante el diagnóstico de Síndrome de Lynch y la realización de consejo genético en aquellas familias que las portan. La distribución de VUS en los genes *MMR* no se localiza concentrada en una determinada región del gen, como ocurría en *APC*, sino que se produce aleatoriamente a lo largo de cada uno de los genes.

En nuestro estudio hemos localizado en los genes *MMR* 17 VUS: 53% en *MLH1*, 29,5% en *MSH2* y un 17,7% en *MSH6*, valores que siguen las proporciones descritas en la literatura^{274,364}. La elevada proporción de VUS descritas en nuestro estudio para el gen *MLH1* podría ser la responsable de la baja frecuencia de mutaciones en este gen en nuestra población con respecto a las detectadas en *MSH2*. La clasificación patogénica de estas variantes es aparentemente más sencilla y robusta debido al mayor número de estudios funcionales publicados sobre variantes detectadas en estos genes^{278,317-,321}. Además el hecho de que algunas de las variantes descritas cosegreguen con mutaciones deletéreas dentro del mismo gen puede resultar útil a la hora de evidenciar el papel clínico de estos cambios³⁶². Estudios en ratones KO para mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en los genes *MLH1* y *MSH2* muestran unos fenotipos muy agresivos asociados a tumores linfoides, tumores gastrointestinales y de piel³⁶⁵. En humanos los portadores de dos mutaciones en genes *MMR* presentan un fenotipo agresivo a edades muy tempranas²⁶⁶, de hecho los portadores de dos mutaciones en *MLH1* presenta frecuentemente neurofibromatosis³⁰⁹.

Las variantes Thr96Thr y c.885-34 C>T del gen *MLH1*, p.Pro196Pro y p.Val549Ile en *MSH2* y c.-119 G>A y c.3557-20 G>C en *MSH6*, han sido descritas por primera vez en este trabajo.

Nuestro estudio asignó un papel neutro a las variantes p.Val716Met y c.885-34 C>T, del gen *MLH1*. La variante p.Val716Met (*MLH1*) afecta a un aminoácido altamente conservado localizado en el dominio MMR de la proteína *MLH1*. Fue detectada en un paciente que cumplía Criterios de Ámsterdam, cáncer gástrico pero que presentaba tumor MSS. Este fenotipo no se corresponde con el fenotipo MSI asociado típicamente a mutaciones en *MLH1* y *MSH2*, y mucho menos a la severidad descrita para pacientes portadores de más de una mutación en los genes *MMR*. Existen estudios funcionales para la variante p.Val716Met acerca de su posible alteración del *splicing* (estudios de RNA y con vectores de expresión)^{318,320} que refuerzan el carácter neutro de este cambio. Incluso existe un estudio que asigna un carácter protector a esta variante³⁶⁶. Resultados similares fueron los obtenidos para la VUS c.885-34 C>T (*MLH1*) que además de no alterar ninguno de los parámetros analizados en el estudio, coocurre en un paciente portador una mutación deletérea (p.Arg487X) en *MLH1* que además no muestra un fenotipo severo de la enfermedad que se pudiese asociar con un paciente portador de dos mutaciones en los genes *MMR*. También se ha observado que las variantes p.Thr96Thr (*MLH1*), c.1039-28 T>A (*MLH1*), c.1039-30 T>A (*MLH1*), y c.3557-20C>G (*MSH6*) coocuren con mutaciones deletéreas en otros genes. Además los estudios de *predicción in silico* apuntan a carácter neutral, aunque no existen estudios funcionales que puedan avalar su posible neutralidad.

En el caso de la variante p.Hys718Tyr de *MLH1* (SNP monomórfico en caucasoides, considerada como patógena en *Uniprot*) no se ha podido establecer de un modo conclusivo el carácter patógeno de estas variantes, por lo que han permanecido como VUS. Nuestro apunta hacia un posible carácter neutro de estas, que se vería reforzado por la existencia de estudios funcionales de abundancia y función proteica³¹⁷. Además esta variante también ha cosegregado con una mutación deletérea en *MSH2* en un paciente Ámsterdam positivo con cáncer de ovario a los 28 años.

Ha de tenerse en cuenta que la coocurrencia de una VUS con una mutación deletérea no es informativa si aparece en *cis*, ya que independientemente de que la VUS sea o no patógena el riesgo que aporta dicha variante al desarrollo del cáncer estaría camuflado por la mutación causal. Tan sólo se obtendría información sobre la patogenicidad de la VUS cuando coocurre con una mutación en *trans*. Para la determinación de la coocurrencia en *cis* o en *trans* de una VUS con un mutación deletérea es necesario analizar a los padres del probando³⁶⁴.

Pero estos criterios no se han podido aplicar a todas las variantes estudiadas permanciendo las variantes p.Gly244Val, p.Val384Asp, p.Arg755Ser, de *MLH1* p.Pro196Pro, p.Ala328Ala, p.ValV549Ile y c.1510+39 T>A de *MSH2*. Lo mismo ocurre para la variante c.367-87 A>C de *MSH2* y c.-119 G>A y p.Ser144Ile del gen *MSH6* como variantes de significado incierto. Las variantes p.Pro196Pro y p.Ala328Ala de *MSH2* parecen tener un papel probablemente neutro, según los resultados *in silico*, aunque la ausencia de estudios funcionales o de cosegregación no nos lo permitieron confirmar. Tampoco se pudieron clasificar las variantes c.367-87 A>C de *MSH2* y c.-119 G>A de *MSH6*. La ausencia de datos de IHQ en los pacientes portadores y su *estatus* tumoral MSI no nos permiten ofrecer ningún resultado sino sólo especulaciones acerca de su posible efecto funcional. El alelo c.367-87 A>C presenta unos datos de posible alteración del *splicing*, que deberían ser confirmados con estudios de RNA. En el caso del cambio c.-119 G>A de *MSH6* las predicciones *in silico* no nos aportan ningún dato pero por su localización podría funcionar como mutación reguladora de la expresión de este gen.

No se detectaron en controles las variantes p.Gly244Val, p.Val384Asp y p.Arg755Ser del gen *MLH1* ni de la variante p.Ser144Ile localizada en *MSH6*. Estos datos unidos a los valores de patogenicidad establecidos en casi todos los parámetros evaluados *in silico* (alteración del *splicing* y posible alteración de la función proteica) y a que no coocurren con ninguna mutación en otro gen *MMR* en un paciente con fenotipo tumoral MSI parece evidenciar una posible patogenicidad de estos cambios. En el caso de la variante p.Gly244Val existen estudios funcionales que apoyan este carácter posiblemente patógeno al describir una reducción de la abundancia proteica en mutantes para este cambio³¹⁷. No es así en el caso de la variante p.Val384Asp que resulta neutra en estudios funcionales de dominante negativo³¹⁷. Resultó llamativo el caso de la variante p.Arg755Ser de *MLH1*, cuyos estudios funcionales de abundancia proteica y dominante negativo mostraron evidencias de neutralidad para esta variante³¹⁷. Nosotros pudimos realizar un estudio de cosegregación que fue no informativo, al detectarse la variante en dos individuos afectados analizados, pero que no fue suficiente para establecer la patogenicidad del cambio³⁶².

Existe una gran controversia acerca de la patogenicidad de la *missense* p.Ser144Ile de *MSH6*. Esta *missense* se localiza en el dominio PWWP de la proteína implicado en la unión a DNA. Ha sido descrita como mutación causal de HNPCC y estudios funcionales le asocian este mismo rol revelando una función defectiva del sistema MMR al generar una leve inestabilidad del dominio, que no perturba la unión al DNA, según estudios *in vitro*^{277,278,319,321,349,367}. Las mutaciones en *MSH6* suelen asociarse a fenotipos atípicos de CCR a edades tardías, localización generalmente distal, aparición de cáncer de endometrio y/o bajo grado de inestabilidad de microsatélites²⁷⁷. El paciente portador de esta variante (GAL-59) cumple Criterios de Bethesda, CCR a los 44 años con tumor MSI-L. Este grado de MSI apoya el carácter patógeno de la variante p.Ser144Ile. La L-MSI parece ser explicada debido a la redundancia funcional existente en la reparación de loops generados por inserciones y deleciones (MutS α y MutL β)²⁴⁸, lo que se refleja una mayor penetrancia de las mutaciones en el gen *MSH2* que en el locus *MSH6* en pacientes con Síndrome de Lynch. Barneston *et al.* Recientemente ha publicado un estudio con una base similar a la nuestra que le asigna un carácter neutro a esta variante³¹⁸.

Con estos resultados no podemos descartar para ninguna de las variantes estudiadas, tanto intrónicas como exónicas, su posible actuación como alelo de baja penetrancia, como se ha descrito recientemente para la variante c.116G>A (p.Gly39Glu) del gen *MSH6*^{340,368,369} o para la variante p.Val22Met, considerada polimorfismo de riesgo en presencia de la mutación p.Tyr165Cys del gen *MUTYH*¹⁸⁹.

El estudio de variantes de significado incierto ha sufrido un gran auge en los últimos años, reflejo de ello es la gran cantidad de publicaciones al respecto de este último año,^{370,371,372,373,374}. Este avance está siendo quizá mayor en lo que respecta a las VUS de los genes *MMR* y otros genes como los BRCA1 y 2, debido a la alta incidencia de este tipo de variantes³⁷⁷. Todo ello está permitiendo avanzar en el intento de establecer las directrices que permitan clasificar a las VUS como posiblemente deletéreas/neutras, en el desarrollo de nuevos modelos funcionales o en el desarrollo de nuevas estrategias combinadas de discriminación de variantes patógenas

Nuestro estudio ha permitido clasificar como neutras las variantes, p.Arg653Arg, p.Ala571Ala y p.Ser2621Cys de *APC* y p.Val716Met y c.885-34 C>T de *MLH1*. Las demás variantes se siguen considerando VUS, aunque algunas de ellas apuntan un carácter neutral a la espera de ser confirmado en otros estudios: p.Lys150Lys de *APC*, p.Thr96Thr, p.His718Tyr, c.1039-28 T>A y c.1039-30 T>A de *MLH1* y p.Val549Ile, p.Pro196Pro, p.Ala328Ala, p.Val 549Ile y c.1510+39 T>A de *MSH2*. Estas conclusiones han podido obtenerse como resultado de la combinación de las predicciones bioinformáticas con la existencia de estudios funcionales previos, estudios de cosegregación y características tumorales, clínicas y genéticas de los pacientes portadores de las variantes. Es por este motivo que consideramos los estudios realizados mediante aproximaciones múltiples estrictamente necesarios a la hora de establecer la patogenicidad de estas variantes, permitiendo así la mejora del asesoramiento y manejo clínico de los portadores de VUS³⁷¹.

VI. CONCLUSIONES

Primera: La tasa de detección de mutaciones causales en *APC* y *MUTYH* en los pacientes con Poliposis Adenomatosa Familiar analizados, fue similar a la reportada en otros estudios, 39,6% y 21%, respectivamente. Sin embargo, se observó que la frecuencia del *hotspot* en el codón 1061 de *APC* es significativamente más baja en Galicia, esta misma tendencia se cumple para el *hotspot* en el codón 1309 de este gen. La baja incidencia de mutaciones en estos dos *hotspots* originaría una mayor heterogeneidad de mutaciones en el gen *APC* en esta población.

Segunda: La distribución de mutaciones asigna al gen *MSH2* un papel principal como gen de susceptibilidad al Síndrome de Lynch en población gallega, apareciendo mutado en el 37,2% de los pacientes *MMR* positivos, frente al 7% de *MLH1* y un 0% en el gen *MSH6*. Al comparar con otras poblaciones, destaca la alta tasa de mutaciones puntuales identificadas en *MSH2* en relación a *MLH1* (30,2% vs 4,6%).

Tercera: Los grandes reordenamientos en los genes de susceptibilidad al cáncer colorrectal hereditario constituyen un 8,4% de las mutaciones germinales en *APC* y un 9,36% de las mutaciones germinales en *MMR* (*MLH1* y *MSH2*). El uso del MLPA como técnica complementaria al análisis de mutaciones puntuales incrementa en un 23% la sensibilidad del proceso de detección de mutaciones en estos genes.

Cuarta: Se han podido clasificar como neutras las siguientes variantes de significado incierto (VUS): p.Arg653Arg, pAla571Ala y p.Ser2621Cys de *APC* y p.V716Met y c.885-34 C>T de *MLH1*. Estos resultados demuestran que el uso de diversas aproximaciones es de gran utilidad para la clasificación de VUS.

Quinta: En los genes de susceptibilidad analizados, no se ha identificado ninguna mutación fundadora en población gallega, por lo que no es necesario establecer nuevos protocolos de diagnóstico molecular del CCR hereditario para esta población. Sin embargo, para el diagnóstico del Síndrome de Lynch, cuando no se disponga de datos de la inmunohistoquímica del tumor para las proteínas *MMR*, se recomienda iniciar el análisis de mutaciones puntuales por el gen *MSH2*.

VII. ANEXOS

VII.1 ANEXO I: PRIMERS DE AMPLIFICACION Y SECUENCIACION DEL GEN APC

Exón	Primer	Tipo de primer	Secuencia: 5' → 3'	Longitud del primer	Tamaño del fragmento Amplificado	Tm °c
1	APC-E1-AF*	PCR/S	AACCTTATAGGTCCAAGGGTAG	22pb	234pb	62.2
	APC-E1-AR*	PCR/S	ACCTCAAGTTTACAAGAGGGAA	22pb		60.5
2	APC-E2-F*	PCR/S	AAATACAGAATCATGTCTTGAAGT	24pb	212pb	57.4
	APC-E2-R*	PCR/S	ACACCTAAAGATGACAATTTGAG	23pb		58.7
3	APC-E3-F*	PCR/S	GACCCAAGTGGACTTTTCAGG	21pb	423pb	64.6
	APC-E3-R*	PCR/S	ACAATAAACTGGAGTACACAAGG	23pb		58.6
4	APC-E4-BF*	PCR/S	GAGAAGTTTGAATAACAACACTGATG	25pb	291pb	59.3
	APC-E4-BR*	PCR/S	TTATCCTGAATTTAATGGATTACCT	26pb		57.8
5	APC-E5-CF*	PCR/S	AACCTCACTCTAACTGGACCAA	22pb	481pb	57.9
	APC-E5-CR*	PCR/S	AACAGAGCTGAATTCATTTTATTCC	26pb		58.4
6	APC-E6-F*	PCR/S	GGTAGCCATAGTATGATTATTTCT	24pb	204pb	56.1
	APC-E6-R*	PCR/S	CTACCTATTTTTATACCCACAAAC	24pb		56.5
7	APC-E7-F*	PCR/S	AAGAAAGCCTACACCATTTTTGC	23pb	238pb	64.0
	APC-E7-R*	PCR/S	GATCATTCTTAGAACCATCTTGC	23pb		60.5
8	APC-E8-AF*	PCR/S	GACACTTCATTTGGAGTACCTTAACA	26pb	222pb	63.0
	APC-E8-AR*	PCR/S	GGCATTAGTGACCAGGGTTT	20pb		62.6
9	APC-E9-F*	PCR/S	AGTCGTAATTTTGTCTAAACTC	24pb	394pb	56.4
	APC-E9-R*	PCR/S	TTGAAACATGCACTACGAT	20pb		58.2
10	APC-E10-AF*	PCR/S	TTGCTCTCAAATAACAAAGCAT	23pb	192pb	61.5
	APC-E10-AR*	PCR/S	TCCACCAGTAATTGTCTATGTCA	22pb		60.8
11	APC-E11-F*	PCR/S	GATGATTGTCTTTTCTCTTGC	23pb	215pb	62.7
	APC-E11-R*	PCR/S	CTGAGCTATCTTAAGAAATACATG	24pb		55.7
12	APC-E12-BF*	PCR/S	TGACAAAGGAAGAACAGATAGCA	23pb	390pb	62.6
	APC-E12-BR*	PCR/S	GCAGTGAGCTGAGATTGCAC	20pb		63.9
13	APC-E13-F*	PCR/S	TTTCTATTCTACTGCTAGCATT	23pb	306pb	55.8
	APC-E13-R*	PCR/S	ATACACAGTAAGAAATTAGGA	22pb		53.7
14	APC-E14-AF*	PCR/S	AGGGACGGGCAATAGGATAG	20pb	390pb	63.9
	APC-E14-AR*	PCR/S	GGTCTTTTGGAGGTATGAATTCTG	25pb		60.9
15 15-2	APC-e15-IU	PCR/S	GTTACTGCATACATTGTGAC	22pb	1400pb	57
	APC-15-2A	PCR/S	TGTGGTTGGAACCTGAGGTG	20pb		63.7
	APC-15-1S	S	GAGAACAACGTCTACAAAC	20pb		50.9
	APC-15-1A	S	AGAGTTCAACTG	12pb		57
	APC 848-S	S	CTACAGTGTACCCAGCT	18pb		52.8

	APC 848-AS	S	GTTGCTGGATGGTAGTTG	18pb		56.4
	APC-DR	S	GCTGCAGCACTCCCATAGC	20pb		67.1
15-1	APC 15S	PCR/S	CAGATGAGCAGTTGAACT	18pb	907pb	55.7
	APC 15A	PCR/S	GATTTGGTTCTAGGGTGC	18pb		63.7
	APC-15-1iU	S	GTGGATCAGCCTATTGATTA	21pb		56.6
	15-FR1-R	S	GGAGCTGATTCTGCCTC	18pb		58.4
15-0	APC 1309-S	PCR/S	ACAGGAAGCAGATTCTGC	18pb	1200pb	57.9
	APC 15-2	PCR/S	GAGCCTCATCTGTACTTCTGC	21pb		60.6
	APC-15-OU	S	TGCCACGGAAAGTACTCCAG	21pb		65.1
	APC-FR0-R	S	CTGCCTCTTTCTTTGG	18pb		55.8
15-3	APC-E 15-3U	PCR/S	AGTGATCTAACAAATCGAATCC	21pb	1200pb	57.1
	APC-E 15-3R	PCR/S	CACCCTTGAGTCTTGAAGGC	20pb		63.7
	APC-E 15-3iU	S	CACCTCATCATTACACGCC	19pb		61.6
	APC-E 15-3iR	S	GGTTAGTTCTGTGTGGCTGG	20pb		62.1
15-4B	APC-E15-4BF	S	CCTGACTCACAGGGAGAACC	20pb	1400pb	63.7
	APC-E15-4BR	PCR/S	GGCTTGGAGCTTCTTTGATG	20pb		63.7
	APC-E15-QUP	PCR/S	CAGCCCCTTCAAGCAAACATG	21pb		68.7
	APC-E15-QRP	S	GAGGACTTATTCCATTTCTACC	22pb		57.2
	APC-E15-OUP	S	AAGATGACCTGTTGCAGGAATG	22pb		65.1
15-5B	APC-E15-5BF	PCR/S	CCAAGGACATCATCCCCTAGT	21pb	1700pb	63.9
	APC-E15-5BR	PCR/S	GAAGTTGGGATGGGATGCTA	20pb		63.7
	APC-E15-VUP	S	TCTCCACAGGTAATACTCCC	21pb		61.7
	APC-E15-VRP	S	GCTAGAAGTGAATGGGGTACG	21pb		62.3
	APC-E15-URP	S	TTGAATCTTTAATGTTGGATTT	23pb		58.1

S: *Primers* de secuenciación; PCR: *Primers* de PCR. *Primers* tomados de Ruiz.Ponte *et al.*2001²⁹⁰.

VII.2 ANEXO II: PRIMERS DE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *MUTYH*.

VII.2.1 LISTADO DE PRIMERS DE PCR Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN *MUTYH*

Exón	Primer	Tipo del primer	Secuencia: 5'→3'	Longitud del primer	Tamaño del fragmento amplificado	T _m °c	
1	<i>MUTYH-1BR</i>	PCR/S	GACGTCTGAACGGAAGTTCG	20pb	234pb	64,7	
	<i>MUTYH-1BF</i>	PCR/S	AGAGCGCAGAGGCTTTGA	18 pb		64,1	
2	<i>MUTYH-2R</i>	PCR/S	CCTTCCCAGCCTGAATCTG	19 pb	250bp	60,74	
	<i>MUTYH-2F</i>	PCR/S	CCTTGAAGGCCTCAAAT	19 pb		59,11	
3-7	AB	<i>MUTYH-A</i>	GTTAGTTGGGAAGCCCTA	20pb	996bp	60,31	
		<i>MUTYH-B</i>	CACCTGATTGGAGTGCCAAGA	20pb		59,83	
6-10	CD	<i>MUTYH-C</i>	TTGGGGTGGGTGTAGAGAAG	20pb	948bp	59,96	
		<i>MUTYH-D</i>	AGAGGCACAGGGTTGAGTGT	20pb		59,76	
10-14	EF	<i>MUTYH-E</i>	GCTCACAGCAGTGTCCCT	20pb	1276bp	64,4	
		<i>MUTYH-13R</i>	S	GGCTATTCCGCTGCTCACTT		20pb	65,5
		<i>MUTYH-13F</i>	S	AGGGCAGTGGCATGAGTAAC		20pb	64
		<i>MUTYH-F</i>	PCR	CAACAGAGCGATTCTCCGTCTC		22	67,3
15	<i>MUTYH-15R</i>	PCR/S	AGTGAAGCCTGGAGTGGAGA	20 pb	289pb	64,0	
	<i>MUTYH-15F</i>	PCR/S	TGAAGTTAAGGGCAGAACACC	21 pb		62,9	
16	<i>MUTYH-16AR</i>	PCR/S	CGAAACCAGTCTGAGCAACA	20 pb	397pb	64,1	
	<i>MUTYH-16AF</i>	PCR/S	GGGAAAGGGAGAGGACAA	18 pb		64,3	

S: *Primers* de secuenciación; PCR: *Primers* de PCR

VII.2.2 LISTADO DE PRIMERS DE PCR Y AMPLIFICACIÓN PARA LOS HOTSPOTS DE *MUTYH*.

Exón	Primer	Tipo de <i>primer</i>	Secuencia: 5'→3'	Longitud del <i>primer</i>	Logitud del fragmento amplificado	Tm °c
7	<i>MUTYH</i> -7-165F	PCR/S	CCCTAGGGTAGGGGAAATAGG	21pb	280pb	60,04
	<i>MUTYH</i> -7-165R	PCR/S	TGATTGGAGTGCAAGACTCA	20pb		57,88
13	<i>MUTYH</i> -13F	PCR/S	GGCAGTGGCATGAGTAACAA	20pb	296pb	59.72
	<i>MUTYH</i> -13R	PCR/S	AAGGGTCAAGGGGTCAAAT	20pb		59.67

S: *Primers* de secuenciación; PCR: *Primers* de PCR

VII.3 ANEXO III: PRIMERS DE PCR Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN *MLH1*.

Exón	Primer	Tipo de primer	Secuencia: 5'→3'	Longitud del primer	Tamaño del fragmento amplificado	Tm °c
1	<i>MLH1</i> -1AR	S	GGGGAGAGCGGTAAAGAAAC	20pb	412pb	63,7
	<i>MLH1</i> -1AF	S	TGACTGGCATTCAAGCTGTC	18 pb		64,1
	<i>MLH1</i> -1F	PCR/S	CTGAGGTGATTGGCTGAAG	19 pb		61,0
	<i>MLH1</i> -1R	PCR/S	CCGTTAAGTCGTAGCCCTT	19 pb		60,7
2	<i>MLH1</i> -E2-AF	S	TGAGCCTGTAAGACAAAGGAAA	22 pb	400pb	62,6
	<i>MLH1</i> -E2-AR	S	TGAACAGTGCCAGCAAATA	20 pb		64,2
	<i>MLH1</i> -E2-F	PCR/S	AATATGTACATTAGAGTAGTTG	22		47,0
	<i>MLH1</i> -E2-R	PCR/S	CAGAGAAAGGTCCTGACTC	19		56,3
3	<i>MLH1</i> -E3-1AF	PCR/S	GCAGAGGTTGCAGTGAGTTG	20pb	206 pb	63,7
	<i>MLH1</i> -E3A-R	PCR/S	GGGGGAGAAAAGATCTGAGG	20pb		63,7
	<i>MLH1</i> -3F	PCR/S	AGATTTGGAAAAATGAGTAACATGA	25 pb		61,4
	<i>MLH1</i> -3R	PCR/S	ACAATGTCATCACAGGAGGA	20 pb		60,6
4	<i>MLH1</i> -4F	PCR/S	AACTTTCCCTTTGGTGAGG	20 pb	226 pb	64,0
	<i>MLH1</i> -4R	PCR/S	GATTACTCTGAGACCTAGGC	20 pb		54,5
5	<i>MLH1</i> -E5-AF	PCR/S	TGGAGAAATAAATAGGAAAATG	22 pb	398 pb	61,2
	<i>MLH1</i> -E5-AR	PCR/S	CATGCCACAAAAGCCAATAG	20 pb		62,9
6	<i>MLH1</i> -6F	PCR/S	GGGTTTTATTTTAAGTACTTCTATG	26 pb	236 pb	59,0
	<i>MLH1</i> -6R	PCR/S	GCTCAGCAACTGTTCAATGTATGAGC	26 pb		68,6
7	<i>MLH1</i> -7F	PCR/S	CTAGTGTGTGTTTTTGGC	18 pb	184 pb	53,8
	<i>MLH1</i> -7R	PCR/S	CATAACCTTATCTCCACC	18 pb		51,4
8	<i>MLH1</i> -8F	PCR/S	CTCAGCCATGAGACAATAAAT	21 pb	217 pb	63,4

	MLH1-8R	PCR/S	GGTCCCAAATAATGTGATGG	22 pb		62,6
9	MLH1-9F	PCR/S	TCITTTGTAATGTTTGAGTTTTG	23 pb	222 pb	60,1
	MLH1-9R	PCR/S	GTGGGTGTTTCTGTGAGT	19 pb		60,0
10	MLH1-10F	PCR/S	CTCACCCCTCAGGACAGT	18 pb	258 pb	60,3
	MLH1-10R	PCR/S	GTATGGGATTCACCTGATTG	21 pb		58,4
11	MLH1-11F	PCR/S	CCCCCTCCACTATCTAAG	19 pb	278 pb	59,9
	MLH1-11R	PCR/S	AAAATCTGGGTCTCACG	18 pb		60,4
12	MLH1-12-S	PCR/S PCR/S	TCGGGCAGAATTGCTTCTAT	20 pb	697 pb	63,5
	MLH1-12-A	PCR/S	CAAAGGCAGACAGTGGACAA	20 pb		63,9
	MLH1-12iF	S	GCTACCAGGACTTGCTGGCC	20 pb		68,2
13	MLH1-13F	PCR/S	TGCAACCCACAAAATTTGGC	20 pb	293 pb	67,7
	MLH1-13R	PCR/S	CTTTCTCCATTTCCAAAACC	20 pb		59,9
14	MLH1-14F	PCR/S	TAGTTCTGGTGCCTGGTG	18 pb	232 pb	64,1
	MLH1-14R	PCR/S	GCTCTGCTTGTCACACACT	20 pb		63,0
15	MLH1-15F	PCR/S	CCCAACTGGTTGTATCTCAAG	21 pb	172pb	61,0
	MLH1-15R	PCR/S	CGATCAGTTGAAATTTGAGA	20 pb		61,3
16	MLH1-16F	PCR/S	CATTTGGATGCTCCGTTAAAGC	22 pb	276 pb	66,3
	MLH1-16R	PCR/S	CACCCGGCTGGAAATTTTATTT	22 pb		68,6
	MLH1-16iR	S	GTCCTTCTTTGGGACCATC	19 pb		60,9
17	MLH1-17F	PCR/S	GGAAAGCACTGGAGAAATGG	18 pb	232 pb	69,6
	MLH1-17R	PCR/S	CCCTCCAGCACACATGCATGT	21 pb		76,6
	MLH1-17iR	S	ATGCTTAGTATCTGCTTGATC	21 pb		55,2
18	MLH1-18F	PCR/S	TCTGTGATCTCCGTTTAGAATG	22 pb	269 pb	68,7
	MLH1-18R	PCR/S	GGTCCTGTCCTAGTCCTGG	19 pb		61,1
19	MLH1-19F	PCR/S	GACACCAGTGTATGTTGG	18 pb	269 pb	54,1
	MLH1-19R	PCR/S	GAGAAAGAAGAACACATCCC	20 pb		57,7

S: *Primers de secuenciación*; PCR: *Primers de PCR*

VII.4 ANEXO IV: PRIMER DE SECUENCIACIÓN Y PCR PARA EL GEN *MSH2*.

Exón	Primer	Tipo de primer	Secuencia: 5'→3'	Longitud del primer	Logitud del fragmento amplificado	Tm°C
1	<i>MSH2</i> -E1AR	PCR/S	CACTGGAGAGGCTGCTCAC	19pb	371 pb	64,0
	<i>MSH2</i> -E1AF	PCR/S	GAAACAGTTTAGTGGGTGTGG	21pb		63,4
	<i>MSH2</i> -1iR	S	GGCCCTCACCTGCCGGCCCC	20pb		81,4
	<i>MSH2</i> -E1iF	S	ATGGCGGTGCAGCCGAAGG	19pb		74,8
2	<i>MSH2</i> -E2F	PCR/S	GTCCAGCTAATACAGTGCTTG	21pb	280 pb	59,0
	<i>MSH2</i> -E2R	PCR/S	CACATTTTTATTTTCTACTCTT	23pb		54,6
	<i>MSH2</i> -2iR	S	CTTATATGCCAAATACCAATCA	22pb		58,8
	<i>MSH2</i> -2iF	S	TCTGCAGAGTGTGTGCTTA	20pb		58,0
3	<i>MSH2</i> -E3-1AF	PCR/S	GCAGAGGTTGCAGTGAGTTG	20pb	697 pb	63,7
	<i>MSH2</i> -E3A-R	PCR/S	GGGGGAGAAAAGATCTGAGG	20pb		63,7
	<i>MSH2</i> -3iF	S	ATTTTATTTTACTTAGGC	19pb		47,2
4	<i>MSH2</i> -E4F	PCR/S	TTTTTGCTTTTCTTATTCTTTTC	24pb	309 pb	61,2
	<i>MSH2</i> -E4R	PCR/S	TGACAGAAATATCCTTCTAA	20pb		61,9
5	<i>MSH2</i> -E5A-F	PCR/S	AGTTTTCTTGGTTGGATTGG	21pb	471 pb	61,6
	<i>MSH2</i> -5A-R	PCR/S	AGTGGAGGAGGGGAGAGAAA	20pb		64,0
	<i>MSH2</i> -5iR	S	CTGAAAAAGGTTAAGGGCTC	20pb		59,3
6	<i>MSH2</i> -E6-F	PCR/S	TTCATAATGAGCTTGCCATTC	22pb	245 pb	62,9
	<i>MSH2</i> -E6-R	PCR/S	GTATAATCATGTGGGTAAC	19pb		48,6
7	<i>MSH2</i> -E7-F	PCR/S	CTTACGTGCTTAGTTGATAA	20pb	321 pb	52,2
	<i>MSH2</i> -E7-R	PCR/S	TATATTGTATGAGTTGAAGGAA	22pb		56,1
8	<i>MSH2</i> -E8-F	PCR/S	TTTGTATTCTGTAAAATGAGATC	23pb	217 pb	58,0
	<i>MSH2</i> -E8-R	PCR/S	CTTTGCTTTTTAAAAATAACTAC	23pb		56,4
9	<i>MSH2</i> -E9-F	PCR/S	CTTTACCCATTATTTATAGGATT	23pb	213 pb	54,0

	<i>MSH2-E9-R</i>	PCR/S	ATAGACAAAAGAATTATTCCAA	22pb		54,7
10	<i>MSH2-10A-F</i>	PCR/S	GCAGCCTTGGATGGGTTTAC	20pb	588 pb	65,4
	<i>MSH2-10A-R</i>	PCR/S	CAGACGGACTATTTAACAAA	20pb		54,4
11	<i>MSH2-E11A-F</i>	PCR/S	GGATACTTTGGATATGTTTCACG	23pb	295 pb	61,0
	<i>MSH2-E11A-R</i>	PCR/S	GAATGTAATGGCTTGCAGAAA	21pb		63,6
12	<i>MSH2-E12-AF</i>	PCR/S	GGGTTTTGAATCCCAAATG	20pb	419 pb	53,6
	<i>MSH2-E12-AR</i>	PCR/S	AACTGGGAATTTTCTCCATCAA	22pb		67,2
	<i>MSH2-E12-F</i>	S	TCAGTATTCTGTGTACATTT	21pb		62,7
	<i>MSH2-E12-R</i>	S	TTACCCCACAAAGCCCAA	19pb		63,3
13	<i>MSH2-E13-F</i>	PCR/S	CGATTAATCATCAGTGTA	18pb	330 pb	48,3
	<i>MSH2-13-R</i>	PCR/S	CAGAGACATACATTTCTATCTTC	23pb		53,3
14	<i>MSH2-E14-F</i>	PCR/S	CCACATTTTATGTGATGGGAA	21pb	349 pb	61,9
	<i>MSH2-E14-R</i>	PCR/S	GGTAGTAAGTTTCTCATTACCA	22pb		60,5
15	<i>MSH2-15-AF</i>	PCR/S	CAAGGTGAGAAGGATAAATTCCA	23pb	357 pb	62,4
	<i>MSH2-15-AR</i>	PCR/S	CAGAGGAAAACAACAACAACAA	23pb		49,5
16	<i>MSH2-E16A-F</i>	PCR/S	TGTGTGATATGTTTAGATGGAA	22pb	384 pb	62,9
	<i>MSH2-E16A-R</i>	PCR/S	CCCATGGGCACTGACAGTTA	20pb		65,9

S: *Primers de secuenciación*; PCR: *Primers de PCR*

VII.5 ANEXO V: LISTADO DE PRIMERS DE SECUENCIACION Y PCR DEL GEN *MSH6*.

Exón	Primer	Tipo de primer	Secuencia: 5'→3'	Longitud del primer	Logitud del fragmento amplificado	Tm °c
1	<i>MSH6-1AF</i>	PCR/S	GAGGCGCCTGTGATTGG	18 pb	561pb	66,9
	<i>MSH6-1AR</i>	PCR/S	CTGCACTCATTCAAGCCAAC	20 pb		63,4
2	<i>MSH6-2F</i>	PCR/S	TTTTTAAATGACTTGAATATCTGA	24 pb	540pb	56,2
	<i>MSH6-2R</i>	PCR/S	AACAAACCAGCTAAAGACCA	20 pb		58,8
3	<i>MSH6-3AF</i>	PCR/S	GATGGGGTTTGTCTATGTTGC	20 pb	497pb	64,1
	<i>MSH6-3AR</i>	PCR/S	CCTGCCAGTAGGCTTGAAAA	20 pb		64,1
4I	<i>MSH6-4IF</i>	PCR/S	AGCCTAAAGTTGGGCAAGAT	20 pb	1240bp	61,5
	<i>MSH6-4IR</i>	PCR/S	CACGAGTATGGCCAGAAGAA	20 pb		62,8
4J	<i>MSH6-4JF</i>	PCR/S	ATTGCATTTGGCCGTTATTC	20 pb	1127pb	63,4
	<i>MSH6-4JR</i>	PCR/S	GCTGTCTGGGTGTTCTGAC	20 pb		64,8
4	<i>MSH6-4KiF*</i>	PCR/S	ATGAACAGAGCCTCCTGGAA	20 pb	1247pb	63,7
	<i>MSH6-4-K2R*</i>	PCR/S	CAGCTGGCAAACAGCACTAC	20 pb		63,6
4KH	<i>MSH6-4KHF*</i>	PCR/S	TTTTGGTAAGCGGCTCCTAA	20 pb	1247pb	63,3
	<i>MSH6-4KHR*</i>	PCR/S	TTTCGAGCCTTTTCATGGTC	20 pb		63,9
4KI	<i>MSH6-4KIF*</i>	PCR/S	TTTCTGCTCTGGAAGGATTC	20 pb	1247pb	60,9
	<i>MSH6-4KIR*</i>	PCR/S	TCGTTTACAGCCCTTCTTGG	20 pb		60,24
5	<i>MSH6-5F</i>	PCR/S	AGTATTTTGATGGGGGAGAT	20 pb	540pb	58,7
	<i>MSH6-5R</i>	PCR/S	GTAATTTCCCTTTGCTTCTCT	20 pb		58,7
6	<i>MSH6-6F</i>	PCR/S	CCAACGTACATGTGATTGTGAA	22 pb	390pb	63,2
	<i>MSH6-6AR</i>	PCR/S	TGCAGTTCCTTAAAAAGTGATGTTT	24 pb		60,6
7	<i>MSH6-7IF</i>	PCR/S	GAGTATTCATTTGTGATTTTTTTTTTTTAAAG GTG	35 pb	575pb	68,3
	<i>MSH6-7IR*</i>	S	CAAATGAGAAGTTTAATGTCTTACC	25 pb		58,7
	<i>MSH6-7F</i>	PCR/S	AGGCTGGTCTCTTAACTCCT	20 pb		58,5

	<i>MSH6-72iF</i> *	S	GAATTAAGTGAAACTGCCAGC	21 pb		60,3
	<i>MSH6-72iR</i>	S	AATGTCTTACCTAATTCATCCACAA	25 pb		61,3
	MSH6-7R	PCR/S	GTGTTCTCATCCCCGTAGTA	20 pb		59,0
8- 10	MSH6-8F	PCR/S	AGAATGCTTTTAGACGTGGA	20 pb	894pb	61,9
	<i>MSH6-10R</i>	PCR/S	TCCTAGAAAGAAAATGGAAAAA	22 pb		62,7
	MSH6-9R	S	TTGCTTTTCTATGTCCCTTTTG	22 pb		63,4
	MSH6-9F	S	TGAGAGGGCACTTCTTTGCT	20 pb		64,0

S: *Primers* de secuenciación; PCR: *Primers* de PCR

* *Primers* tomados de Kolodner *et al.* 1999²⁷⁸.

VII.6 ANEXO VI: SONDAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS MLPA:

VII.6.1 SONDA DEL KIT MLPA P043 APC

Tamaño de la sonda (nt)	Sonda salsa MLPA	Chromosomal position	
		REFERENCIA	APC
64-70-76-82*	Controles DQ: tan solo visibles con cantidades de muestra menor de 100ng.		
94	Sonda sintética Control de ligación		
130	Sonda control 0797-L0463	5q31	
139	APC sonda 1532-L0975		Promotor
148	APC sonda 2065-L1586		Promotor
157	Sonda control 1063-L0061	14q13	
166	APC sonda 1534-L0977		5' UTR
175	APC sonda 1535-L0978		Exón 1
184	Sonda control 1217-L0694	4q34	
193	APC sonda 1536-L0979		Exón 2
202	APC sonda 1537-L0980		Exón 3
211	Sonda control 1344-L0555	9q21	
220	APC sonda 1538-L0981		Exón 4
229	APC sonda 1539-L1337		Exón 5
238	Sonda control 0517-L0097	2q142	
247	APC sonda 1540-L0983		Exón 6
256	APC sonda 1541-L0984		Exón 7
265	Sonda control 0960-L0547	2p12	
274	APC sonda 1542-L0985		Exón 8
283	APC sonda 1773-L1339		Exón 9
292	Sonda control 0990-L0567	11p12	
305	APC sonda 1544-L0987		Exón 10

312	APC sonda 1545-L1338		Exón 11
319	Sonda control 1042-L0791	8q24	
328	APC sonda 1774-L1340		Exón 12
337	APC sonda 1700-L1341		Exón 13
346	Sonda control 2182-L3127	6q26	
355	APC sonda 1548-L0991		Exón 14
364	APC sonda 1549-L0992		Exón 15, principio
373	Sonda control 1085-L0653	14q32	
382	APC sonda 1550-L0993		Exón 15, medio
391	APC sonda 1701-L1469		Exón 15, final
400	Sonda control 0977-L0564	15q31	
409	APC sonda 3323-L2526		Exón 10A (Exón alternativo)
418	APC sonda 3324-L2527		<i>Wildtype</i> para la mutación 1061
427	APC sonda 3325-L2528		<i>Wildtype</i> para la mutación 1309
436	Sonda control 1843-L1408	16p13	

VII.6.2 SONDAS DEL KIT MLPA P003 *MLH1_MSH2*

Longitud de la sonda (nt)	Sondas del MLPA	Posición cromosómica	
		Referencia	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i>
64-70-76-82	Controles DQ: tan solo visibles con cantidades de muestra menor de 100ng.		
88-92-96	Fragmentos-D: Señal baja de los fragmentos de 88 o 96 nt indican desnaturalización incompleta.		
130	Sonda de referencia 0797-L0463	5q31	
136	Sonda de referencia 0981-L0566	10p11	
142	<i>MLH1</i> sonda 0886-L0474		Exón 1
148*	<i>MSH2</i> sonda 1027-L0599		Exón 1
154	<i>MLH1</i> sonda 1008-L0577		Exón 2
160	<i>MSH2</i> sonda 0906-L0494		Exón 2
166	<i>MLH1</i> sonda 0888-L0476		Exón 3
172	<i>MSH2</i> sonda 1029-L0601		Exón 3
178	<i>MLH1</i> sonda 0889-L0477		Exón 4
184	<i>MSH2</i> sonda 0908-L0496		Exón 4
190	<i>MSH2</i> sonda 6343-L5729		Exón 1
196	Sonda de referencia 3861-L3610	3p22	
202	<i>MLH1</i> sonda 0890-L6064		Exón 5
211	<i>MSH2</i> sonda 0909-L0497		Exón 5
220	<i>MLH1</i> sonda 0891-L0479		Exón 6
229	<i>MSH2</i> sonda 0910-L0498		Exón 6
238	<i>MLH1</i> sonda 0892-L0480		Exón 7
247‡	<i>MSH2</i> sonda 0911-L0499		Exón 7
256	<i>MLH1</i> sonda 0893-L0481		Exón 8
265	<i>MSH2</i> sonda 0912-L0582		Exón 8
274	<i>MLH1</i> sonda 0894-L0482		Exón 9
283	Sonda de referencia 0438-L0003	17q21	
292	<i>MSH2</i> sonda 0913-L0583		Exón 9

301	<i>MLH1</i> sonda 0895-L0483		Exón 10
310	<i>MSH2</i> sonda 0914-L0584		Exón 10
319	<i>MLH1</i> sonda 0896-L0484		Exón 11
328	<i>MSH2</i> sonda 0915-L0503		Exón 11
337	<i>MLH1</i> sonda 0897-L0485		Exón 12
346	<i>MSH2</i> sonda 0916-L0504		Exón 12
355	<i>MLH1</i> sonda 0898-L0486		Exón 13
364	<i>MSH2</i> sonda 1013-L0575		Exón 13
373	Sonda de referencia 0681-L0154	4q25	
382	<i>MLH1</i> sonda 0899-L0586		Exón 14
391	<i>MSH2</i> sonda 0918-L0506		Exón 14
400	<i>MLH1</i> sonda 0900-L0488		Exón 15
409	<i>MSH2</i> sonda 0919-L0585		Exón 15
418	<i>MLH1</i> sonda 1009-L0576		Exón 16
427	<i>MSH2</i> sonda 1053-L0627		Exón 16
436	<i>MLH1</i> sonda 1030-L0602		Exón 17
445	<i>MLH1</i> sonda 1031-L0603		Exón 18
454	<i>MLH1</i> sonda 0904-L0492		Exón 19
463	Sonda de referencia 0979-L0568	10p14	
472	Sonda de referencia 0980-L0567	11p12	

VII.6.3 SONDAS DEL KIT MLPA P248 *MLH1-MSH2*

Longitud de la sonda (nt)	Sondas del MLPA	Posición cromosómica		
		Referencia	MLH1	MSH2
64-70-76-82	Controles DQ: tan solo visibles con cantidades de muestra menor de 100ng.			
88-92-96	Fragmentos-D: Señal baja de los fragmentos de 88 o 96 nt indican desnaturalización incompleta.			
130	Sonda de referencia 6296-L05819	2p25		
136	<i>MSH2</i> sonda 7767-L08435			Exón 10
142	<i>MLH1</i> sonda 7748-L07478		Exón 7	
148	<i>MSH2</i> sonda 8661-L09622			Exón 5
154	<i>MLH1</i> sonda 7743-L09356		Exón 2	
160	<i>MSH2</i> sonda 7764-L08433			Exón 7
166	<i>MLH1</i> sonda 1686-L01266		Exón 1	
172	<i>MSH2</i> sonda 0907-L00580			Exón 3
178	<i>MLH1</i> sonda 7752-L07482		Exón 11	
184	<i>MSH2</i> sonda 7760-L09355			Exón 2
190	<i>MSH2</i> sonda 6344-L07711			Exón 1
196	<i>MLH1</i> sonda 8660-L09354		Exón 18	
202	<i>MLH1</i> sonda 7754-L07484		Exón 13	
208	<i>MLH1</i> sonda 7750-L07480		Exón 9	
214	<i>MSH2</i> sonda 7768-L08779			Exón 12
220	<i>MLH1</i> sonda 7755-L08780		Exón 14	
226	Sonda de referencia 3141-L02609	14q22		
232	<i>MLH1</i> sonda 7745-L08781		Exón 4	
238	<i>MSH2</i> sonda 7770-L08782			Exón 15
247	<i>MLH1</i> sonda 7742-L08425		Exón 1	
256	<i>MSH2</i> sonda 7763-L08432			Exón 6
265	<i>MLH1</i> sonda 7756-L07486		Exón 15	
276	<i>MLH1</i> sonda 7741-L08424		Exón 1	

283	<i>MSH2</i> sonda 9140-L00579		Exón 13
289	<i>MSH2</i> sonda 8662-L09357		Exón 8
298	<i>MLH1</i> sonda 7744-L08426		Exón 3
306	<i>MSH2</i> sonda 7769-L07499		Exón 14
314	<i>MLH1</i> sonda 7747-L08783		Exón 6
321	<i>MSH2</i> sonda 9193-L09997		Exón 11
328	KCNK12 sonda 8663-L07501		Exón 2
337	<i>MLH1</i> sonda 7751-L08784		Exón 10
346	LRRFIP2 sonda 7759-L07489		Exón 24
355	<i>MSH2</i> sonda 2735-L02162		Exón 1
360	<i>MLH1</i> sonda 7746-L09624		Exón 5
367	Sonda de referencia 3638-L08334	10q23	
373	<i>MLH1</i> sonda 7749-L08429		Exón 8
382	<i>MLH1</i> sonda 7758-L08431		Exón 19
391	<i>MSH2</i> sonda 7766-L07496		Exón 9
400	<i>MLH1</i> sonda 7753-L08785		Exón 12
409 ¥	<i>MSH2</i> sonda 7761-L07491		Exón 4
418	<i>MLH1</i> sonda 1012-L00574		Exón 16
427	<i>MSH2</i> sonda 0920-L09358		Exón 16
436	<i>MLH1</i> sonda 1007-L00573		Exón 17
445	Sonda de referencia 3207-L02622	3p21	
463 ‡	<i>MLH1</i> sonda 2260-L01747		Exón 1

VII.6.4 SONDAS DEL KIT MLPA P008 *MSH6_PMS2*:

Longitud de la sonda (nt)	Sondas del MLPA	Posición cromosómica				
		<i>MSH6</i>	<i>PMS2</i>	<i>MUTYH</i>	<i>MLH1</i>	OTROS
64-70-76-82	Controles DQ: tan solo visibles con cantidades de muestra menor de 100ng.					
88-92-96	Fragmentos-D: Señal baja de los fragmentos de 88 o 96 nt indican desnaturalización incompleta.					
130	Sonda 0797-L0463				5q31	
136	TACSTD1 sonda 4249-L3604				27 Kb antes del exón 1 de <i>MSH2</i>	
421	<i>MSH6</i> sonda 4243-L3598	Exón 7				
148	<i>MLH1</i> sonda 1685-L1265				Exón 1	
154	<i>PMS2</i> sonda 4661-L4043		Exón 1			
160	<i>MSH6</i> sonda 4244-L3599	Exón 8				
166	<i>MLH1</i> sonda 1686-L1266				Exón 1	
172	<i>MSH6</i> sonda 4245-L4021	Exón 9				
180	<i>PMS2</i> sonda 1176-L4022		Exón 2			
190	TACSTD1 sonda 4248-L3603				15 Kb antes del exón 1 de <i>MSH2</i>	
196	<i>MSH6</i> sonda 4246-L3601	Exón 10				
202	<i>MLH3</i> sonda 1245-L0793				Exón 3	
211	<i>MUTYH</i> sonda 4676-L3352			Exón 14		
220	<i>MLH3</i> sonda 2107-L0794				Exón 10	
229	<i>PMS2</i> sonda 1179-L0740		Exón 5			
238	<i>MSH3</i> sonda 1247-L0795				Exón 1	
247	<i>PMS2</i> sonda 1180-L0741		Exón 6			
256	<i>MSH3</i> sonda 1248-L0899				Exón 8	
265	<i>PMS2</i> sonda 1181-L0742		Exón 7			
274	<i>MSH3</i> sonda 1249-L0797				Exón 20	
283	<i>PMS2</i> sonda 1182-L0743		Exón 8			

292	<i>MUTYH</i> sonda 4677-L3353	Exón 16
301	<i>PMS2</i> sonda 1183-L0744	Exón 9
310	<i>MUTYH</i> sonda 4322-L4024	Exón 1
319	<i>PMS2</i> sonda 1184-L0745	Exón 10
328	<i>MSH6</i> sonda 1250-L0798	Exón 1
337	<i>PMS2</i> sonda 1185-L0900	Exón 11
346	<i>MSH6</i> sonda 4247-L3602	Exón 2
355	<i>MSH2</i> sonda 2735-L2162	Exón 1
364	<i>MSH6</i> sonda 1252-L0902	Exón 4
373	<i>PMS2</i> sonda 4663-L6248	Exón 13
382	<i>MSH6</i> sonda 1253-L0801	Exón 6
391‡	<i>PMS2</i> sonda 1188-L0749	Exón 14
401	<i>MUTYH</i> sonda 4323-L1368	Exón 2
409‡	<i>PMS2</i> sonda 4664-L4046	Exón 15
418	<i>MUTYH</i> sonda 3964-L3351	Exón 3
427	<i>MSH6</i> sonda 1439-L0908	Exón 3
436	<i>PMS2</i> sonda 4662-L4044	Exón 12
445	<i>MSH6</i> sonda 1440-L0909	Exón 5
454	<i>APC</i> sonda 1810-L0984	Exón 7
463	<i>MLH3</i> sonda 4675- L0792	Exón 2

VII.7 ANEXOVII: ESTUDIOS DE cDNA

VII.7.1 PRIMERS DELECIÓN DEL EXON 4 DEL GEN *APC*:

Exón	Primers	Secuencias	Logitud del fragmento amplificado	Tm °c
3 al 6	<i>APC</i> -RT-3F	AAGCCGGGAAGGATCTGTAT	399pb	63,5
	<i>APC</i> -RT-6R	CGAAGTATGTCCTTTTCGATTG		63,3

VII.7.2 PRIMERS DELECIÓN DEL LOS EXONES 4 AL 6 DE *MLH1*:

Exón	Primers	Secuencias	Logitud del fragmento amplificado	Tm °c
3 al 8	<i>MLH1</i> -RT-3AF	TCTGGATATTGTATGTGAAAGG	374pb	58,0
	<i>MLH1</i> -RT-8AR	TCAGCTACTGTCTCTCCTTG		57,2

VII.8 ANEXO VIII: PRIMERS DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL EXÓN 15 DE BRAF:

Exón	Primer	Secuencia: 5'→3'	Longitud del primer	Logitud del fragmento amplificado	Tm °c
15	<i>BRAF-15AF</i>	TCATAATGCTTGCTCTGATAGG	22pb	230pb	63,5
	<i>BRAF-15AR</i>	GGCCAAAATTTAATCAGTGGA	22pb		63,5

VII.9 ANEXO IX: VARIANTES POLIMÓRFICAS DETECTADAS EN LOS GENES APC Y MUTYH EN FAMILIAS GALLEGAS.

* Tabla 23: Variantes polimórficas detectadas en los genes APC y MUTYH.

Gen	Variante	Localización	Nca	FrCa	SNP	MAF ^a	Predicciones <i>in silico</i>				<i>in vitro</i> ^d	C.M ^e (gen)	Categoría patogénica
							PolyPhen ^a	ESE-Finder ^b	Splicing ^c				
									Gen splicer	BDGP			
APC	c.645+32 C>T	IVS5	10/48	20,83%	rs2909961	No validado	ND	-	No	No	No	Si(APC)	Neutra
	c.1458 T>C (p.Tyr486Tyr)	E11	37/48	77,08%	rs2229992	0,392	ND	NR	No	No	No	Si(APC,MUTYH)	Neutra
	c.1635 G>A (p.Ala545Ala)	E13	30/48	62,50%	rs351771	0,397	ND	(+)SPp40	Si	No	No	Si(APC,MUTYH)	Neutra
	c.3949 G>C (p.Glu1317Gln)	E15	4/48	8,33%	rs1801166	No validado	1	(+)SF2/ASF(IgM-BRCA)	No	No	No	Si(MUTYH)	Neutra
	c.4479 G>A (p.Thr1493Thr)	E15	39/48	81,25%	rs41115	0,392	ND	(+)SC35	Si	No	No	Si(APC,MUTYH)	Neutra
	c.5034 G>A (p.Gly1678Gly)	E15	27/48	56,25%	rs42427	0,397	ND	(-)SC35, (+)SF2/ASF(IgM-BRCA)	No	No	No	Si(APC,MUTYH)	Neutra
	c.5265 G>A (p.Ala1755Ala)	E15	3/48	6,25%	rs34506289	0,017	ND	(-)SC35	No	No	No	Si(MUTYH)	Neutra
	c.5268 T>G (p.Ser1756Ser)	E15	26/48	54,17%	rs866006	0,397	ND	NR	No	No	No	Si(APC,MUTYH)	Neutra
	c.5465 T>A (p.Asp1822Val)	E15	16/48	33,33%	rs459552	0,225	1	NR	Si	No	No	Si(APC,MUTYH)	Neutra
	c.5880 G>A (p.Pro1960Pro)	E15	26/48	54,17%	rs465899	0,392	ND	(+)SC35	No	No	No	Si (APC)	Neutra
	c.7201 C>T (p.Leu2401Leu)	E15	3/48	6,25%	rs2229994	0,017	ND	(-)SC35	No	No	No	No	Neutra
MUTYH	c. -83 C>T	5'-UTR	14/38	36,84%	rs28372898	No validado	ND	-	No	No	No	Si (MUTYH)	Neutra
	c. 64 G>A (p.Val22Met)	E2	9/38	23,68%	rs3219484	0,075	1	(-)SF2/ASF	No	No	No	No	Neutra
	c.495+35 G>A	IVS 6	33/38	86,84%	rs3219487	0,092	ND	-	No	No	No	Si(APC)	Neutra
	C.681+21 C>A	IVS 8	3/38	7,89%	No	-	ND	-	No	No	No	No	Neutra
	c.1005 G>C (p.Gln335His)	E12	30/38	78,95%	rs3219489	0,284	1	(+)SC35, (+)SRp40,(+)SF2/ASF	No	No	No	Si(APC)	Neutra
	c.1468-40 G>C	IVS 14	24/38	63,16%	rs3219493	0,043	ND	-	No	No	No	Si(APC,MUTYH)	Neutra
	c.1509+70 G>C	IVS 15	1/38	2,63%	No	-	ND	-	No	No	No	Si(MUTYH)	Neutra

*La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del *GenBank* NM_000038.3 (APC). Las variantes descritas por primera vez en este estudio están destacadas en negrita.

Nca= Número de casos en los que se ha encontrado la variante. FrCa= Frecuencia de la variante en casos. MAF: Frecuencia del alelo menor. ND: No disponible.

^a Predicción con PolyPhen: (1) Benigna, (2) Posiblemente deletérea. (3): Probablemente deletérea.

^b ESE-finder: (+)Génesis de un lugar de unión para proteína SR. (-)Eliminación de un lugar de unión para proteínas SR, NR: No relevante.

^c Predicciones acerca de la alteración del *splicing*.

^d Estudios *in vitro*: SP: Estudios de *splicing* en RNA. N: Neutra. No: No existen estudios.

^e Coocurrencia con mutación deletérea.

VII.10 ANEXO X: VARIANTES POLIMÓRFICAS DETECTADAS EN LOS GENES MMR EN FAMILIAS GALLEGAS.

Tabla 24: Variantes polimórficas detectadas en los genes MLH1, MSH2 y MSH6.*

Gen	Variante	Localización	NCa	FrCa	SNP	MAF	Predicciones <i>in silico</i>				<i>in vitro</i> ^{d(e)}	C.M ^f (gen)	Categoría patogénica.
							PolyPhen ^a	ESE-Finder ^b	Splicing ^c				
									Gen Splicer	BDGP			
MLH1	c.-93 G>A**	5' UTR	4/43	9,30%	rs1800734	0,2	ND	NR	-	-	No	Si(MLH1)	Neutra
	c.453+79 A>G	IVS5	15/43	34,88%	rs4234259	0,276	ND	(+)2SF/SAF	Si	No	No	Si(MLH1)	Neutra
	c.677+72 T>G	IVS 8	7/43	16,28%	NO	-	ND	NR	No	No	No	Si(MLH1)	Neutra
	c.655 A>G (p.Ile219Val)	E8	12/43	27,91%	rs1799977	0,342	1	NR	No	No	No	Si(MLH1)	Neutra
	c.1039-8 T>A.	IVS11	4/43	9,30%	rs9862158	No validado	ND	(-)SRp40	No	No	No	No	Neutra
	c.1039-78 A>G	IVS11	2/43	4,65%	rs11129748	0,475	ND	NR	No	No	No	Si(MLH1)	Neutra
	c.1558+14 G>A	IVS 13	5/43	11,63%	rs41562513	No validado	ND	(-)SC35	No	No	SP/N(1)	Si(MLH1)	Neutra
	c.1668-19 A>G	IVS14	35/43	81,40%	rs9876116	0,05	ND	(-) SRp40, (+)SRp55	No	No	SP/N(1)	Si(MLH1)	Neutra
	c.1731+28 A>C	IVS15	10/43	23,26%	No	-	ND	(+)2SF/SAF	No	No	No	Si(MLH1)	Neutra
c.1989+33 T>C	IVS 17	20/43	46,51%	NO	-	ND	(+) SF2/ASF(IgM-BRCA), (+)SC35	Si	Si	No	No	Neutra	
MSH2	c.211+9 C>G	IVS1	21/43	48,84%	rs2303426	No validado	ND	NR	No	No	No	Si(MSH2)	Neutra
	c.965 G>A (p.Gly322Asp)	E6	1/43	2,33%	rs4987188	0,025	1	NR	No	No	SP/N(1) AM/N(3)	No	Neutra
	c.1077-10 T>C	IVS6	10/43	23,26%	rs17224360	No validado	ND	NR	No	No	MG/N(2)	Si(MSH2)	Neutra
	c.1511-92 G>T	IVS9	20/43	46,51%	rs3732182	0,342	ND	(+)SRp40	Si	Si	No	Si(MSH2)	Neutra
	c.1511-9 A>T	IVS9	6/43	13,95%	rs12998837	0,169	ND	NR	Si	No	MG/N(2)	Si(MSH2)	Neutra
	c.1661+12 G>A	IVS10	20/43	46,51%	rs3732183	0,342	ND	NR	No	No	No	Si(MSH2)	Neutra
	c.1661+90 T>C	10	3/43	6,98%	rs10183143	0,05	ND	(+)SF2/ASF, (+)SF2/ASF IgM-BRCA	Si	No	No	No	Neutra
	c.1760-63 C>T	11	4/43	9,30%	No	-	ND	(+)SRp40	No	No	MG/N(2)	No	Neutra
c.2006-6 T>C	IVS12	9/43	20,93%	rs17218439	No validado	ND	(+)SRp40	No	No	SP/D(2)	Si(MSH2)	Neutra	
c.2005+42 G>T	IVS12	6/43	13,95%	rs17218446	No validado	ND	(-)SRp40	No	No	No	No	Neutra	
MSH6	c.116 G>A (p.Gln39Glu)**	E1	22/43	51,16%	rs1042821	0,2	2	(+)2SF/SAF	No	No	No	No	Neutra
	c.186C>A (p.Arg62Arg)	E1	18/43	41,86%	rs1042820	No validado	ND	NR	No	No	No	No	Neutra
	c.260+22 C>G	IVS1	13/43	30,23%	rs55927047	No validado	ND	(-)SC35, (-) SF2/ASF(IgM-BRCA)	No	No	No	Si(1)	Neutra
	c.261-36 A>G	IVS1	4/43	9,30%	rs1800931	No validado	ND	NR	No	No	No	No	Neutra
	c.276A>G (p.Pro92Pro)	E2	16/43	37,21%	rs1800932	0,225	ND	(+)2SF/SAF	Si	No	No	No	Neutra
	c.457+52 T>A	IVS2	21/43	48,84%	rs3136282	No validado	ND	(-)SRp55	No	No	No	Si(1)	Neutra
	c.458-52 G>T	IVS2	23/43	53,49%	rs1800934	0,167	ND	(+)SRp40	No	No	No	Si(1)	Neutra
	c.540T>C (p.Asp180Asp)	E3	28/43	65,12%	rs1800935	0,341	ND	NR	No	No	No	No	Neutra
	c.627+68 A>G	IVS3	3/43	6,98%	NO	-	ND	NR	Si	No	No	No	Neutra
	c628-56 C>T	IVS3	16/43	37,21%	rs1800936	0,150	ND	NR	No	No	No	Si(1)	Neutra
	c.642 C>T (p.Tyr214Tyr)	E4	12/43	27,91%	rs1800937	0,125	ND	(-)2SF/SAF	No	No	No	No	Neutra
	c.3172+171 C>T	IVS4	3/43	6,98%	rs3136337	0,083		NR	No	No	No	No	Neutra
	c.3173-101 G>C	IVS4	42/43	97,67%	rs2072447	0,225	ND	(-)SC35, (-)SRp55	No	No	No	Si(1)	Neutra
	c.3438+14 A>T	IVS5	28/43	65,12%	rs2020911	0,392	ND	(-)SC35	No	No	No	Si(1)	Neutra
	c.3557-144 G>A	IVS6	36/43	83,72%	rs7562367	No validado	ND	NR	No	No	No	Si(1)	Neutra
	c.3647-56_3647-41delTTTGTGTTAATCC	IVS7	10/43	23,26%	No	-	ND	NR	No	No	No	Si(1)	Neutra
	c.3646+35_3646+38delATCT	IVS7	41/43	95,35%	No	-	ND	NA	No	No	No	Si(1)	Neutra
c.3646+91 T>C,	IVS7	33/43	76,74%	rs3136359	0,292	ND	(+)SRp55	No	No	No	Si(1)	Neutra	
c.3802-41dupT	IVS8	12/43	27,91%	No	-	ND	(-)SRp40	Si	Si	No	No	Neutra	
c.3802-40 G>C	IVS8	19/43	44,19%	rs34530700	0,05	ND	(-)SRp40, (+)SC35	No	No	No	No	Neutra	

*La nomenclatura de las mutaciones se ha realizado utilizando como secuencias de referencia del GenBank (MLH1), NM_000251.1 (MSH2), NM_000179.1 (MSH6). Las nuevas variantes descritas se encuentran en negrita. MAF: Frecuencia del alelo menor en población Europea-Ceu. **Alelo de baja penetrancia. Nca= Número de casos en los que se ha encontrado la variante. FrCa= Frecuencia de la variante en casos. MAF: Frecuencia del alelo menor. ND: No disponible.

^a Predicción con PolyPhen: (1) Benigna, (2) Posiblemente deletérea. (3): Probablemente deletérea.

^b ESE-finder: (+)Génesis de un lugar de unión para proteína SR. (-)Eliminación de un lugar de unión para proteínas SR, NR: No relevante.

^c Predicciones acerca de la alteración del *splicing*.

^d Estudios *in vitro*: MA: Análisis basados en aproximaciones múltiples. MG: Minigén. N: Neutra. D: Deletérea. No existen estudios.

^e Referencias : (1): Auclair *et al.* 2006²⁶⁶. (2): Tournier *et al.* 2008³¹⁹. (3) Barneston *et al.* 2008³¹⁸.

^f CM: Coocurrencia con mutación deletérea.

VII.11 ANEXO XI: ARTÍCULOS.

VII.11.1 Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? (Artículo aceptado en BMC Medical Genetics).

Nuria Gómez-Fernández¹, Sergi Castellví-Bel², Ceres Fernández-Rozadilla¹, Francesc Balaguer², Jenifer Muñoz¹, Irene Madrigal³, Montserrat Milà³, Begoña Graña⁴, Ana Vega¹, Antoni Castells², Angel Carracedo¹, Clara Ruiz-Ponte^{1§}

¹ Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX)-SERGAS, Grupo de Medicina Xenómica (GMX)-USC, CIBERER, Santiago de Compostela, Galicia, Spain.

² Departamento de Gastroenterología, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clínic, CIBEREHD, IDIBAPS, Barcelona, Catalonia, Spain.

³ Departamento de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERER, Barcelona, Catalonia, Spain.

⁴ Servicio de Oncología Médica. Hospital Clínico-CHUS. Santiago de Compostela, Galicia, Spain.

[§]Corresponding author

Abstract

Background: Familial adenomatous polyposis (FAP) is an autosomal dominant-inherited colorectal cancer syndrome caused by germline mutations in the *APC* gene. Recently, patients with multiple colorectal adenomas and also patients with FAP but without detectable germline *APC* mutations have been found to carry biallelic mutations in *MUTYH*. The aim of this work is therefore to analyse the contribution of germline mutations in *APC* and *MUTYH* genes in FAP families from two Spanish populations.

Methods: We analysed the mutational spectrum of the *APC* gene in 82 unrelated patients (48 Galician and 34 Catalanian) with classical or attenuated FAP, and also the contribution of *MUTYH* germline mutations in those *APC*-negative patients. Mutation analysis was performed by several methods including direct sequencing of each exon and their adjacent intronic regions, SSCP and TaqMan genotyping. Screening for large rearrangements of the *APC* gene was carried out by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA).

Results: Germline mutations including large deletions in the *APC* gene were found in 39% of patients. Seven novel mutations were reported despite the great number of genetic variants described so far in this gene. The two most common hotspots at codons 1061 and 1309 of the *APC* gene account for 9,4% of the *APC*-positive families, but are underrepresented in Galician samples: The mutation at codon 1061 was not found in 19 *APC*-positive Galician families but represents the 23% (3 /13) of the Catalanian positive families. The same trend was observed for the codon 1309 mutation, twenty percent of the *APC*-negative patients carried biallelic *MUTYH* germline mutations. New genetic variants were observed as well as the two most frequent mutations reported (p.Tyr165Cys and p.Gly382Asp). In contrast to *APC* mutation carriers, families with biallelic germline mutations in *MUTYH* showed an attenuated polyposis phenotype, generally without extracolonic manifestations.

Conclusions: The results we present should indicate that in Galician patients the frequency of the two hotspots mutations in *APC* differs from the Catalanian and also other Caucasian populations. Similar results had been already observed in a previous study with FAP Galician families and could be due to the genetic isolation of this population. *MUTYH* analysis is recommended for all *APC* negative families even if a recessive inheritance is not confirmed.

Background

Familial adenomatous polyposis (FAP; OMIM#175100) is a rare autosomal dominant colorectal cancer predisposition syndrome characterized by the presence of hundreds to thousands of adenomatous polyps in the colon and rectum from an early age. In the absence of prophylactic surgery, colorectal cancer (CRC) is the inevitable consequence of FAP. Extracolonic manifestations such as osteomas, congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium (CHRPE), desmoid tumors, sebaceous cysts, hepatoblastoma, upper gastrointestinal tumors or thyroid carcinoma are also associated with FAP [1]. Attenuated FAP (AFAP) is a clinical variant characterized by the presence of fewer than 100 colonic polyps, and often has a later age of onset of polyposis and CRC [2].

The genetic basis of most cases of FAP is a germline mutation of the adenomatous polyposis coli (*APC*) gene (5q21), which encodes a tumor suppressor protein involved in regulation of cell proliferation and chromosome segregation [3]. About 90% of the germline mutations in FAP result in truncation of the *APC* protein and are mainly located within exon 15[4]. In AFAP, germline mutations have been generally detected in the 5' end, exon 9 and 3' end of the gene [5].

It is known that *APC* germline mutations are not present in approximately 10-30% of FAP patients and in up to 90% of AFAP patients [6]. Recently, patients with multiple colorectal adenomas and also patients with FAP but without detectable germline *APC* mutations have been found to carry biallelic mutations in the base-excision-repair gene *MUTYH* (*MUTYH*) [7]. *MUTYH* takes part in the base excision repair (BER) pathway, which is necessary to repair DNA damage caused by reactive oxygen species. The DNA glycosylase *MUTYH* removes adenines from mispairs with 8-oxoguanine that occur during replications of oxidized DNA. Failure to correct these mispairs consequently leads to G:C→T:A transversion mutations in tumors that resulted in the discovery of *MUTYH*-associated polyposis (MAP) which shows an autosomal recessive inheritance pattern [8]. Two mutational hotspots were identified in the *MUTYH* gene, p.Tyr165Cys and p.Gly382Asp corresponding to approximately 78% of the mutations identified in affected Caucasians [9].

In this study, we examined the mutational spectrum of the *APC* gene in patients with polyposis from two Spanish populations, and also we analysed the contribution of *MUTYH* germline mutations in those *APC*-negative patients.

Methods

Families and Patients

The sample studied consisted of 82 unrelated cases with classical familial adenomatous polyposis (FAP) (>100 colorectal adenomas) or attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP) (15/10-100 colorectal adenomas). Forty-eight out of 82 were referred from various health centers in Galicia (NW Spain) for mutation analysis at the Galician Public Foundation of Genomic Medicine (FPGMX) while the remainder were attended in the at-risk clinic for CRC of the Hospital Clinic in Barcelona (CAR-CCR).

Written informed consent was obtained for each patient before mutation analysis. All patients were analysed for germline *APC* mutations, and only those without detectable germline *APC* mutations were investigated for *MUTYH* mutations. Some of the families analysed for *MUTYH* had been included in a previous article [10].

Clinical characteristics including onset age, number of adenomas, colorectal cancer diagnosis, extracolonic diseases if present, and presence or absence of family history, are depicted for patients with detected mutations in tables 1 (*APC*) and 2 (*MUTYH*).

Genomic DNA was obtained from peripheral blood using the Wizard DNA extraction kit (Promega, Madison, WI) for Galician samples and the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) for Catalanian samples, according to the manufacturer's instructions.

Analysis of the APC gene

Sequence variants

The whole coding sequence and the exon-intron boundaries of the *APC* gene were amplified, using for exon 15 the previously described primers and PCR conditions [10]. For exons 1-14 new primers covering larger sequences around exon-intron boundaries were designed using the *Primer3* software [11]. For these new designs, primer details and PCR conditions are available on request.

Galician samples were analysed by complete sequencing of each exon and their adjacent intronic regions at the FPGMX. For the Catalonian samples, single strand conformational polymorphism analysis (SSCP) was performed at Hospital Clinic as an initial screening, as previously described [12]. For the SSCP analysis, amplified products larger than 350 bp were digested with a suitable restriction enzyme before being analyzed by this technique. Any fragment showing a mobility shift was amplified and directly sequenced in order to identify the variant.

Direct DNA sequencing was performed in forward and reverse orientations using the BigDye terminator v.3.1. cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Genomic rearrangements

Large genomic rearrangements of the *APC* gene were evaluated by means of the *APC* multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) test [13] and performed according to the supplied protocol (SALSA MLPA KIT P043 APC, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). The amplicons were analyzed in an ABI 3730 sequencer using GeneMapper v3.7 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Peak heights of each fragment were compared to those of a control sample and deletions or duplications were suspected when peak height differed by more than 30%. Control DNA samples with known genomic rearrangements in *APC* were available and included in each batch of experiments. Positive results of large rearrangements were repeated in an independent assay and subsequently confirmed by other methods (FISH, cDNA analysis).

APC FISH

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis was performed with RP11-3B10 and RP11-619D06 clones mapping in 5q21-q22. BAC clones were purchased from the BAC/PAC Resources of the Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI, Oakland, CA). Equal amounts of BAC DNA (200 ng) were labelled with Spectrum Orange (RP11-3B10) or Spectrum Green (RP11-619D06) by a standard nick-translation (Vysis, Downers Grove, IL, USA). This dual color probe was used to hybridize preparations of fixed cell nuclei and metaphases. Slides were visualized under an epifluorescence microscope (Leica DMRXA). Images were captured by using a COHU camera and analyzed with the Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK).

RT-PCR

mRNA was isolated from blood using RNeasy[®]Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Synthesis of complementary DNA (cDNA) was performed with SuperScript[™] II Reverse Transcriptase

(Invitrogen, Carlsbad, USA). Amplification of cDNA was performed with primers located in the adjacent exons to those exonic regions potentially deleted. Amplification products were sequenced in an ABI3730. Control cDNA was always included.

Analysis of the MUTYH gene

In all patients without detectable pathogenic mutations in *APC*, the coding sequence and the exon-intron boundaries of *MUTYH* were amplified using primers designed with the Primer3 software [11]. As for the *APC* gene, primer details and PCR conditions are available on request.

The fragments obtained were analysed for sequence variants using a combination of different methods: the Galician samples were analysed at the FPGMX center by completely sequencing each exon of *MUTYH*, as described for the *APC* gene (see above), whereas real-time PCR using Taqman probes and SSCP analysis (see above) were performed in Catalanian samples at the Hospital Clinic. TaqMan genotyping included the analysis of the two most common mutations found to date in the *MUTYH* gene, p.Tyr165Cys and p.Gly382Asp, as well as for the two rare mutations c.1103delC and c.1186_1187insGG identified in our previous *MUTYH* study [14] by allelic discrimination using allele-specific TaqMan probes and resolved on a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Mutation nomenclature

It follows the guidelines proposed by Human Genome Sequence Variation (HGSV) and is referred to the cDNA sequences of *APC* (NM_000038) and *MUTYH* (U63329).

All mutations were confirmed in two independent DNA extractions.

Variants of Unknown Significance (VUS)

In order to estimate the frequency of VUS, we examined 100 chromosomes from control individuals with no personal or family history of colorectal cancer. Analysis of VUS were carried out by direct DNA sequencing (see above).

Polyphen was used to test the potential role of missense variants. This prediction program is based on observed substitutions of the residues in homologous proteins [15].

Results and Discussion

APC Mutations

In this study germline mutations in *APC* were found in 39% Spanish patients with FAP (32 out of 82), frameshift and nonsense mutations being the most frequently identified. Clinical features displayed by *APC*-positive patients are also shown (Table 1). In spite of the great number of genetic variants described to date in the *APC* gene, we report to our knowledge seven novel pathogenic mutations and two novel unclassified variants (VUs).

Five new frameshift mutations: c.147_150delACAA (p.Lys49AsnfsX20), c.2900delT (p.Val967AlafsX13), c.2934_2935delAA (p.Gln978HisfsX6), c.3531delT(I1177MfsX5) and c.4219_4220delAG (p.Ser1407XfsX1) are deletions of few nucleotides, i.e. from 1 to 4, that give

rise to premature stop codons (X) which would lead to truncated APC proteins. Two novel nonsense mutations: c.1402 G>T (p.Glu468X) and c.3329C>A (p.Ser110X) generate premature stop codons (X) that would originate truncated APC proteins.

The two new VUS: c.3165A>G (p.Ile1055Met) and c.357G>C (p.Arg1786Thr), were also identified in Galician patients. Patients with these *APC* variants displayed an attenuated FAP phenotype with an onset age around forties. These two variants were not detected when we genotyped 100 chromosomes from a healthy control population. However, the absence of these missense variants from the control group cannot be taken as prove of a deleterious effect. *In silico* studies using Polyphen revealed the p.Arg1786Thr as “possibly damaging”, while the p.Ile1055Met was reported as benign. In these families it was not possible to study the co-segregation of the two variants with the disease, so further functional studies are necessary to consider them deleterious.

By MLPA, large genomic deletions were found to be present in 11% (5/56) of families that tested *APC* mutation-negative by conventional techniques. This frequency is consistent with published data that comprise a range between 8-12% for large rearrangements [17, 26, 27]

Three different deletions in *APC* were detected in 6 families, and further confirmed by other methods: two exon 4 deletions that were verified in cDNA studies (Fig. 1); an exon 1-15 deletion and 3 whole gene deletions including the promoter regions that were all corroborated by FISH analysis (Figure 2). As previously described, carriers of whole allelic deletions displayed a severe polyposis phenotype with an early onset of symptoms. A correlation between site of mutation and clinical phenotype was also observed for the seven new mutations described (Table 1). Specifically, mutations occurring at the beginning and middle of exon 15 are generally associated with a more severe phenotype than those located at the 5' and 3' bound of the gene [28]. However phenotypic differences about number of adenomas and extracolonic disease were observed in unrelated probands with the same *APC* mutation. This phenotypic heterogeneity was observed for the p.Lys1061LysfsX2 and the whole gene deletions detected in patients CAT-12 and GAL-16 (Table 1), and it suggests that modifier genes, epigenetic mechanisms or environment could modulate FAP phenotype. There is good evidence, from humans and particularly from mouse models, for the involvement of modifier genes which influence the severity of FAP. It is known that same sex siblings in their early twenties often show phenotypic differences which cannot easily be explained except by the action of modifier genes [29]. Despite those findings, further clinical information and an accurate follow-up of patients is necessary to confirm our results.

The two commonest hotspots at codons 1061 and 1309 of the *APC* gene, account in this study for 9.4% of the *APC*-positive families. However, they were reported mainly in Catalonian families. Mutation at codon 1061 was detected in 5 out of 13 Catalonian positive families (23%), whereas it was not found in 19 *APC*-positive Galician families. A similar trend was observed for the deletion at codon 1309: 15% (2/13) for Catalonian vs 5,2% (1/19) for Galician patients. Considering that these two hotspots account, respectively, for about 8% and 20% of *APC*-positive families [30], it is remarkable the lower frequencies observed in the Galician FAP families. Similar results had been already observed in a previous study where 17

unrelated Galician patients were analysed, but in that study (6 *APC*-positive families out of 17) was not possible to establish whether the inability to detect the recurrent mutations at codons 1061 and 1309 actually reflected an underrepresentation of these genetic variations in the population considered, or was simply due to a sampling bias [10]. Taking all the data available from the Galician FAP patients together, the frequency observed for the 1309 deletion is 4.3% (1/23 *APC*-positive), while it was 0% for the deletion at codon 1061.

Although there is plenty of evidence that the mutational spectrum of the *APC* gene varies in different populations, these two recurrent hotspots are mainly reported worldwide, being the 5bp deletion at codon 1309 the most common germline mutation [31]. Interestingly, a frequency range for the 1309 mutation in different countries has also been described: a high proportion in Japan (14%), a moderate frequency in most European populations (6-5%), and no 1309 deletions detected in Australia (0% out of 27 *APC*-positive families) [32]. Recently, it was reported in 46 Czech and Slovak *APC*-positive families that the frequency of the deletion at codon 1061 was lower (3%) than referred data [33].

The variation in the distribution of these hotspots could presumably be caused by an ascertainment bias, but in isolated populations it could be explained by a founder effect. For instance, in the Balearic Islands where the hotspot at codon 1061 is overrepresented (50%), the haplotype analysis of the families sharing this deletion was consistent for the presence of a founder effect [34]. The recurrence of these two mutations has been linked to the molecular characteristic of the DNA region around codons 1061 and 1309, rather than with specific haplotypes. These two codons are located within a short hypermutable polyA repeat that may associate with an increased probability of DNA polymerase slippage during DNA replication leading to an overrepresentation of deletions. The high incidence of the 1309 deletion among *de novo* cases and the fact that this alteration was found to segregate with different haplotypes associated with the disease support this hypothesis [32].

It is known that gene diversity in the Galician population is generally lower than other European populations, as a result of its relative isolation from the rest of the Iberian Peninsula and high emigration rates during the last two centuries [35, 36]. This genetic characteristic of the Galician population would have provoked the selection of possibly not yet identified allelic variants in DNA repair genes. Hypothetically, those variants may subsequently repair more efficiently the DNA polymerase slippage caused by the repetitive sequences around codons 1061 and 1309 during replication. Therefore, lower frequencies for these two *APC* hotspots should be observed. Founder effects have been already observed in the Galician population for some genetic diseases, including *BRCA1* in familial breast cancer [37].

***MUTYH* mutations**

We also investigated the contribution of *MUTYH* germline mutations in those *APC*-negative patients and found that about 20% of those patients carried biallelic *MUTYH* germline mutations. Data obtained are consistent with previous results [38, 39].

Table 2 shows that the two most frequent mutations reported to date (p.Tyr165Cys and p.Gly382Asp) were detected. The frequency of these alleles among our *MUTYH* polyposis patients was 71%. This observation is compatible to what has been described in previous

studies [9,42]. Other mutations were found such as the c.1186_1187insGG which accounts for 21% of the mutant alleles reported. This mutations was previously reported in Portuguese families with a frequency similar to that found in our samples [41].

Biallelic *MUTYH* carriers displayed an attenuated polyposis phenotype without extracolonic manifestations, with the exception of one patient who showed breast cancer at 59 years and CRC at 69 (Table 2). It is noteworthy that the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor proteins participate in the base excision repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) lesions [43]. Accordingly, loss of BER function owing to biallelic *MUTYH* mutations may underlie breast cancer risk. In Dutch MAP patients, breast cancer occurred in 18% of female, significantly more than the expected from national statistics. This observed increased breast cancer risk should be thoroughly investigated [40].

The mean age at diagnosis of MAP was 49 years ranging from 39 to 69 (Table 2). In contrast FAP patients showed a disease onset 10-20 years earlier (mean age 32, ranging from 17 to 64) (Table 1). As previously reported, it appears that disease symptoms in MAP are not as severe as those observed in *APC* driven FAP and that they resemble an attenuated polyposis phenotype [8].

Two new VUS were identified in one patient who displayed multiple adenomas (50-60) and CRC at 53 years, without family history of polyposis. The new variants found were the c.269A>G (p.Tyr90Cys) and the c.508C>T (p.Arg170Trp) [c.302A>G (p.Tyr101Cys) and c.541C>T (p. Arg181Trp) following the reference sequence NM_012222]. They were not detected when 100 control chromosomes were analysed and Polyphen data revealed these two variants as “probably damaging”. However, functional studies are necessary to assess if these two variants are deleterious.

Biallelic mutations of *MUTYH* have been consistently linked to an increased risk of CRC. However, the increase in risk in monoallelic *MUTYH* carriers remains controversial. Balaguer *et al.* used a meta-analysis of published case-control studies and concluded that monoallelic *MUTYH* carriers were not at increased risk for CRC, although, a monoallelic effect of borderline statistical significance was observed for the p.Tyr165Cys [14]. In the present study, monoallelic changes with predicted functional relevance (p.Tyr165Cys, p.Gly382Asp, p.Val232Phe) were found in 3/32 patients and account for 9% of cases but were not included as positive families within the overall data. The p.Val232Phe was recently shown to reduce glycosylase activity [44].

New genetic variants found in monoallelic carriers were not detected when 100 chromosomes from a healthy control population were genotyped: c.1-56 G>C, c.39 C>T (p.Ala13Ala), and c.762 G>A (p.Gln254Gln). The unclassified variant p.Arg412Cys, previously reported by Aceto *et al.*, was also found in one monoallelic carrier, it is predicted by Polyphen as “possibly damaging” and it was not detected in our healthy controls.

As expected, most of the bilallelic *MUTYH* carriers were identified in families with an autosomal recessive mode of inheritance or in cases with apparent sporadic presentation. However, we identified two cases with a family history of vertical transmission of CRC, similar results had been already described [45].

Conclusions

Our mutation detection rate for the *APC* gene (39%) is consistent with previous reports. Using standard methods of mutation analysis, such as sequencing, 11% of the classical FAP patients would not have been detected, so analysis of large rearrangements of the *APC* gene is strongly recommended. A genotype-phenotype correlation was found for most of the *APC* identified mutations, although the inter-family phenotypic variability observed would suggest the existence of genetic and/or environmental modifiers.

However, our data regarding the incidence of the 1309 and 1061 deletions in *APC* could indicate that in Galician patients the frequency of these two hotspots mutations is underrepresented and differs substantially from the Catalanian and also from other Caucasian populations. This phenomenon could be due to the genetic isolation of the Galician population.

Biallelic germline mutations in *MUTYH* account for 20% of the families analysed that displayed an attenuated polyposis with a higher age of onset. We observed in two patients that a family history of vertical transmission of CRC did not rule out the possibility of biallelic *MUTYH* mutations.

In summary, the overall results resemble those previously published and confirm that large rearrangements represent an important percentage of *APC* germline mutations. *MUTYH* analysis is recommended for all *APC* negative families even if a recessive inheritance is not confirmed. In Galician patients the lower frequency observed for the two hotspots of *APC* has probably lead to a major heterogeneity of *APC* mutations in this population. From a molecular point of view, these findings have important implications for the design of mutation detection strategies in Galician FAP families.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NGF carried out the molecular genetic analysis in the Galician samples, mainly the analysis of large rearrangements in *APC* and sequencing of *MUTYH*, and participated in the design of the study. SCB and MM carried out the molecular genetic analysis in the Catalanian samples, mainly the analysis of large rearrangements in *APC* and sequencing of *MUTYH*, participated in the design of the study, and helped to draft and revise the manuscript. CF carried out sequencing and analysis of *APC* in Galician samples. JM and IM carried out the molecular genetic analysis in the Catalanian samples, mainly the analysis of large rearrangements in *APC*, FISH analysis of the *APC* gene and sequencing of *MUTYH*. ACas, FB and BG gathered clinical information. A Cas, AV and ACar helped to draft and revise the manuscript. CRP conceived the study, participated in its design and coordination, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 05/2031, 04/1126, 05/0071, 08/0025, 08/1276), Xunta de Galicia (PGIDIT07PXIB9101209PR), Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (to CRP and SCB), Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 07-64873), Asociación Española contra el Cáncer, Fundación Olga Torres (SCB), Acción Transversal contra el Cáncer (Instituto de Salud Carlos III) and Axudas para a intensificación da actividade investigadora dos profesionais dos centros do sistema sanitario público de Galicia RHI07/04 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia) to CRP. CIBERER and CIBEREHD are funded by the Instituto de Salud Carlos III. NGF is supported by a Maria Barbeito's Fellowship from Xunta de Galicia, SCB is supported by a contract from the Fondo de Investigación Sanitaria (CP 03-0070, Ministerio de Sanidad), CF has obtained a FPU' Fellowship from the Ministerio de Educacion, FB received a research grant from Fundacion Caja Madrid, and IM is supported by a contract from the CIBERER.

We thank Maria Magdalena, Olga Lortes, Eva Fernández and Lourdes Costa-Boix for the excellent technical assistance carried out with the Galician samples.

We also thank the following hospitals for providing blood samples: Surgery and Oncology Departments from Hospital Clínico de Santiago, Oncology Department from Complejo Hospitalario de Pontevedra, Digestive Departments from Hospital Xeral Cíes de Vigo and Complejo Hospitalario de Ourense, Digestive and Oncology Departments from Hospital Xeral Calde de Lugo, Medicine Department from Hospital da Costa de Burela (Lugo).

References

1. M. Sieber O, P. Tomlinson I, Lamlum H: The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor-genetics, function and disease. *Molecular Medicine Today* 2000, 6(12):462-469.
2. Knudsen AL, Bisgaard ML, Bulow S: Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Familial Cancer* 2003, 2(1):43-55.
3. Lustig B, Behrens J: The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2003, 129(4):199-221.
4. Beroud C, Soussi T: APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Research* 1996, 24(1):121-124.
5. Soravia C, Berk T, Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, Cohen Z, Bapat B: Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *American Journal of Human Genetics* 1998, 62(6):1290-1301.
6. Armstrong JG, Davies DR, Guy SP, Frayling IM, Evans DG: APC mutations in familial adenomatous polyposis families in the Northwest of England. *Human Mutation* 1997, 10(5):376-380.
7. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR *et al*: Inherited variants of MYH associated with somatic G:C->T:A mutations in colorectal tumors. *Nature Genetics* 2002, 30(2):227-232.

8. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV *et al*: Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *The New England Journal of Medicine* 2003, 348(9):791-799.
9. Marra G, Jiricny J: Multiple Colorectal Adenomas-Is Their Number Up? *New England Journal of Medicine* 2003, 348(9):845-847.
10. Ruiz-Ponte C, Vega A, Carracedo A, Barros F: Mutation analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in northwest Spanish patients with familial adenomatous polyposis (FAP) and sporadic colorectal cancer. *Human Mutation* 2001, 18(4):355.
11. Primer3 Software. [<http://frodo.wim.edu/primer3/input.htm>].
12. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989, 86(8):2766-2770.
13. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijjer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 2002, 30(12):e57.
14. Balaguer F, CastellvBel S, Castells A, Andreu M, Muoz J, Gisbert JP, Llor X, Jover R, de Cid R, Gonzalo V: Identification of MYH Mutation Carriers in Colorectal Cancer: A Multicenter, Case-Control, Population-Based Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2007, 5(3):379-387.
15. Polyphen:prediction of functional effect of human nsSNPs [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>].
16. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA: Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *American Journal of Medical Genetics* 1986, 25(3):473-476.
17. Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Propping P, Friedl W: Large submicroscopic genomic APC deletions are a common cause of typical familial adenomatous polyposis. *Journal of Medical Genetics* 2005, 42(2):185-192.
18. Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, Clark S, Johnson V, Bell J, Frayling I, Efstathiou J, Pack K, Payne S *et al*: The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nature Medicine* 1999, 5(9):1071-1075.
19. Giarola M, Stagi L, Presciuttini S, Mondini P, Radice MT, Sala P, Pierotti MA, Bertario L, Radice P: Screening for mutations of the APC gene in 66 Italian familial adenomatous polyposis patients: evidence for phenotypic differences in cases with and without identified mutation. *Human Mutation* 1999, 13(2):116-123.
20. Vandrovцова J, Stekrova J, Kebrdlova V, Kohoutova M: Molecular analysis of the APC and MYH genes in Czech families affected by FAP or multiple adenomas: 13 novel mutations. *Human Mutation* 2004, 23(4):397.
21. Nagase H, Miyoshi Y, Horii A, Aoki T, Petersen GM, Vogelstein B, Maher E, Ogawa M, Maruyama M, Utsunomiya J: Screening for germ-line mutations in familial adenomatous polyposis patients: 61 new patients and a summary of 150 unrelated patients. *Human Mutation* 1992, 1(6):467-473.
22. Dobbie Z, Spycher M, Mary JL, Haner M, Guldenschuh I, Hurliman R, Amman R, Roth J, Muller H, Scott RJ: Correlation between the development of extracolonic manifestations in FAP patients and mutations beyond codon 1403 in the APC gene. *Journal of Medical Genetics* 1996, 33(4):274-280.
23. Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, Nishisho I, Horii A, Miki Y, Mori T, Utsunomiya J, Baba S, Petersen G: Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992, 89(10):4452-4456.

24. Won YJ, Park KJ, Kwon HJ, Lee JH, Kim JH, Kim YJ, Chun SH, Han HJ, Park JG: Germline mutations of the APC gene in Korean familial adenomatous polyposis patients. *Journal of Human Genetics* 1999, 44(2):103-108.
25. Li G, Tamura K, Yamamoto Y, Sashio H, Utsunomiya J, Yamamura T, Shimoyama T, Furuyama J: Molecular and clinical study of familial adenomatous polyposis for genetic testing and management. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 1999, 18(4):519-529.
26. Sieber OM, Lamlum H, Crabtree MD, Rowan AJ, Barclay E, Lipton L, Hodgson S, Thomas HJ, Neale K, Phillips RK *et al*: Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas. *Proceedings of the National Academy* 2002, 99(5):2954-2958.
27. Michils G, Tejpar S, Thoelen R, van Cutsem E, Vermeesch JR, Fryns JP, Legius E, Matthijs G: Large deletions of the APC gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): a Belgian study. *Human mutation* 2005, 25(2):125-134.
28. Nieuwenhuis MH, Vasen HFA: Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature. *Critical Reviews in Oncology and Hematology* 2007, 61(2):153-161.
29. Tomlinson IP, Neale K, Talbot IC, Spigelman AD, Williams CB, Phillips RK, Bodmer WF: A modifying locus for familial adenomatous polyposis may be present on chromosome 1p35-p36. *Journal of Medical Genetics* 1996, 33(4):268-273.
30. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF: The ABC of APC. *Human Molecular Genetics* 2001, 10(7):721-733.
31. Goss KH, Groden J: Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *Journal of Clinical Oncology* 2000, 18(9):1967-1979.
32. Aretz S, Uhlhaas S, Caspari R, Mangold E, Pagenstecher C, Propping P, Friedl W: Frequency and parental origin of de novo APC mutations in familial adenomatous polyposis. *European Journal of Human Genetics* 2004, 12(1):52-58.
33. Stekrova J, Sulova M, Kebrdlova V, Zidkova K, Kotlas J, Ilencikova D, Vesela K, Kohoutova M: Novel APC mutations in Czech and Slovak FAP families: clinical and genetic aspects. *BMC Medical Genetics* 2007, 8:16.
34. Gonzalez S, Blanco I, Campos O, Julia M, Reyes J, Llompart A, Cabeza E, Germa JR, Obrador A, Capella G: Founder mutation in familial adenomatous polyposis (FAP) in the Balearic Islands. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2005, 158(1):70-74.
35. Salas A, Comas D, Lareu MV, Bertranpetit J, Carracedo A: mtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *European Journal of Human Genetics* 1998, 6(4):365-375.
36. Salas A, Lareu V, Calafell F, Bertranpetit J, Carracedo A: mtDNA hypervariable region II (HVII) sequences in human evolution studies. *European Journal of Human Genetics* 2000, 8(12):964-974.
37. Vega A, Torres M, Martinez JI, Ruiz-Ponte C, Barros F, Carracedo A: Analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast and breast/ovarian cancer families shows population substructure in the Iberian peninsula. *Annals of Human Genetics* 2002, 66(1):29-36.
38. Nielsen M, Hes FJ, Nagengast FM, Weiss MM, Mathus-Vliegen EM, Morreau H, Breuning MH, Wijnen JT, Tops CM, Vasen HF: Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis. *Clinical Genetics* 2007, 71(5):427-433.

-
39. Kairupan CF, Meldrum CJ, Crooks R, Milward EA, Spigelman AD, Burgess B, Groombridge C, Kirk J, Tucker K, Ward R *et al*: Mutation analysis of the MYH gene in an Australian series of colorectal polyposis patients with or without germline APC mutations. *International Journal of Cancer* 2005, 116(1):73-77.
 40. Nielsen M, Franken PF, Reinards TH, Weiss MM, Wagner A, van der Klift H, Kloosterman S, Houwing-Duistermaat JJ, Aalfs CM, Ausems MG *et al*: Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP). *Journal of Medical Genetics* 2005, 42(9):e54.
 41. Isidro G, Laranjeira F, Pires A, Leite J, Regateiro F, Castro e Sousa F, Soares J, Castro C, Giria J, Brito MJ *et al*: Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Human Mutation* 2004, 24(4):353-354.
 42. Lipton L, Tomlinson I: The multiple colorectal adenoma phenotype and MYH, a base excision repair gene. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2004, 2(8):633-638.
 43. Le Page F, Randrianarison V, Marot D, Cabannes J, Perricaudet M, Feunteun J, Sarasin A: BRCA1 and BRCA2 Are Necessary for the Transcription-Coupled Repair of the Oxidative 8-Oxoguanine Lesion in Human Cells 1. *Cancer Research* 2000, 60(19):5548-5552.
 44. Bai H, Jones S, Guan X, Wilson TM, Sampson JR, Cheadle JP, Lu AL: Functional characterization of two human MutY homolog (hMYH) missense mutations (R227W and V232F) that lie within the putative hMSH6 binding domain and are associated with hMYH polyposis. *Nucleic Acids Research* 2005, 33(2):597-604.
 45. Riegert-Johnson DL, Johnson RA, Rabe KG, Wang L, Thomas B, Baudhuin LM, Thibodeau SN, Boardman LA: The Value of MUTYH Testing in Patients with Early Onset Microsatellite Stable Colorectal Cancer Referred for Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer Syndrome Testing. *Genetic Testing* 2007, 11(4):361-366.

Tables:**Table 1 - Phenotypic features and germline mutations identified in APC-positive patients.**

Patient ID	Age of onset	Number of Adenomas	CRC	E.D.	Family history. (age at diagnosis)	Mutation	Exon	Ref
GAL-27	42	>100	No	No	Father: CRC(36) Grandmother: CRC(60)	Whole deletion	Whole	[16]
GAL-16	23	100	No	DT,OST	NA	Whole deletion	Whole	[16]
GAL-14	20	>100	No	?	No	c. 1-?_8532+?del	1-15	[17]
GAL-07	50	15	No	No	Affected mother (?)	c.147-150del/ACAA (p.Lys49AsnfsX20)	2	This study
GAL-15	33	>100	No	?	No	c.423-?_531+?del	4	[5]
GAL-11	41	>100	Yes	No	Father :CRC (?)	c.646C>T (p.Arg216X)	6	[18]
GAL-26	15	>100	No	No	Father : FAP+CRC (47)	c.646 C>T (p.Arg216X)	6	[18]
GAL-09	33	12	No	No	No	c.994C>T (p.Arg332X)	9	[5]
GAL-10	64	50	Yes	No	Mother: CRC (68) Aunt: CRC (60)	c.1072C>T (p.Gln358X)	9	[19]
GAL-19	NA	20-50	No	No	Mother : CRC (46)	c.1402 G>T (p.Glu468X)	10	This study
GAL-13	20	>100	Yes	No	No	c.1620_1621dupA (p.Gln541ThrfsX19)	12	[20]
GAL-18	33	>50	No	No	Father: CRC (42)	c.1682dupA (p.Thr562AsnfsX19)	13	[10]
GAL-02	30	0	No	PC	No	c.1756 A>T (p.Lys586X)	14	[21]
GAL-01	23	<100	No	No	Brother: FAP (20s)	c.2413C>T (p.Arg805X)	15	[22]
GAL-17	41	100	Yes	OST	Father CRC (45), SisterCRC(34)	c.2900delT (p.Val967AlafsX13)	15	This study
GAL-12	34	<100	No	No	Father: CRC (40s) Uncle: CRC (40s) Grandfather CRC(40s)	c.3467_3470del/AAAGA (p.Glu1156GlyfsX8)	15	[23]
GAL-24	52	>100	No	CHRPE	No	c.3927_3931del/AAAGA (p.Glu1309AspfsX4)	15	[23]
GAL-04	60	>100	Yes	Others	No	c.4033G>T (p.Glu1345X)	15	[25]
GAL-25	43	>100	Yes	No	NA	c.4219-4220del/AG (p.Ser1407XfsX1)	15	This study

Patient ID	Age of onset	Number of Adenomas	CRC	E.D.	Family history (age at diagnosis)	Mutation	Exon	Ref
CAT-12	21	>100	No	No	Mother: FAP+ CRC (49) Sister: FAP (31)	Whole deletion	Whole	[16]
CAT-13	20	20-50	No	No	Father: FAP (?) Brother: FAP (?)	c.423-?-531+? del	4	[5]
CAT-01	46	100	Yes	No	Brother: CRC+FAP(53) Brother: CRC+FAP(59)	c.994C>T (p.Arg332X)	9	[5]
CAT-02	32	>100	No	DP	No	c.2934_2935delAA (p.Gln978HisfsX6)	15	This study
CAT-03	38	40-60	No	DT	Father: CRC (46) Brother: FAP	c.3183_3187delACAAA (p.Lys1061LysfsX2)	15	[23]
CAT-04	20	>100	No	No	Mother: FAP + CRC (?) Cousin: CRC (52)	c.3183_3187delACAAA (p.Lys1061LysfsX2)	15	[23]
CAT-05	39	>100	No	DT	Sister: FAP (41)	c.3183_3187delACAAA (p.Lys1061LysfsX2)	15	[23]
CAT-06	38	>100	Yes	No	Brother: FAP. Father: FAP + CRC (?)	c.3329C>A (p.Ser110X)	15	This study
CAT-07	NA	NA	NA	NA	NA	c.3329C>A (p.Ser110X)	15	This study
CAT-08	27	>100	No	No	Brother: FAP (29) Father:P (41) Grandmother: FAP(30)	c.3531delT (p.Ile1177MetfsX5)	15	This study
CAT-09	NA	NA	NA	DP	NA	c.3631_3632delAT (p.Met1211ValfsX5)	15	[24]
CAT-10	17	>100	No	FGP	Father: FAP (39) Uncle: FAP + CRC (?)	c.3927_3931delAAAGA (p.Glu1309AspfsX4)	15	[23]
CAT-11	32	>100	No	FGP	Father: FAP (39) Uncle FAP + CRC (63) Aunt: FAP + CRC (55) Grandmother: FAP+CRC(39)	c.3927_3931delAAAGA (p.Glu1309AspfsX4)	15	[23]

E.D.: extracolonic disease; DT: desmoid tumor; OST: osteomas; NA: not available; PC: papillary carcinoma; CHRPE: congenital hypertrophy of the retinal pigmented epithelium; Others: Ovarian tumor and suprarenal adenoma; DP: duodenal polyps; FGP: fundic gland polyps.

Table 2 – Phenotypic characteristics and germline mutations identified in biallelic *MYH* carriers.

Patient ID	Age of onset	Number of adenomas	CRC	E.D	Family History (age at diagnosis)	<i>MYH</i>		Ref.
						1 st Mutation	2 nd mutation	
GAL-08	43	25-30	Yes	No	No	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	[7]
GAL-21	52	<100	No	No	No	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	[7]
GAL-22	NA	40-60	No	No	Two siblings and mother: CRC (50s)	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	[7]
GAL-05	58	<100	Yes	No	NA	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	[7]
GAL-06	NA	40-100	No	No	Sister: AFAP (?)	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	[7]
GAL-20	45	<100	No	No	Two siblings: AFAP+CRC (?)	c.1131 C>T (p.Gln377X)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	[7, 40]
GAL-03	44	31-100	Yes	No	No	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	c.1145 G>A (p.Gly382Asp)	[7]
GAL-23	62	>30	Yes	No	No	c.1186_1187insGG p.Glu396GlyfsX43	c.1186_1187insGG p.Glu396GlyfsX43	[7]

Patient ID	Age of onset	Number of adenomas	CRC	E.D	Family History (age at diagnosis)	<i>MUTYH</i>		Ref.
						1 st Mutation	2 nd mutation	
CAT-15	44	5	Yes	No	Mother: BC(66). Brother: 2 CRC (46)	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.1103delC (p.Ala369AlafsX26)	[7, 8]
CAT-14	38	15-30	No	No	Father: CRC (?)	c.494A>G (p.Tyr165Cys)	c.1145G>A (p.Gly382Asp)	[7]
CAT-17	60	>20	Yes	No	NA	c.1145G>A (p.Gly382Asp)	c.1145G>A (p.Gly382Asp)	[7]
CAT-16	45	40-50	No	No	Father: CRC (40)	c.1145G>A (p.Gly382Asp)	c.1145G>A (p.Gly382Asp)	[7]
CAT-18	45	70	Yes	No	No	c.1186_1187insGG (p.Glu396GfsX43)	c.1186_1187insGG (p.Glu396GfsX43)	[41]
CAT-19	69	0	Yes	BC (59)	Cousin: CRC (40)	c.1186_1187insGG p.Glu396GlyfsX43	c.1186_1187insGG p.Glu396GlyfsX43	[41]

E.D.: Extracolonic disease; BC: Breast cancer; NA: not available.

To allow comparison of our results, we used the *MYH* sequence used by previous authors (GenBank accession number: U63329) instead of the actual reference sequence (GenBank accession number: NM_012222), which has 11 additional codons in exon 3.

VII.11.2 Association of MUTYH and MSH6 germline mutations in colorectal cancer patients. (Enviado a Clinical Cancer Research).

María Dolores Giráldez^a, Francesc Balaguer^{a,h}, Trinidad Caldés^b, **Nuria Gómez-Fernández^c**, Clara Ruiz-Ponte^c, Jenifer Muñoz^a, Victoria Gonzalo^a, Leticia Moreira^a, Teresa Ocaña^a, Joan Clofent^d, Angel Carracedo^c, Montserrat Andreu^e, Rodrigo Jover^f, Xavier Llor^g, Antoni Castells^a, Sergi Castellví-Bel^{a,h}, for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association.

^aGastroenterology Department, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clínic, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), IDIBAPS*, Catalonia, Barcelona, Spain. ^b Oncology Molecular Lab, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, Spain. ^c Galician Public Foundation of Genomic Medicine (FPGMX), CIBERER, Genomics Medicine Group-University of Santiago de Compostela. Hospital Clínico, Santiago de Compostela, Galicia, Spain. ^dGastroenterology Department, Hospital Meixoeiro-CHUVI Vigo, Pontevedra, Spain, ^eGastroenterology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Catalonia, Spain, ^fGastroenterology Department, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain, ^gSection of Digestive Diseases and Nutrition, University of Illinois at Chicago, IL 60612, USA.

^hCorresponding authors: Gastroenterology Department, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel. 34-93-2275418, Fax 34-93-2279387, fprunes@clinic.ub.es, sbel@clinic.ub.es

Abstract:

Colorectal cancer (CRC) risk associated with germline monoallelic *MYH* mutations remains controversial, although a slightly increased risk for this disease has been suggested. *MYH* and *MSH6* proteins act in cooperation during the DNA repair process. Based on this interaction, it was hypothesised that the combination of heterozygote germline mutations in both genes could result in an increased CRC risk. To further clarify this interaction, we analyzed the prevalence of *MSH6* mutations in a cohort of CRC patients and controls previously tested for *MYH* mutations: CRC patients with and without a monoallelic *MYH* mutation (group I, n=26; group II, n=50, respectively), and healthy carriers with a monoallelic *MYH* mutation (group III, n=21). In group I, we found three patients (11.5%) with *MSH6* mutations, a missense mutation (p.R635G), a change in the 3'UTR region (c.*4098A>C) and a nonsense mutation (p.Q982X). In group II and III, no mutations were detected. In CRC patients, *MSH6* mutations were more frequently found in *MYH* mutation carriers than in noncarriers (11.5% vs 0%, p=0.037). In conclusion, CRC patients carrying monoallelic *MYH* mutations harbor more frequently concomitant *MSH6* mutations than patients without them, thus suggesting that both genes could act cooperatively and confer together an increased CRC risk.

Key words: colorectal cancer; base excision repair; *MSH6*; *MYH*; genetics.

Introduction

The MYH protein belongs to the base excision repair (BER) system which is implicated in the repair of DNA oxidative damage due to aerobic metabolism. MYH is an adenine-specific DNA glycosylase that scans the daughter strand after replication and removes adenosine residues mispaired with 8-oxodG, one of the most stable harmful products derived from oxidative damage¹. Recently, it has been shown that carrying germline biallelic mutations in the *MYH* gene increases the risk to develop multiple adenomas and colorectal cancer (CRC)². This entity, known as *MYH* associated polyposis (MAP) (MIM#608456) is inherited as an autosomal recessive trait with high penetrance. Clinically, MAP resembles the attenuated form of familial adenomatous polyposis syndrome, with an average age of onset around the mid 50's with often fewer than 100 adenomas. As a result of BER deficiency, adenomas from MAP patients are characterized by the accumulation of somatic G:C→T:A transversions in the *APC* and *KRAS* genes³.

Up to a third of patients with biallelic *MYH* mutations can develop CRC without synchronous polyps. Accordingly, based on the current understanding of MAP, *MYH* mutation testing should be considered in patients with multiple adenomatous polyps (especially in those without family history and/or without mutations in the *APC* gene), and in early onset CRC (<50 years) without evidence of mismatch repair (MMR) deficiency⁴. This strategy has led to the identification of a significant number of patients with MAP, and therefore, a good number of obligate monoallelic *MYH* carriers.

Whether monoallelic *MYH* mutation carriers also have an increased CRC risk remains controversial^{5, 6}. Compound heterozygotes with germline mutations both in *MYH* and other DNA repair genes could be in part an explanation for this controversy. DNA glycosylases seem to interact with components of repair pathways other than the BER system with poorly understood mechanisms but accumulating evidence is indicating that this cooperation crosstalk is common⁷. The mismatch-repair (MMR) genes represent excellent candidates to participate in this cooperative mechanism due to the existing interaction between both DNA repair systems, BER and MMR⁸. Germline mutations in the MMR genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*) are the underlying cause of Lynch syndrome, and *MSH6* mutations account for 10-15% of all cases⁹. MYH protein interacts with MSH6, which is part of the MSH2/MSH6 heterodimer (hMutS). This functional interaction stimulates the DNA binding and glycosylation activities of MYH⁸.

One study has previously reported a significantly higher frequency of monoallelic *MYH* mutations in CRC patients carrying missense *MSH6* mutations¹⁰, whereas another has failed to find such correlation¹¹. Considering that missense *MSH6* mutations are often associated with no or low cancer susceptibility¹², it is a very attractive possibility that the combined defect in both *MSH6* and *MYH* genes could contribute in a cooperative manner to an increased CRC risk.

We hypothesized that the presence of mutations in the *MSH6* gene, especially missense mutations, might contribute to CRC susceptibility in monoallelic *MYH* mutation carriers. We therefore investigated the prevalence of *MSH6* mutations in monoallelic *MYH* gene mutation carriers.

Patients and Methods

Study population

We investigated the prevalence of *MSH6* mutations in a cohort of CRC patients (n=76) and healthy subjects (n=21) who had been systematically tested for germline *MLH1*, *MSH2* and *MYH* mutations^{6,13}. CRC patients were predominantly recruited from the EPICOLON cohort (n=69), a prospective, multicenter, nation-wide, population-based study performed in Spain which included all newly diagnosed CRC patients between November 2000 and October 2001. In order to increase the number of CRC patients with monoallelic *MYH* mutations, we have included 7 additional CRC cases from the Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica and Hospital Meixoeiro. Healthy subjects with no personal history of cancer were recruited from a large cohort of individuals attending the outpatient clinic of orthopedic surgery department of the Hospital Clinic of Barcelona⁶.

According to the presence of a germline monoallelic *MYH* mutation, CRC patients were divided in group I (n=26) that included CRC patients with a monoallelic *MYH* mutation, and group II (n=50), including age- and sex-matched CRC patients without *MYH* mutations (matching ratio 1:2). Group III (n=21) was formed by healthy carriers of a monoallelic *MYH* mutation.

Group I included 22 (84.6%) patients with the p.G382D mutation, and 4 (15.4%) patients with the p.Y165C mutation. Group III consisted of 20 (95%) subjects with the p.G382D mutation and one subject (5%) with the p.Y165C mutation.

As part of the EPICOLON study, microsatellite instability testing and immunostaining for *MLH1* and *MSH2* proteins were performed in all patients regardless of age, personal and family history, and tumor characteristics, as described elsewhere¹³. Patients found to have tumors with microsatellite instability and/or lack of protein expression underwent germline genetic testing for *MLH1* and *MSH2*. Patients with germline mutations in *MLH1* or *MSH2* were not included in the present analysis.

Germline MYH Gene Mutation Analysis

Screening for *MYH* mutations was done using a three-stage approach⁶. First, samples were screened for the two most common mutations, p.Y165C and p.G382D, by allelic discrimination with allele-specific TaqMan probes and resolved on a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Second, in heterozygotes for the p.Y165C or p.G382D mutations, the coding region and exon-intron boundaries of the entire *MYH* gene were screened by single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Samples with abnormal band shifts were sequenced. Primer details are available on request. Third, all CRC patients and control subjects were re-screened for any pathogenic variant found in the SSCP analysis by allelic discrimination with allele-specific TaqMan probes. Patients found to be biallelic *MYH* mutations carriers were not included in the present analysis.

Germline MSH6 Gene Mutation Analysis

Mutation analysis of the *MSH6* gene was done by either SSCP or by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), followed by direct sequencing of any abnormal band shift¹⁴. Primer details are available on request.

Tumor Microsatellite Instability Analysis

Tissue samples from tumor and healthy colonic mucosa were obtained from each patient, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C until use. In those cases in which frozen tissue was not available, archival formalin-fixed, paraffin-embedded samples were used. Genomic DNA was isolated using the QiaAmp Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Microsatellite status was assessed using the 5-marker panel proposed by the National Cancer Institute¹⁵. Tumours with >30% unstable markers were classified as high level MSI (MSI-H) and tumours with <30% unstable markers were classified as low-level MSI (MSI-L). Tumours without any marker were classified as stable (MSS).

Somatic KRAS Gene Mutation Analysis

To evaluate the proficiency of the BER pathway, the mutational hot spot of KRAS (exon 2) was directly sequenced in both directions in tumor samples of patients with mutations in both *MYH* and *MSH6* genes. Primers were KRAS-F, 5'-GCCTGCTGAAAATGACTGAA-3' and KRAS-R, 5'-AGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3'.

Immunohistochemistry of MSH6

To evaluate the proficiency of the *MSH6* gene, tumor immunostaining for MSH6 was performed in patients with mutations in both *MYH* and *MSH6*. Tumor paraffin-embedded sections were immunostained with antibodies against the MSH6 protein (anti-MSH6, BD Transduction Laboratories), as described elsewhere¹⁴. Tumor cells were judged to be negative for protein expression only if they lacked staining in a sample in which normal colonocytes and stroma cells were stained. If no immunostaining of normal tissue could be demonstrated, the results were considered ambiguous.

MSH6 G39E Polymorphism Analysis

The c.116G>A (p.G39E) polymorphism of MSH6, which has been associated with an increased risk of CRC in some studies^{16,17}, was evaluated in all subjects of the study by performing an allelic discrimination assay with allele-specific TaqMan probes and resolved on a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). We considered as variant risk carriers those patients who were heterozygotes or homozygotes for this MSH6 polymorphism.

Statistical Analysis

MSH6 mutation frequency was calculated for the different groups. To compare these frequencies in CRC patients with and without a monoallelic *MYH* gene mutation, and control subjects, crosstabs were constructed and results were analysed by the chi square test,

applying Yates correction when needed. The Student's T-test was used to analyze continuous variables. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Three out of the 26 (11.5%) CRC patients with a monoallelic *MYH* mutation (group I) also carried a *MSH6* mutation, whereas no *MSH6* mutations (0%) were found in the 50 CRC patients without a *MYH* monoallelic mutation (group II) ($p=0.037$) (Table 1). Characteristics of patients of group I and II are summarized in Table 2. Among the 21 healthy carriers of a monoallelic *MYH* mutation (group III), no *MSH6* mutations were found.

Regarding the *MSH6* mutations found in group I CRC patients, they were a nonsense mutation (p.Q982X), a missense variant (p.R635G), and a change in 3'UTR region (c.*4098A>C). All three mutations were found in *MYH* p.G382D mutation carriers. Tumors from all these patients showed normal expression of the MSH6 protein in the immunostaining assay and were classified as stable tumors according to the MSI testing.

As the somatic phenotype of individuals with BER deficiency is characterized by an excess of G: C→T: A somatic mutations in target genes such as *KRAS*³, we further investigated the presence of *KRAS* mutations in patients with mutations in both *MSH6* and *MYH*. All patients were found to have a wild type *KRAS* status.

The clinical and pathologic characteristics of compound *MYH/MSH6* heterozygote patients are shown in Table 3. It is important to note that none of these patients had family history of CRC, with no one fulfilling Amsterdam II criteria. In fact, only one patient had a first-degree relative with late onset ovarian cancer. The most remarkable case was a patient who had developed two synchronous CRCs in the setting of an attenuated adenomatous polyposis at the age of 50. Despite the fact that this patient harbored a nonsense *MSH6* mutation, the molecular analysis failed to find tumor hallmarks/signature of MMR deficiency.

Finally, we also evaluated the presence of the *MSH6 Gly39Glu (116G>A)* polymorphism (c.116G>A (p.G39E); rs1042821) which is located in exon 1 and has been previously associated with an increased risk of CRC^{16,17}. The distribution of this risk variant in our population in either homozygous or heterozygous manner (Gly/Glu or Glu/Glu vs Gly/Gly) did not show differences between CRC patients and control subjects (36% vs. 28.6%; $p= 0.61$). Its frequency was also found to be similar in CRC patients, independently of the *MYH* status (group I, 28.3% vs. group II, 40%; $p= 0.28$).

Discussion

In the present study we found a significantly higher frequency of *MSH6* mutations in CRC patients carrying a monoallelic *MYH* mutation than in CRC patients without *MYH* mutations. Indeed, the results of this investigation support the hypothesis that the combination of mutations in both genes could confer an increased risk of CRC.

Colorectal cancer risk associated with monoallelic *MYH* carriers is still debated. We recently performed a meta-analysis that suggested a lack of CRC risk for monoallelic carriers [OR 1.11 (95%CI: 0.9-1.37)]. However, other kin-cohort and association studies argue against this possibility^{5,18}. This discrepancy probably underlies a weak effect of monoallelic mutations in CRC development. In this context, it has been suggested that the p.Y165C mutation confers a much stronger pathogenicity compared to the p.G382D mutation in the *MYH* gene⁶. Another attractive field of interest is the co-existence of low-penetrant germline mutations in two or more functionally related genes that could increase CRC risk. In this regard, the MMR genes, especially *MSH6*, represents excellent candidates due to the existing interaction between both DNA repair systems. Interestingly, the *MSH6* gene is characterized by a lower penetrance than *MLH1* and *MSH2*, a higher age at cancer onset and a higher risk of endometrial cancer development. In addition, one-third of *MSH6* mutations are nontruncating, and thus do not necessarily destroy the encoded protein and often show a normal protein expression by immunohistochemistry¹⁹. Indeed, *MSH6* missense mutations alone may result in a less severely impaired MMR system and may therefore less strongly contribute to cancer risk. On the basis of functionality studies many or most missense changes in *MSH6* are likely clinically innocent, whereas some missense changes, in spite of leading to impaired MMR, are likely to be clinically significant with low penetrance. These features make *MSH6* an ideal partner to combine with other low penetrance variants, such as monoallelic *MYH* mutations, to enhance the risk for CRC development.

Previous studies have focused on the study of the interaction between the MMR system and the BER system, and have analyzed the prevalence of *MYH* monoallelic mutations in *MSH6*-related Lynch syndrome families. Niessen et al, found a significantly higher frequency of monoallelic *MYH* mutations in *MSH6* missense mutation carriers (20%) than in Caucasian controls (1.5%, p=0.001) and Dutch colorectal and endometrial cancer patients without *MSH6* gene mutation¹⁰ (0.7%, p=0.002). In contrast, Steinke et al. failed to find this association when they examined the *MSH6* mutation carriers of the German HNPCC Consortium for *MYH* mutations¹¹.

To further investigate the potential interaction between both genes, we analyzed the prevalence of *MSH6* mutations in a cohort of CRC patients with and without monoallelic *MYH* mutations, instead of choosing a cohort of CRC patients with suspected Lynch syndrome. The strength of this study relies in the fact that most of the CRC patients were recruited from an unselected general population-based cohort, the EPICOLON study, with a well-characterized phenotype, family history and tumor molecular profile. We found a significantly higher frequency of *MSH6* mutations within CRC patients carrying monoallelic *MYH* mutations compared to non-carriers (11.5 vs. 0%; p=0.037). Patients carrying a combined defect in both

genes displayed clinical phenotype compatible with sporadic CRC and a tumor phenotype different from Lynch syndrome as they showed MMR proficiency, based on normal immunostaining and microsatellite stability. Moreover, we did not find somatic mutations in *KRAS*, a common characteristic of MAP tumor phenotype.

We observed three different *MSH6* mutations in CRC patients: a missense mutation (p.R635G), a change in the 3'UTR region (c.*4098A>C) and a nonsense mutation (p.Q982X). The p.R635G missense variant was predicted to be "possibly damaging" using an *in silico* approach (Polyphen; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>)²⁰ (Fig. 1). The c.*4098A>C change may conceivably alter gene regulation due to its location at the 3'UTR region on a highly conserved cDNA position, and the p.Q982X mutation generates a stop codon and consequently a truncated protein. None of these mutations have been previously described in any Lynch syndrome mutation database, and neither of them was present in our control cohort, which highlight a probably pathogenic role. In this regard, it is noteworthy that disease-causing germline mutations of *MSH6* seem to be really infrequent in the Spanish population¹⁴.

Considering that most of missense *MSH6* mutations and monoallelic *MYH* mutations act as low-penetrance alleles, the simultaneous presence of mutations in both genes might be a matter of chance. Accordingly, one would expect to find the co-occurrence of both mutations in sporadic cancers. In fact, none of the three patients with mutations in both genes had family history of CRC, and two of them developed a late onset CRC (79 and 85 years-old). Nevertheless, one of the patients developed two synchronous CRC in the setting of an adenomatous polyposis at the age of 50 years, a clinical phenotype characteristic of MAP. However, tumor molecular analysis failed to find the somatic mutation c.34G>T or any other in *KRAS* exon 2, which has been shown in up to 64% of MAP carcinomas²¹. On the other hand, considering the nonsense mutation in *MSH6*, the patient's tumor was MMR proficient showing *MSH6* protein expression and a microsatellite stable phenotype. Whereas we cannot rule out a non evident second mutation in *MYH*, which could explain the clinical phenotype, it is feasible that the molecular consequences of the combination of mutations in both genes are responsible of the clinical phenotype of this patient although tumor molecular traits seem to be not compatible with neither .of the profiles observed in *MSH6* mutation carriers or MAP patients..

In conclusion, our results argue in favor of *MSH6* mutations occurring significantly more frequently in CRC patients with a monoallelic *MYH* mutation than in CRC patients without mutations in this gene. This observation is in agreement with the hypothesis that the combination of mutations in both genes could increase CRC risk. As the biological consequences of the observed mutations are presently unknown, we cannot reach any definitive conclusion. However, if larger studies confirm these results, this association could have clinical implications for management of monoallelic *MYH* carriers in who might be systematically examined for mutations in the *MSH6* gene.

Acknowledgments

We thank Ajay Goel for the critical review of this work. We are sincerely grateful to all patients participating in this study that were recruited in 25 Spanish hospitals as part of the EPICOLON project. Grant support: This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (05/0071, 08/0024 and 08/1276), Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 07-64873), Asociación Española contra el Cáncer, Fundación Olga Torres (S. C-B), Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (S. C-B), and Acción Transversal contra el Cáncer (Instituto de Salud Carlos III). F. B. received a research grant from Fundación Caja Madrid. V. G. received a research grant from the Hospital Clínic, and S. C-B is supported by a contract from the Fondo de Investigación Sanitaria (CP 03-0070). CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III. *IDIBAPS, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. N. G-F received a Maria Barbeito's Fellowship from Xunta de Galicia

References

1. Slupska MM, Luther WM, Chiang JH, Yang H, Miller JH. Functional expression of hMYH, a human homolog of the Escherichia coli MutY protein. *J Bacteriol* 1999; 181:6210–6213.
2. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, *et al.* Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002; 30:227-232.
3. Van Puijenbroek M, Nielsen M, Tops CM, Halfwerk H, Vasen HF, Weiss MM *et al.* Identification of patients with (atypical) MUTYH-associated polyposis by KRAS2 c.34G > T prescreening followed by MUTYH hotspot analysis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Clin Cancer Res.* 2008 Jan 1;14(1):139-42.
4. Riegert-Johnson DL, Johnson RA, Rabe KG, Wang L, Thomas B, Baudhuin LM, *et al.* The value of MUTYH testing in patients with early onset microsatellite stable colorectal cancer referred for hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome testing. *Genet Test.* 2007 Winter;11(4):361-
5. Jenkins MA, Croitoru ME, Monga N, Cleary SP, Cotterchio M, Hopper JL, Gallinger S. Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MYH mutations: a population-based case-family study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Feb;15(2):312-4.
6. Balaguer F, Castellví-Bel S, Castells A, *et al.* Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer a multicentre, case-control, based study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5:379-87.
7. Kovtun IV, McMurray CT. Crosstalk of DNA glycosylases with pathways other than base excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2007 Apr 1;6(4):517-29. Epub 2006 Nov 28.
8. Gu Y, Parker A, Wilson TM, Bai H, Chang DY, Lu AL. Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J Biol Chem* 2002; 277: 11135–11142.
9. Lynch HT, de la Chapelle A (2003) Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348:919–932.
10. Niessen RC, Sijmons RH, Ou J *et al.* MUTYH and the mismatch repair system: partners in crime? *Hum Genet* 2006; 119:206– 211.
11. Steinke V, Rahner N, Morak M, Keller G, Schackert HK, Görgens H, Schmiegel W, Royer-Pokora B, Dietmaier W, Kloor M, Engel C, Propping P, Aretz S; German HNPCC Consortium. No association between MUTYH and MSH6 germline mutations in 64 HNPCC patients. *Eur J Hum Genet.* 2008 May; 16(5):587-92.

12. Kariola R, Hampel H, Frankel WL, Raevaara TE, de la Chapelle A, Nyström-Lahti M. MSH6 missense mutations are often associated with no or low cancer susceptibility. *Br J Cancer*. 2004 Oct 4; 91(7):1287-92.
13. Piñol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 2005; 293: 1986–1994.
14. Sánchez de Abajo A, de la Hoya M, Tosar A, Godino J, Fernández JM, Asenjo JL, Villamil BP, Segura PP, Diaz-Rubio E, Caldes T. Low prevalence of germline hMSH6 mutations in colorectal cancer families from Spain. *World J Gastroenterol*. 2005 Oct 7; 11(37):5770-6.
15. 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.
16. Berndt SI, Platz EA, Fallin MD, et al. Mismatch repair polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1548-54.
17. Campbell PT, Curtin K, Ulrich C, Samowitz W, Bigler J, Velicer C, Caan B, Potter J, Slattery M. Mismatch repair polymorphisms and risk of colon cancer, tumor microsatellite instability, and interactions with lifestyle factors. In press.
18. Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, et al. Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects *Am J Hum Genet* 2005; 77:112-9.
19. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RG, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet*. 2002 Jan;70(1):26-37.
20. Vasily Ramensky, Peer Bork, and Shamil Sunyaev Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* (2002) 30(17): 3894-900; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>.
21. Lipton L, Halford SE, Johnson V, Novelli MR, Jones A, Cummings C, et al. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res*. 2003 Nov 15; 63(22):7595-9.

Tables:**Table 1. Distribution and description of germline *MSH6* mutations in colorectal cancer patients and controls.**

		n	<i>MSH6</i> mutations n (%)	<i>MSH6</i> mutation description
CRC patients	with <i>MYH</i> mutation (group I)	26	3 (11,5%)	p.R635G, c.*4098A>C, p.Q982X
	without <i>MYH</i> mutation (group II)	50	0 (0%)	-
Healthy controls	with <i>MYH</i> mutation (group III)	21	0 (0%)	-

CRC: colorectal cancer.

Table 2. Characteristics of colorectal cancer patients

	Group I (n=26)	Group II (n=50)	p value
Age ¹	69.9 ± 11.3	68.8 ± 11.9	0.69
Female gender- n (%)	13 (50)	19 (38)	0.33
Distal tumour ² - n (%)	18 (69.2)	39 (78)	0.41
Synchronous or metachronous CRC- n (%)	2 (7.7)	3 (6)	1
Synchronous adenomas- n (%)	9 (34.6)	13 (26)	0.41
Presence of other synchronous or metachronous Lynch syndrome-associated tumours ³ - n (%)	0 (0)	0 (0)	-
FDR with CRC- n (%)	4 (15.4)	3 (6)	0.22
FDR with other Lynch syndrome-associated tumours ³ - n (%)	3 (11.5)	1 (2)	0.113
Fulfillment of revised Bethesda guidelines- n (%)	5 (19.2)	8 (16)	0.75
Fulfillment of Amsterdam II criteria- n (%)	0 (0)	0 (0)	-
Tumour microsatellite instability- n (%)	2 (7.7)	2 (4)	0.60

CRC, colorectal cancer; FDR, first-degree relatives.

¹ Expressed as mean ± standard deviation

² Referred to tumors distal to the splenic flexure

³ Stomach, ovaries, urinary tract, small intestine, pancreas, bile ducts, brain [glioblastoma] or sebaceous glands.

Table 3. Clinical and pathologic characteristics of colorectal cancer patients with combined *MSH6* and *MYH* mutations.

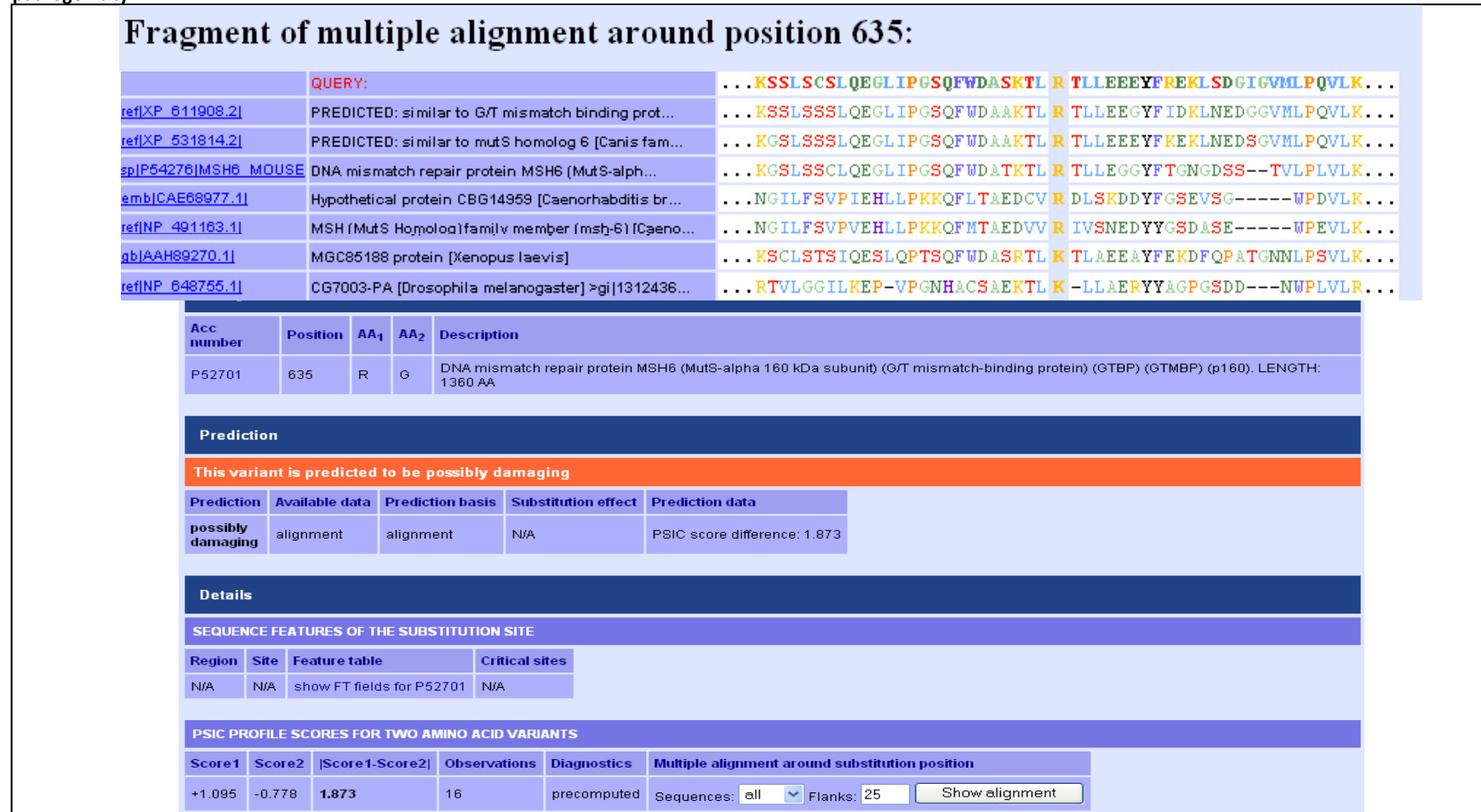
Id.	Germline <i>MYH</i> mutation	Germline <i>MSH6</i> mutation	Sex	Personal history of CRC (age at diagnosis)	Personal history of other tumors (age at diagnosis)	Family history (cancer, age at diagnosis)	Tumor MSI	Tumor <i>MSH6</i> IHC	Tumor <i>KRAS</i> status ¹
5063	p.G382D	p.Q982X	M	Sigma (50) Rectum (50)	Synchronous adenomas (64)	No	Stable	Present	Wild type
5062	p.G382D	p.R635G	F	Sigma (85)	No	No	Stable	Present	Wild type
12052	p.G382D	c.*4098A>C	F	Sigma (79)	No	Sister (ovary, 71)	Stable	Present	Wild type

CRC: colorectal cancer; MSI: microsatellite instability; IHC: immunohistochemistry.

¹*KRAS* mutational analysis included hot spot in exon 2 (codons 11 and 12)

Figure legend

Figure 1. Amino acid alignment of the MSH6 protein in position 635 and PolyPhen prediction result showing conservation of this residue in different species and a putative pathogenicity.



VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Lynch, H. T. & de la Chapelle, A. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 919-932 (2003).
2. de la Chapelle, A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **4**, 769-780 (2004).
3. Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. & Parkin, D. M. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC Cancer Base No. 5. version 2.0. (2004).
4. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer. J. Clin.* **55**, 74-108 (2005).
5. Henry T. Lynch, M.D., and Albert de la Chapelle. Hereditary colorectal cancer. (2003).
6. Enholm, S. *et al.* Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am. J. Pathol.* **163**, 827-832 (2003).
7. Hemminki, K. & Chen, B. Familial risks for colorectal cancer show evidence on recessive inheritance. *Int. J. Cancer* **115**, 835-838 (2005).
8. Pinol, V. *et al.* Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* **293**, 1986-1994 (2005).
9. Baglioni, S. & Genuardi, M. Simple and complex genetics of colorectal cancer susceptibility. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **129**, 35-43 (2004).
10. van Breda, S. G. *et al.* Altered vegetable intake affects pivotal carcinogenesis pathways in colon mucosa from adenoma patients and controls. *Carcinogenesis* **25**, 2207-2216 (2004).
11. Gunter, M. J. *et al.* Meat intake, cooking-related mutagens and risk of colorectal adenoma in a sigmoidoscopy-based case-control study. *Carcinogenesis* **26**, 637-642 (2005).
12. Pinol, V. *et al.* Synchronous colorectal neoplasms in patients with colorectal cancer: predisposing individual and familial factors. *Diseases of the Colon & Rectum* **47**, 1192-1200 (2004).
13. Freeman, H. J. Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* **14**, 1810-1811 (2008).
14. Johns, L. E. & Houlston, R. S. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 2992-3003 (2001).
15. Abdel-Rahman, W. M., Mecklin, J. P. & Peltomaki, P. The genetics of HNPCC: application to diagnosis and screening. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **58**, 208-220 (2006).
16. Kastrinos, F. & Syngal, S. Recently identified colon cancer predispositions: MYH and MSH6 mutations. *Semin. Oncol.* **34**, 418-424 (2007).
17. Farrington, S. M. *et al.* Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 112-119 (2005).
18. Al-Tassan, N. *et al.* Inherited variants in MYH are unlikely to contribute to the risk of lung carcinoma. *Hum. Genet.* **114**, 207-210 (2004).
19. Sieber, O. M. *et al.* Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N. Engl. J. Med.* **348**, 791-799 (2003).
20. Cheadle, J. P. & Sampson, J. R. MUTYH-associated polyposis—from defect in base excision repair to clinical genetic testing. *DNA Repair (Amst)* **6**, 274-279 (2007).
21. Rozen, P. & Macrae, F. Familial adenomatous polyposis: the practical applications of clinical and molecular screening. *Familial Cancer* **5**, 227-235 (2006).
22. Lynch, H. T. *et al.* Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur. J. Hum. Genet.* **14**, 390-402 (2006).
23. Giardiello, F. M. & Trimbath, J. D. Peutz-Jeghers syndrome and management recommendations. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **4**, 408-415 (2006).
24. Brosens, L. A. A. *et al.* Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis. *Br. Med. J.* **56**, 965-967 (2007).
25. Wiesner, G. L. *et al.* A subset of familial colorectal neoplasia kindreds linked to chromosome 9q22.2-31.2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12961-12965 (2003).
26. Tomlinson, I. *et al.* Inherited susceptibility to colorectal adenomas and carcinomas: evidence for a new predisposition gene on 15q14-q22. *Gastroenterology* **116**, 789-795 (1999).
27. Jaeger, E. *et al.* Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. *Nat. Genet.* **40**, 26-28 (2008).
28. Park, W. S. *et al.* A Distinct Tumor Suppressor Gene Locus on Chromosome 15q21. 1 in Sporadic Form of Colorectal Cancer 1. *Cancer Res.* **60**, 70-73 (2000).
29. Laiho, P. *et al.* Genome-wide allelotyping of 104 Finnish colorectal cancers reveals an excess of allelic imbalance in chromosome 20q in familial cases. *Oncogene* **22**, 2206-2214 (2003).
30. Gustafson, C. E. *et al.* Functional evidence for a colorectal cancer tumor suppressor gene at chromosome 8p22-23 by monochromosome transfer. *Cancer Res.* **56**, 5238-5245 (1996).

31. Fearnhead, N. S., Wilding, J. L. & Bodmer, W. F. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br. Med. Bull.* **64**, 27-43 (2002).
32. Laken, S. J. *et al.* Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat. Genet.* **17**, 79-83 (1997).
33. Rennert, G. *et al.* Colorectal polyps in carriers of the APC I1307K polymorphism. *Dis. Colon Rectum* **48**, 2317-2321 (2005).
34. Strul, H. *et al.* The I1307K Adenomatous Polyposis Coli Gene Variant Does Not Contribute in the Assessment of the Risk for Colorectal Cancer in Ashkenazi Jews 1. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **12**, 1012-1015 (2003).
35. Sieber, O., Lipton, L., Heinimann, K. & Tomlinson, I. Colorectal tumourigenesis in carriers of the APC I1307K variant: lone gunman or conspiracy? *J. Pathol.* **199** (2003).
36. Zauber, N. P., Sabbath-Solitare, M., Marotta, S. P. & Timothy Bishop, D. The characterization of somatic APC mutations in colonic adenomas and carcinomas in Ashkenazi Jews with the APC I1307K variant using linkage disequilibrium. *J. Pathol.* **199** (2003).
37. Bian, Y. *et al.* TGFBR1*6A may contribute to hereditary colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 3074-3078 (2005).
38. Houlston, R. S. & Peto, J. The future of association studies of common cancers. *Hum. Genet.* **112**, 434-435 (2003).
39. Tomlinson, I. *et al.* A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat. Genet.* **39**, 984-988 (2007).
40. Zanke, B. W. *et al.* Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat. Genet.* **39**, 989-994 (2007).
41. Tomlinson, I. P. *et al.* A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat. Genet.* (2008).
42. Tenesa, A. *et al.* Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nat. Genet.* (2008).
43. Moser, A. R., Pitot, H. C. & Dove, W. F. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**, 322-324 (1990).
44. Dietrich, W. F. *et al.* Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell(Cambridge)* **75**, 631-639 (1993).
45. Cormier, R. T. *et al.* Secretory phospholipase Pla2g2a confers resistance to intestinal tumorigenesis. *Nat. Genet.* **17** (1997).
46. Nadeau, J. H. Modifier genes in mice and humans. *Nature Reviews Genetics* **2**, 165-174 (2001).
47. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).
48. Llor, X. *et al.* Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7304-7310 (2005).
49. Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**, 1130-1134 (1998).
50. Ichii, S. *et al.* Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis (FAP). *Oncogene* **8**, 2399-2405 (1993).
51. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from Hereditary Review Colorectal Cancer. *Cell* **87**, 159-170 (1996).
52. Al-Tassan, N. *et al.* Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* **30**, 227-232 (2002).
53. Cheadle, J. P., Dolwani, S. & Sampson, J. R. Inherited defects in the DNA glycosylase MYH cause multiple colorectal adenoma and carcinoma. *Carcinogenesis* **24**, 1281-2; author reply 1283 (2003).
54. Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* (1993).
55. Jiricny, J. Mediating mismatch repair. *Nat. Genet.* **24**, 6-8 (2000).
56. Li, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **18**, 85-98 (2008).
57. Rampino, N. *et al.* Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**, 967 (1997).
58. Schwartz, S. *et al.* Frameshift Mutations at Mononucleotide Repeats in caspase-5 and Other Target Genes in Endometrial and Gastrointestinal Cancer of the Microsatellite Mutator Phenotype 1. *Cancer Res.* **59**, 2995-3002 (1999).
59. Markowitz, S. *et al.* Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **268**, 1336-1338 (1995).

60. Thorstensen, L. *et al.* WNT1 inducible signaling pathway protein 3, WISP-3, a novel target gene in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Gastroenterology* **121**, 1275-1280 (2001).
61. Ouyang, H. *et al.* The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. *Cancer Res.* **57**, 1851-1854 (1997).
62. Malkhosyan, S., Rampino, N., Yamamoto, H. & Perucho, M. Frameshift mutator mutations. *Nature* **382**, 499-500 (1996).
63. Futreal, P. A. *et al.* A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer.* **4**, 177-183 (2004).
64. Genuardi, M. Inherited cancer predisposition. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **129**, 1-4 (2004).
65. Jones, P. A. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res.* **56**, 2463-2467 (1996).
66. Kondo, Y. & Issa, J. P. J. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **23**, 29-39 (2004).
67. Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2395-2402 (2000).
68. Ogino, S. *et al.* Molecular correlates with MGMT promoter methylation and silencing support CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer. *Br. Med. J.* **56**, 1564 (2007).
69. Costello, J. F. *et al.* Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type- specific patterns. *Nat. Genet.* **24**, 132-138 (2000).
70. Ueki, T. *et al.* Hypermethylation of Multiple Genes in Pancreatic Adenocarcinoma 1. *Cancer Res.* **60**, 1835-1839 (2000).
71. Rashid, A., Shen, L., Morris, J. S., Issa, J. P. J. & Hamilton, S. R. CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am. J. Pathol.* **159**, 1129-1135 (2001).
72. Toyota, M., Ohe-Toyota, M., Ahuja, N. & Issa, J. P. J. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 710-715 (2000).
73. gino, S. & Goel, A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *Journal of Molecular Diagnostics* **10**, 13 (2008).
74. Esteller, M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur. J. Cancer* **36**, 2294-2300 (2000).
75. Esteller, M., Levine, R., Baylin, S. B., Ellenson, L. H. & Herman, J. G. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* **17**, 2413-2417 (1998).
76. Esteller, M. *et al.* Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.* **60**, 4366-4371 (2000).
77. Herman, J. G. *et al.* Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 6870-6875 (1998).
78. Kane, M. F. *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.* **57**, 808-811 (1997).
79. Koinuma, K. *et al.* Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER* **108**, 237-242 (2004).
80. Domingo, E. *et al.* Activated BRAF Targets Proximal Colon Tumors With Mismatch Repair Deficiency and MLH1 Inactivation. *GENES CHROMOSOMES AND CANCER* **39**, 138-142 (2004).
81. Young, J. *et al.* Evidence for BRAF mutation and variable levels of microsatellite instability in a syndrome of familial colorectal cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **3**, 254-263 (2005).
82. Minoo, P., Moyer, M. & Jass, J. Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumorigenesis. *J. Pathol.* **212**, 124 (2007).
83. Loughrey, M. B. *et al.* Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Familial Cancer* **6**, 301-310 (2007).
84. Wang, L. *et al.* BRAF Mutations in Colon Cancer Are Not Likely Attributable to Defective DNA Mismatch Repair 1. *Cancer Res.* **63**, 5209-5212 (2003).
85. Lichtenstein, P. *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.* **343**, 78-85 (2000).
86. Bülow, S., Berk, T. & Neale, K. The history of familial adenomatous polyposis. *Familial Cancer* **5**, 213-220 (2006).
87. Ballinger, A. B. & Anggiansah, C. Colorectal cancer. *BMJ* **335**, 715-718 (2007).
88. Goss, K. H. & Groden, J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J. Clin. Oncol.* **18**, 1967-1979 (2000).
89. Petersen, G. M., Slack, J. & Nakamura, Y. Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology* **100**, 1658 (1991).

90. Bulow, S. *et al.* Duodenal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *Br. Med. J.* **53**, 381-386 (2004).
91. Gurbuz, A. K. *et al.* Desmoid tumours in familial adenomatous polyposis. *Br. Med. J.* **35**, 377-381 (1994).
92. Clark, S. K., Neale, K. F., Landgrebe, J. C. & Phillips, R. K. S. Desmoid tumours complicating familial adenomatous polyposis. *Br. J. Surg.* **86** (1999).
93. Burt, R. W. Polyposis syndromes. *Atlas of Gastroenterology*, 395 (1999).
94. Galiatsatos, P. & Foulkes, W. D. Familial adenomatous polyposis. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 385-398 (2006).
95. Chen, C. S. *et al.* Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium (CHRPE) in familial colorectal cancer. *Familial Cancer* **5**, 397-404 (2006).
96. Umar, A., Risinger, J. I., Hawk, E. T. & Barrett, J. C. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **4**, 153-158 (2004).
97. Vasen, H. F. *et al.* Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut* **57**, 704-713 (2008).
98. Nielsen, M. *et al.* Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis. *Clin. Genet.* **71**, 427-433 (2007).
99. Neklason, D. W. *et al.* Colonic Adenoma Risk in Familial Colorectal Cancer—A Study of Six Extended Kindreds. *Am. J. Gastroenterol.* (2008).
100. Spirio, L. *et al.* Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* **75**, 951-957 (1993).
101. Giardiello, F. M. *et al.* The Use and Interpretation of Commercial APC Gene Testing for Familial Adenomatous Polyposis. *N. Engl. J. Med.* **336**, 823 (1997).
102. Thliveris, A. *et al.* Long-range physical map and deletion characterization of the 1100-kb NotI restriction fragment harboring the APC gene. *Genomics* **34**, 268-270 (1996).
103. Herrera, L., Kakati, S., Gibas, L., Pietrzak, E. & Sandberg, A. A. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am. J. Med. Genet.* **25**, 473-476 (1986).
104. Bodmer, W. F. *et al.* Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* **328**, 614-616 (1987).
105. Leppert, M. *et al.* The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* **238**, 1411-1413 (1987).
106. Kinzler, K. W. *et al.* Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* **253**, 661-665 (1991).
107. Nishisho, I. *et al.* Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* **253**, 665-669 (1991).
108. Groden, J. *et al.* Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**, 589-600 (1991).
109. Joslyn, G. *et al.* Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* **66**, 601-613 (1991).
110. Van der Luijt, R. B. *et al.* APC mutation in the alternatively spliced region of exon 9 associated with late onset familial adenomatous polyposis. *Hum. Genet.* **96**, 705-710 (1995).
111. Sulekova, Z., Reina-Sanchez, J. & Ballhausen, W. G. Multiple APC messenger RNA isoforms encoding exon 15 short open reading frames are expressed in the context of a novel exon 10A-derived sequence. *Int. J. Cancer* **63**, 435-441 (1995).
112. Bala, S., Sulekova, Z. & Ballhausen, W. G. Constitutive APC exon 14 skipping in early-onset familial adenomatous polyposis reveals a dramatic quantitative distortion of APC gene-specific isoforms. *Hum. Mutat.* **10**, 201-206 (1997).
113. Oshima, M., Sugiyama, H., Kitagawa, K. & Taketo, M. APC gene messenger RNA: novel isoforms that lack exon 7. *Cancer Res.* **53**, 5589-5591 (1993).
114. Thliveris, A., Samowitz, W., Matsunami, N., Groden, J. & White, R. Demonstration of promoter activity and alternative splicing in the region 5' to exon 1 of the APC gene. *Cancer Res.* **54**, 2991-2995 (1994).
115. Horii, A., Nakatsuru, S., Ichii, S., Nagase, H. & Nakamura, Y. Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 283-287 (1993).
116. M. Sieber, O., P. Tomlinson, I. & Lamlum, H. The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor—genetics, function and disease. *Mol. Med. Today* **6**, 462-469 (2000).
117. Joslyn, G., Richardson, D. S., White, R. & Alber, T. Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc Natl Acad Sci US A* **90**, 11109-11113 (1993).
118. Su, L. K., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* **262**, 1734-1737 (1993).
119. Fearnhead, N. S., Britton, M. P. & Bodmer, W. F. The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 721-733 (2001).
120. Aoki, K. & Taketo, M. M. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J. Cell. Sci.* **120**, 3327-3335 (2007).

121. Potter, J. D. Colorectal cancer: molecules and populations. *JNCI* **91**, 916-932 (1999).
122. Polakis, P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *BBA* **1332**, 127-147 (1997).
123. Lamlum, H. *et al.* The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat. Med.* **5**, 1071-1075 (1999).
124. Su, L. K. *et al.* APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* **55**, 2972-2977 (1995).
125. Lustig, B. & Behrens, J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **129**, 199-221 (2003).
126. Castellvi-Bel, S., Balaguer, F. & Castells, A. MYH and colorectal cancer. A significant advance? *Gastroenterol. Hepatol.* **29**, 409-413 (2006).
127. Cao, X., Eu, K. W., Seow-Choen, F., Zhao, Y. & Cheah, P. Y. Topoisomerase-I- and Alu-mediated genomic deletions of the APC gene in familial adenomatous polyposis. *Hum. Genet.* **108**, 436-442 (2001).
128. Nagase, H. *et al.* Screening for germ-line mutations in familial adenomatous polyposis patients: 61 new patients and a summary of 150 unrelated patients. *Hum. Mutat.* **1**, 467-473 (1992).
129. Sieber, O. M. *et al.* Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2954-2958 (2002).
130. Bunyan, D. J. *et al.* Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br. J. Cancer* **91**, 1155-1159 (2004).
131. Aretz, S. *et al.* Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Hum. Mutat.* **24**, 370-380 (2004).
132. Aretz, S. *et al.* Large submicroscopic genomic APC deletions are a common cause of typical familial adenomatous polyposis. *J. Med. Genet.* **42**, 185-192 (2005).
133. Michils, G. *et al.* Large deletions of the APC gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): a Belgian study. *Hum. Mutat.* **25**, 125-134 (2005).
134. Aretz, S. *et al.* Frequency and parental origin of de novo APC mutations in familial adenomatous polyposis. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**, 52-58 (2004).
135. Bertario, L. *et al.* Multiple approach to the exploration of genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *Journal of Clinical Oncology* **21**, 1698 (2003).
136. Friedl, W. *et al.* Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Br. Med. J.* **48**, 515-521 (2001).
137. De la Fuente, M. K. *et al.* Mutational Screening of the APC Gene in Chilean Families with Familial Adenomatous Polyposis: Nine Novel Truncating Mutations. *Dis. Colon Rectum* **50**, 2142-2148 (2007).
138. Miyoshi, Y. *et al.* Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4452-4456 (1992).
139. Groden, J. *et al.* Mutational analysis of patients with adenomatous polyposis: identical inactivating mutations in unrelated individuals. *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 263-272 (1993).
140. Petersen, G. M. Knowledge of the adenomatous polyposis coli gene and its clinical application. *Ann. Med.* **26**, 205-208 (1994).
141. Nieuwenhuis, M. & Vasen, H. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature. *Critical Reviews in Oncology and Hematology* **61**, 153-161 (2007).
142. Enomoto, M. *et al.* The relationship between frequencies of extracolonic manifestations and the position of APC germline mutation in patients with familial adenomatous polyposis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **30**, 82-88 (2000).
143. Ficari, F. *et al.* APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *Br. J. Cancer* **82**, 348-353 (2000).
144. Caspari, R. *et al.* Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet* **343**, 629-632 (1994).
145. Gebert, J. F. *et al.* Combined molecular and clinical approaches for the identification of families with familial adenomatous polyposis coli. *Ann. Surg.* **229**, 350 (1999).
146. Walon, C. *et al.* Novel germline mutations in the APC gene and their phenotypic spectrum in familial adenomatous polyposis kindreds. *Hum. Genet.* **100**, 601-605 (1997).
147. Giardiello, F. M. *et al.* APC gene mutations and extraintestinal phenotype of familial adenomatous polyposis. *Gut* **40**, 521-525 (1997).
148. Michils, G. *et al.* Pathogenic mutations and rare variants of the APC gene identified in 75 Belgian patients with familial adenomatous polyposis by fluorescent enzymatic mutation detection (EMD). *Eur. J. Hum. Genet.* **10**, 505 (2002).

149. Soravia, C. *et al.* Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 1290-1301 (1998).
150. Alonso, A. *et al.* Genetic mechanisms in the hereditary predisposition to colorectal cancer. *An Sist. Sanit. Navar* **29**, 59-76 (2006).
151. Davies, D. R. *et al.* Severe Gardner syndrome in families with mutations restricted to a specific region of the APC gene. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 1151-1158 (1995).
152. Caspari, R. *et al.* Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 337-340 (1995).
153. Eccles, D. M. *et al.* Hereditary desmoid disease due to a frameshift mutation at codon 1924 of the APC gene. *Am. J. Hum. Genet.* **59**, 1193 (1996).
154. Scott, R. J. *et al.* Familial infiltrative fibromatosis (desmoid tumours)(MIM135290) caused by a recurrent 3'APC gene mutation. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1921-1924 (1996).
155. Dobbie, Z. *et al.* Correlation between the development of extracolonic manifestations in FAP patients and mutations beyond codon 1403 in the APC gene. *J. Med. Genet.* **33**, 274-280 (1996).
156. Heinimann, K. *et al.* Phenotypic differences in familial adenomatous polyposis based on APC gene mutation status. *Gut* **43**, 675-679 (1998).
157. Moiso, A. L., Jarvinen, H. & Peltomaki, P. Genetic and clinical characterisation of familial adenomatous polyposis: a population based study. *Gut* **50**, 845-850 (2002).
158. Wallis, Y. L., Morton, D. G., McKeown, C. M. & Macdonald, F. Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *J. Med. Genet.* **36**, 14-20 (1999).
159. Brensinger, J. D. *et al.* Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3' mutation in the APC gene. *Gut* **43**, 548-552 (1998).
160. Chow, E., Thirlwell, C., Macrae, F. & Lipton, L. Colorectal cancer and inherited mutations in base-excision repair. *Lancet Oncol.* **5**, 600-606 (2004).
161. Sampson, J. R. *et al.* Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* **362**, 39-41 (2003).
162. Gismondi, V. *et al.* Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int. J. Cancer* **109**, 680-684 (2004).
163. Venesio, T. *et al.* High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* **126**, 1681-1685 (2004).
164. Isidro, G. *et al.* Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum. Mutat.* **24**, 353-354 (2004).
165. Kairupan, C. F. *et al.* Mutation analysis of the MYH gene in an Australian series of colorectal polyposis patients with or without germline APC mutations. *Int. J. Cancer* **116**, 73-77 (2005).
166. Bai, H. *et al.* Functional characterization of two human MutY homolog (hMYH) missense mutations (R227W and V232F) that lie within the putative hMSH6 binding domain and are associated with hMYH polyposis. *Nucleic Acids Res.* **33**, 597-604 (2005).
167. Lipton, L. *et al.* Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res.* **63**, 7595-7599 (2003).
168. Bouguen, G. *et al.* Colorectal adenomatous polyposis Associated with MYH mutations: genotype and phenotype characteristics. *Dis. Colon Rectum* **50**, 1612-1617 (2007).
169. Nielsen, M. *et al.* Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP). *J. Med. Genet.* **42**, e54 (2005).
170. Aretz, S. *et al.* MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int. J. Cancer* **119**, 807-814 (2006).
171. Hemminki, K. & Chen, B. Familial risks for colorectal cancer show evidence on recessive inheritance. *Int. J. Cancer* **115** (2005).
172. Balaguer, F. *et al.* Identification of MYH Mutation Carriers in Colorectal Cancer: A Multicenter, Case-Control, Population-Based Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **5**, 379-387 (2007).
173. Slupska, M. M. *et al.* Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* **178**, 3885-3892 (1996).
174. Ohtsubo, T. *et al.* Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1355-1364 (2000).

175. Boldogh, I. *et al.* hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2802-2809 (2001).
176. Parker, A. *et al.* Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair. *J. Biol. Chem.* **276**, 5547-5555 (2001).
177. Thayer, M. M., Ahern, H., Xing, D., Cunningham, R. P. & Tainer, J. A. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO J.* **14**, 4108 (1995).
178. Aravind, L., Walker, D. R. & Koonin, E. V. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1223 (1999).
179. Doherty, A. J., Serpell, L. C. & Ponting, C. P. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2488 (1996).
180. Chepanoske, C. L., Golinelli, M. P., Williams, S. D. & David, S. S. Positively Charged Residues within the Iron-Sulfur Cluster Loop of E. coli MutY Participate in Damage Recognition and Removal. *Arch. Biochem. Biophys.* **380**, 11-19 (2000).
181. Gu, Y. *et al.* Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J. Biol. Chem.* **277**, 11135-11142 (2002).
182. Sieber, O. M. *et al.* Myh deficiency enhances intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia (Apc Min/) mice. *Cancer Res.* **64**, 8876-8881 (2004).
183. Marra, G. & Jiricny, J. Multiple Colorectal Adenomas-Is Their Number Up? *N. Engl. J. Med.* **348**, 845-847 (2003).
184. David, S. S., O'Shea, V. L. & Kundu, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* **447**, 941-950 (2007).
185. Fleischmann, C. *et al.* Comprehensive analysis of the contribution of germline MYH variation to early-onset colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **109**, 554-558 (2004).
186. Di Gregorio, C. *et al.* Immunohistochemical expression of MYH protein can be used to identify patients with MYH-associated polyposis. *Gastroenterology* **131**, 439-444 (2006).
187. Chmiel, N. H., Livingston, A. L. & David, S. S. Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated E.coli enzymes. *J. Mol. Biol.* **327**, 431-443 (2003).
188. Ushijima, Y. *et al.* A functional analysis of the DNA glycosylase activity of mouse MUTYH protein excising 2-hydroxyadenine opposite guanine in DNA. *Nucleic Acids Res.* **33**, 672-682 (2005).
189. Ali, M. *et al.* Characterization of Mutant MUTYH Proteins Associated With Familial Colorectal Cancer. *Gastroenterology* (2008).
190. Nielsen, M. *et al.* Analysis of MUTYH Genotypes and Colorectal Phenotypes in Patients With MUTYH-Associated Polyposis. *Gastroenterology* (2008).
191. Gorgens, H. *et al.* Microsatellite stable colorectal cancers in clinically suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients without vertical transmission of disease are unlikely to be caused by biallelic germline mutations in MYH. *J. Mol. Diagn.* **8**, 178-182 (2006).
192. Ponti, G. *et al.* Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations. *Clin. Genet.* **68**, 442-447 (2005).
193. Croitoru, M. E. *et al.* Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 1631-1634 (2004).
194. Wang, L. *et al.* MYH mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps. *Gastroenterol* **127**, 9-16 (2004).
195. Colebatch, A. *et al.* The role of MYH and microsatellite instability in the development of sporadic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **95**, 1239-1243 (2006).
196. Jenkins, M. A. *et al.* Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MYH mutations: a population-based case-family study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**, 312-314 (2006).
197. Tenesa, A. *et al.* Association of MUTYH and colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **95**, 239-242 (2006).
198. Webb, E. L., Rudd, M. F. & Houlston, R. S. Colorectal cancer risk in monoallelic carriers of MYH variants. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 768-71; author reply 771-2 (2006).
199. Avezu, A. *et al.* The role of MYH gene in genetic predisposition to colorectal cancer: another piece of the puzzle. *Cancer Lett.* **268**, 308-313 (2008).
200. Jeghers, H., McKusick, V. A. & Katz, K. H. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits. *N. Engl. J. Med.* **241**, 992-1005 (1949).

201. Hemminki, A. *et al.* A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* **391**, 184-187 (1998).
202. Volikos, E. *et al.* LKB1 exonic and whole gene deletions are a common cause of Peutz-Jeghers syndrome. *J. Med. Genet.* **43**, e18 (2006).
203. Buchet-Poyau, K., Mehenni, H., Radhakrishna, U. & Antonarakis, S. E. Search for the second Peutz-Jeghers syndrome locus: exclusion of the STK13, PRKCG, KLK10, and PSCD2 genes on chromosome 19 and the STK11IP gene on chromosome 2. *Cytogenet. Genome Res.* **97**, 171-178 (2002).
204. Aretz, S. *et al.* High proportion of large genomic deletions and a genotype phenotype update in 80 unrelated families with juvenile polyposis syndrome. *J. Med. Genet.* **44**, 702-709 (2007).
205. Handra-Luca, A. *et al.* Vessels' morphology in SMAD4 and BMPR1A-related juvenile polyposis. *Am. J. Med. Genet.* (2005).
206. Lloyd, K. M., 2nd & Dennis, M. Cowden's disease. A possible new symptom complex with multiple system involvement. *Ann. Intern. Med.* **58**, 136-142 (1963).
207. Brownstein, M. H., Wolf, M. & Bikowski, J. B. Gowden's disease. A cutaneous marker of breast cancer. *Cancer* **41** (1978).
208. Vasen, H. F. *et al.* Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* **110**, 1020-1027 (1996).
209. Aarnio, M. *et al.* Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int. J. Cancer* **81** (1999).
210. Felton, K. E., Gilchrist, D. M. & Andrew, S. E. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? *Clin. Genet.* **71**, 499-500 (2007).
211. Lynch, H. T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cytogenet. Cell Genet.* **86**, 130-135 (1999).
212. Lipkin, S. M. *et al.* Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat. Genet.* **31**, 385-390 (2002).
213. Kowalski, L. D., Mutch, D. G., Herzog, T. J., Rader, J. S. & Goodfellow, P. J. Mutational analysis of MLH1 and MSH2 in 25 prospectively-acquired RER endometrial cancers. *Genes, Chromosomes and Cancer* **18** (1997).
214. Chadwick, R. B. *et al.* Hereditary and somatic DNA mismatch repair gene mutations in sporadic endometrial carcinoma. *Br. Med. J.* **38**, 461-466 (2001).
215. Cunningham, J. M. *et al.* The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 780-790 (2001).
216. Vasen, H. F. A., Mecklin, J. P., Meera Khan, P. & Lynch, H. T. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis. Colon Rectum* **34**, 424-425 (1991).
217. Lynch, H. T., Smyrk, T. & Lynch, J. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet. Cytogenet.* **93**, 84-99 (1997).
218. Lynch, H. T., Krush, A. J. & Guirgis, H. Genetic factors in families with combined gastrointestinal and breast cancer. *Am. J. Gastroenterol.* **59**, 31-40 (1973).
219. Lynch, H. T. *et al.* Differential diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome I and Lynch syndrome II). *Dis. Colon Rectum* **31**, 372-377 (1988).
220. Lynch, H. T. *et al.* Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I. *Cancer Genet. Cytogenet.* **53**, 143-160 (1991).
221. Lynch, H. T. & Krush, A. J. Heredity and adenocarcinoma of the colon. *Gastroenterology* **53**, 517-527 (1967).
222. Watson, P. & Lynch, H. T. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* **71** (1993).
223. Watson, P. & Lynch, H. T. The tumor spectrum in HNPCC. *Anticancer Res.* **14**, 1635-1639 (1994).
224. Watson, P. *et al.* The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int. J. Cancer* **123**, 444 (2008).
225. de la Chapelle, A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam. Cancer.* **4**, 233-237 (2005).
226. Lindor, N. M. *et al.* Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* **293**, 1979-1985 (2005).
227. Loukola, A. *et al.* Microsatellite instability in adenomas as a marker for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am. J. Pathol.* **155**, 1849-1853 (1999).
228. Boland, C. R. *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.* **58**, 5248-5257 (1998).
229. Aaltonen, L. A. *et al.* Incidence of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and the Feasibility of Molecular Screening for the Disease. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1481 (1998).
230. Vasen, H. F., Watson, P., Mecklin, J. P. & Lynch, H. T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* **116**, 1453-1456 (1999).

231. Rodriduez-Bigas, M. A. *et al.* A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer síndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1758-1762 (1997).
232. Giardiello, F. M., Brensinger, J. D. & Petersen, G. M. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* **121**, 198-213 (2001).
233. Park, J. G. *et al.* Suspected HNPCC and Amsterdam criteria II: evaluation of mutation detection rate, an international collaborative study. *Int. J. Colorectal Dis.* **17**, 109-114 (2002).
234. Alonso, A. *et al.* in *Cáncer Hereditario. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)* Dispublic S.L., Madrid, (2006).
235. Vasen, H. F. A. *et al.* Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *Br. Med. J.* **44**, 353-362 (2007).
236. Tao, H. *et al.* A novel splice-site variant of the base excision repair gene MYH is associated with production of an aberrant mRNA transcript encoding a truncated MYH protein not localized in the nucleus. *Carcinogenesis* **25**, 1859-1866 (2004).
237. Liu, B. *et al.* Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat. Med.* **2**, 169-174 (1996).
238. Turcot, J., Despres, J. P. & St. Pierre, F. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon. *Dis. Colon Rectum* **2**, 465-468 (1959).
239. Trimbath, J. D. *et al.* Cafe-au-lait spots and early onset colorectal neoplasia: a variant of HNPCC? *Fam. Cancer.* **1**, 101-105 (2001).
240. Hamilton, S. R. *et al.* The molecular basis of Turcot's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **332**, 839-847 (1995).
241. Paraf, F., Jothy, S. & Van Meir, E. G. Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J. Clin. Oncol* **15**, 2744 (1997).
242. Itoh, H. & Ohsato, K. Turcot syndrome and its characteristic colonic manifestations. *Dig. Dis. Sci.* **28**, 399-402 (1985).
243. Ponti, G. & Ponz de Leon, M. Muir-Torre syndrome. *Lancet Oncol.* **6**, 980-987 (2005).
244. Kruse, R. *et al.* Is the mismatch repair deficient type of Muir-Torre syndrome confined to mutations in the hMSH2 gene? *Hum. Genet.* **98**, 747-750 (1996).
245. Mangold, E. *et al.* A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of msh2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. *J. Med. Genet.* **41**, 567-572 (2004).
246. Murphy, H. R., Armstrong, R., Cairns, D. & Greenhalgh, K. L. Muir-Torre Syndrome: expanding the genotype and phenotype-a further family with a MSH6 mutation. *Fam. Cancer.* (2008).
247. Arnold, A. *et al.* An individual with Muir-Torre syndrome found to have a pathogenic MSH6 gene mutation. *Fam. Cancer.* **6**, 317-321 (2007).
248. Cannavo, E. *et al.* Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Res.* **65**, 10759-10766 (2005).
249. Gu, L., Hong, Y., McCulloch, S., Watanabe, H. & Li, G. M. ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1173 (1998).
250. Lindblom, A., Tannergård, P., Werelius, B. & Nordenskjöld, M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat. Genet.* **5**, 279-282 (1993).
251. Bateman, A. *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 276 (2002).
252. Fishel, R. *et al.* The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**, 1027-1027 (1993).
253. Peltomäki, P. Lynch Syndrome Genes. *Familial Cancer* **4**, 227-232 (2005).
254. Clark, A. B., Deterding, L., Tomer, K. B. & Kunkel, T. A. Multiple functions for the N-terminal region of Msh6. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4114-4123 (2007).
255. Stec, I., Nagl, S. B., van Ommen, G. J. B. & den Dunnen, J. T. The PWWP domain: a potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? *FEBS Lett.* **473**, 1-5 (2000).
256. Nicolaides, N. C. *et al.* Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* **371**, 75-80 (1994).
257. Nicolaides, N. C. *et al.* Genomic organization of the human PMS2 gene family. *Genomics* **30**, 195-206 (1995).
258. Kondo, E., Horii, A. & Fukushige, S. The Human PMS2L Proteins Do Not Interact with hMLH1, a Major DNA Mismatch Repair Protein. *J. Biochem.* **125**, 818 (1999).
259. De Vos, M. *et al.* PMS2 Mutations in Childhood Cancer. *Jnci* **98**, 358-361 (2006).
260. Peltomäki, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol* **21**, 1174-1179 (2003).

261. Belvederesi, L. *et al.* Assessing the pathogenicity of MLH1 missense mutations in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with clinical, genetic and functional features. *Eur. J. Hum. Genet.* **14**, 853-859 (2006).
262. Miyaki, M. *et al.* Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.* **17**, 271-272 (1997).
263. Berends, M. J. *et al.* Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 26-37 (2002).
264. Mitchell, R. J., Farrington, S. M., Dunlop, M. G. & Campbell, H. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* **156**, 885-902 (2002).
265. Cartegni, L., Chew, S. L. & Krainer, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 285-298 (2002).
266. Auclair, J. *et al.* Systematic mRNA analysis for the effect of MLH1 and MSH2 missense and silent mutations on aberrant splicing. *Hum. Mutat.* **27**, 145-154 (2006).
267. Charbonnier, F. *et al.* MSH2 in contrast to MLH1 and MSH6 is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.* **62**, 848-853 (2002).
268. Nakagawa, H., Hampel, H. & de la Chapelle, A. Identification and characterization of genomic rearrangements of MSH2 and MLH1 in Lynch syndrome (HNPCC) by novel techniques. *Hum. Mutat.* **22**, 258 (2003).
269. Di Fiore, F. *et al.* Screening for genomic rearrangements of the MMR genes must be included in the routine diagnosis of HNPCC. *J. Med. Genet.* **41**, 18-20 (2004).
270. Pistorius, S. *et al.* Genomic rearrangements in MSH2, MLH1 or MSH6 are rare in HNPCC patients carrying point mutations. *Cancer Lett.* **248**, 89-95 (2007).
271. Viel, A. *et al.* Different molecular mechanisms underlie genomic deletions in the MLH1 Gene. *Hum. Mutat.* **20**, 368-374 (2002).
272. Ashton, K. A., Meldrum, C. J., McPhillips, M. L., Kairupan, C. F. & Scott, R. J. Frequency of the common MYH mutations (G382D and Y165C) in MMR mutation positive and negative HNPCC patients. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* **3**, 65-70 (2005).
273. Buttin, B. M. *et al.* Penetrance and expressivity of MSH6 germline mutations in seven kindreds not ascertained by family history. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 1262-1269 (2004).
274. Peltomaki, P. & Vasen, H. Mutations associated with HNPCC predisposition--Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis. Markers* **20**, 269-276 (2004).
275. Lynch, H. T. HNPCC (Lynch Syndrome): Differential Diagnosis, Molecular Genetics and Management--a Review. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* **1**, 7-18 (2003).
276. Kruse, R. *et al.* Muir-Torre Phenotype Has a Frequency of DNA Mismatch-Repair-Gene Mutations Similar to That in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Families Defined by the Amsterdam Criteria. *The American Journal of Human Genetics* **63**, 63-70 (1998).
277. Wu, Y. *et al.* Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1291-1298 (1999).
278. Kolodner, R. D. *et al.* Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res.* **59**, 5068-5074 (1999).
279. Akiyama, Y. *et al.* Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res.* **57**, 3920-3923 (1997).
280. Truninger, K. *et al.* Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology* **128**, 1160-1171 (2005).
281. Nakagawa, H. *et al.* Mismatch repair gene PMS2 disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. *Cancer Res.* **64**, 4721-4727 (2004).
282. Wu, Y. *et al.* A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.* **29**, 137-138 (2001).
283. Wijnen, J. *et al.* MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat. Genet.* **20**, 326-328 (1998).
284. Bisgaard, M. L., Jager, A. C., Myrhoj, T., Bernstein, I. & Nielsen, F. C. Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC): phenotype-genotype correlation between patients with and without identified mutation. *Hum. Mutat.* **20**, 20-27 (2002).
285. Barnetson, R. A. *et al.* Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2751 (2006).
286. Chen, S. *et al.* Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. *JAMA* **296**, 1479 (2006).

287. Balaguer, F. *et al.* Validation and Extension of the Premm1, 2 Model in a Population-Based Cohort of Colorectal Cancer Patients. *Gastroenterology* (2007).
288. Gorlov, I. P., Gorlova, O. Y., Frazier, M. L. & Amos, C. I. Missense mutations in hMLH1 and hMSH2 are associated with exonic splicing enhancers. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 1157-1161 (2003).
289. Bell, J., Bodmer, D., Siermans, E. & Ramsden, S. C. Practice guidelines for the interpretation and reporting of unclassified variants (UVs) in clinical molecular genetics. *CMGS/VGKL* (2007).
290. Ruiz-Ponte, C., Vega, A., Carracedo, A. & Barros, F. Mutation analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in northwest Spanish patients with familial adenomatous polyposis (FAP) and sporadic colorectal cancer. *Hum. Mutat.* **18**, 355 (2001).
291. Bacher, J. W. *et al.* Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis. Markers* **20**, 237-250 (2004).
292. Murphy, K. M. *et al.* Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *J. Mol. Diagn.* **8**, 305 (2006).
293. Schouten, J. P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* **30**, e57 (2002).
294. Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M. Q. & Krainer, A. R. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3568-3571 (2003).
295. den Dunnen, J. T. & Antonarakis, S. E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum. Mutat.* **15**, 7-12 (2000).
296. Gómez-Fernández, N. *et al.* Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med. Genet.* (Accepted).
297. Giarola, M. *et al.* Screening for mutations of the APC gene in 66 Italian familial adenomatous polyposis patients: evidence for phenotypic differences in cases with and without identified mutation. *Hum. Mutat.* **13**, 116-123 (1999).
298. Vandrovcova, J., Stekrova, J., Kebrdlova, V. & Kohoutova, M. Molecular analysis of the APC and MYH genes in Czech families affected by FAP or multiple adenomas: 13 novel mutations. *Hum. Mutat.* **23**, 397 (2004).
299. Li, G. *et al.* Molecular and clinical study of familial adenomatous polyposis for genetic testing and management. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **18**, 519-529 (1999).
300. Kaufmann, A. *et al.* Analysis of rare APC variants at the mRNA level: six pathogenic mutations and literature review. *J. Mol. Diagn.* **11**, 131-139 (2009).
301. Perez-Cabornero, L. *et al.* A new strategy to screen MMR genes in Lynch Syndrome: HA-CAE, MLPA and RT-PCR. *Eur. J. Cancer* **45**, 1485-1493 (2009).
302. Sarroca, C. *et al.* Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome II) in Uruguay. *Dis. Colon Rectum* **43**, 353-60; discussion 360-2 (2000).
303. Fidalgo, P. *et al.* Detection of mutations in mismatch repair genes in Portuguese families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) by a multi-method approach. *Eur. J. Hum. Genet.* **8**, 49-53 (2000).
304. Wang, Y. *et al.* Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int. J. Cancer* **103**, 636-641 (2003).
305. Kurzawski, G. *et al.* Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum including large rearrangements in HNPCC families from Poland (update study). *Clin. Genet.* **69**, 40 (2006).
306. Pastrello, C. *et al.* Stability of BAT26 in tumours of hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients with MSH2 intragenic deletion. *Eur. J. Hum. Genet.* **14**, 63-68 (2006).
307. Casey, G. *et al.* Conversion analysis for mutation detection in MLH1 and MSH2 in patients with colorectal cancer. *JAMA* **293**, 799-809 (2005).
308. Miyaki, M. *et al.* Germ line mutations of hMSH2 and hMLH1 genes in Japanese families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): usefulness of DNA analysis for screening and diagnosis of HNPCC patients. *J. Mol. Med.* **73**, 515-520 (1995).
309. Wang, Q. *et al.* Prevalence of germline mutations of h MLH1, h MSH2, h PMS1, h PMS2, and h MSH6 genes in 75 French kindreds with nonpolyposis colorectal cancer. *Hum. Genet.* **105**, 79-85 (1999).
310. Buerstedde, J. M. *et al.* Detection of new mutations in six out of 10 Swiss HNPCC families by genomic sequencing of the hMSH2 and hMLH1 genes. *Br. Med. J.* **32**, 909-912 (1995).
311. Overbeek, L. I. H. *et al.* Patients with an unexplained microsatellite instable tumour have a low risk of familial cancer. *Br. J. Cancer* **96**, 1605-1612 (2007).
312. Leach, F. S. *et al.* Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **75**, 1215-1225 (1993).
313. Moslein, G. *et al.* Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1245-1252 (1996).

314. Papp, J., Kovacs, M. E. & Olah, E. Germline MLH1 and MSH2 mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis colorectal cancer families: implications for genetic testing. *World J. Gastroenterol.* **13**, 2727-2732 (2007).
315. Castellvi-Bel, S. *et al.* Genomic rearrangements in MSH2 and MLH1 are rare mutational events in Spanish patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Lett.* **225**, 93-98 (2005).
316. Martinez-Bouzas, C. *et al.* High proportion of large genomic rearrangements in hMSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families of the Basque Country. *Cancer Lett.* **255**, 295-299 (2007).
317. Takahashi, M. *et al.* Functional analysis of human MLH1 variants using yeast and in vitro mismatch repair assays. *Cancer Res.* **67**, 4595 (2007).
318. Barnetson, R. A. *et al.* Classification of ambiguous mutations in DNA mismatch repair genes identified in a population-based study of colorectal cancer Communicated by Albert de la Chapelle. *Hum. Mutat.* **29** (2008).
319. Tournier, I. *et al.* A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with splicing defects. *Hum. Mutat.* (2008).
320. Ravaara, T. E. *et al.* Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology* **129**, 537-549 (2005).
321. Kariola, R., Ravaara, T. E., Lonqvist, K. E. & Nystrom-Lahti, M. Functional analysis of MSH6 mutations linked to kindreds with putative hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1303-1310 (2002).
322. Lipton, L. & Tomlinson, I. The multiple colorectal adenoma phenotype and MYH, a base excision repair gene. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 633-638 (2004).
323. Beroud, C. & Soussi, T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* **24**, 121-124 (1996).
324. Aretz, S. *et al.* Large submicroscopic genomic APC deletions are a common cause of typical familial adenomatous polyposis. *Br. Med. J.* **42**, 185-192 (2005).
325. Flintoff, K. J., Sheridan, E., Turner, G., Chu, C. E. & Taylor, G. R. Submicroscopic deletions of the APC gene: a frequent cause of familial adenomatous polyposis that may be overlooked by conventional mutation scanning. *J. Med. Genet.* **38**, 129-132 (2001).
326. Taylor, C. F., Charlton, R. S., Burn, J., Sheridan, E. & Taylor, G. R. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum. Mutat.* **22**, 428-433 (2003).
327. Wehner, M. *et al.* Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: pitfalls in deletion screening in MSH2 and MLH1 genes. *Eur. J. Hum. Genet.* **13**, 983-986 (2005).
328. Lynch, H. T. & Smyrk, T. C. Identifying Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1537-1538 (1998).
329. Scott, R. J. *et al.* Familial adenomatous polyposis: more evidence for disease diversity and genetic heterogeneity. *Gut* **48**, 508-514 (2001).
330. Rozen, P., Samuel, Z., Shomrat, R. & Legum, C. Notable intrafamilial phenotypic variability in a kindred with familial adenomatous polyposis and an APC mutation in exon 9. *Gut* **45**, 829-833 (1999).
331. Tomlinson, I. *et al.* A modifying locus for familial adenomatous polyposis may be present on chromosome 1p35-p36. *J. Med. Genet.* **33**, 268-273 (1996).
332. Stekrova, J. *et al.* Novel APC mutations in Czech and Slovak FAP families: clinical and genetic aspects. *BMC Med. Genet.* **8**, 16 (2007).
333. Gonzalez, S. *et al.* Founder mutation in familial adenomatous polyposis (FAP) in the Balearic Islands. *Cancer Genet. Cytogenet.* **158**, 70-74 (2005).
334. Salas, A., Comas, D., Lareu, M. V., Bertranpetit, J. & Carracedo, A. mtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *European Journal of Human Genetics* **6**, 365-375 (1998).
335. Salas, A., Lareu, V., Calafell, F., Bertranpetit, J. & Carracedo, A. mtDNA hypervariable region II (HVII) sequences in human evolution studies. *European Journal of Human Genetics* **8**, 964-974 (2000).
336. Vega, A. *et al.* Analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast and breast/ovarian cancer families shows population substructure in the Iberian peninsula. *Ann. Hum. Genet.* **66**, 29-36 (2002).
337. Jones, S. *et al.* Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C->T:A mutations. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2961-2967 (2002).
338. Miyaki, M. *et al.* Germline mutations of the MYH gene in Japanese patients with multiple colorectal adenomas. *Mutat. Res.* **578**, 430-433 (2005).

339. Riegert-Johnson, D. L. *et al.* The Value of MUTYH Testing in Patients with Early Onset Microsatellite Stable Colorectal Cancer Referred for Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer Syndrome Testing. *Genet. Test.* **11**, 361-366 (2007).
340. Giráldez, M. D. *et al.* Association of MYH and MSH6 germline mutations in colorectal cancer patients. *Clinical Cancer Research* (Enviado).
341. Peterlongo, P. *et al.* Colorectal cancer risk in individuals with biallelic or monoallelic mutations of MYH. *Int. J. Cancer* **114**, 505-507 (2005).
342. Caldes, T. *et al.* New mutation in the hMSH2 gene in a Spanish Muir-Torre syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 2389-2390 (2000).
343. BARANA, D. *et al.* Spectrum of genetic alterations in Muir-Torre syndrome is the same as in HNPCC. *Am. J. Med. Genet.* **125**, 318-319 (2004).
344. Schweizer, P. *et al.* Lack of MSH2 and MSH6 characterizes endometrial but not colon carcinomas in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.* **61**, 2813-2815 (2001).
345. Aissi-Ben Moussa, S. *et al.* Identification and characterization of a novel MLH1 genomic rearrangement as the cause of HNPCC in a Tunisian family: evidence for a homologous Alu-mediated recombination. *Fam. Cancer.* (2008).
346. Grabowski, M. *et al.* Deletions account for 17% of pathogenic germline alterations in MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Genet. Test.* **9**, 138-146 (2005).
347. Wijnen, J. *et al.* Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nature a-z index* **23**, 142-144 (1999).
348. Peltomaki, P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 735-740 (2001).
349. Ou, J. *et al.* Functional analysis helps to clarify the clinical importance of unclassified variants in DNA mismatch repair genes. *Hum. Mutat.* **28**, 1047 (2007).
350. Charames, G. S., Millar, A. L., Pal, T., Narod, S. & Bapat, B. Do MSH6 mutations contribute to double primary cancers of the colorectum and endometrium? *Hum. Genet.* **107**, 623-629 (2000).
351. Nilbert, M. *et al.* Major contribution from recurrent alterations and MSH6 mutations in the Danish Lynch syndrome population. *Fam. Cancer.* (2008).
352. Bessa, X. *et al.* A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (2007).
353. De Vos, M., Hayward, B. E., Picton, S., Sheridan, E. & Bonthron, D. T. Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 954-964 (2004).
354. Risinger, M. A. & Groden, J. Crosslinks and crosstalk Human cancer syndromes and DNA repair defects. *Cancer Cell* **6**, 539-545 (2004).
355. Niessen, R. C. *et al.* MUTYH and the mismatch repair system: partners in crime? *Hum. Genet.* **119**, 206-211 (2006).
356. Steinke, V. *et al.* No association between MUTYH and MSH6 germline mutations in 64 HNPCC patients. *Eur. J. Hum. Genet.* (2008).
357. Rodriguez-Moranta, F. *et al.* Postoperative surveillance in patients with colorectal cancer who have undergone curative resection: a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. *J. Clin. Oncol* **24**, 386 (2006).
358. Montera, M. *et al.* A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family. *J. Med. Genet.* **38**, 863-867 (2001).
359. Menendez, M. *et al.* Functional characterization of the novel APC N1026S variant associated with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* **134**, 56-64 (2008).
360. Fu, X. D. Towards a splicing code. *Cell* **119**, 736-738 (2004).
361. Goldgar, D. E. *et al.* Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Hum. Mutat.* **29**, 1265-1272 (2008).
362. Hofstra, R. M. *et al.* Tumor characteristics as an analytic tool for classifying genetic variants of uncertain clinical significance. *Hum. Mutat.* **29**, 1292-1303 (2008).
363. Nystrom-Lahti, M. *et al.* Missense and nonsense mutations in codon 659 of MLH1 cause aberrant splicing of messenger RNA in HNPCC kindreds. *Genes Chromosomes Cancer* **26**, 372-375 (1999).
364. Edelmann, L. & Edelmann, W. Loss of DNA mismatch repair function and cancer predisposition in the mouse: animal models for human hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **129**, 91-99 (2004).

365. Dunlop, M. G. *et al.* Population carrier frequency of hMSH2 and hMLH1 mutations. *Br. J. Cancer* **83**, 1643-1645 (2000).
366. Laguri, C. *et al.* Human mismatch repair protein MSH6 contains a PWWP domain that targets double stranded DNA. *Biochemistry* **47**, 6199-6207 (2008).
367. Berndt, S. I. *et al.* Mismatch repair polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **120** (2007).
368. Campbell, P. T. *et al.* Mismatch repair polymorphisms and risk of colon cancer, tumor microsatellite instability, and interactions with lifestyle factors. *Gut* (2008).
369. Tavtigian, S. V., Byrnes, G. B., Goldgar, D. E. & Thomas, A. Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic-and molecular-epidemiology applications. *Hum. Mutat.* **29**, 1342-1354 (2008).
370. Plon, S. E. *et al.* Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum. Mutat.* **29**, 1282-1291 (2008).
371. Ou, J. *et al.* A database to support the interpretation of human mismatch repair gene variants. *Hum. Mutat.* **29**, 1337-1341 (2008).
372. Ollila, S., Dermadi Bebek, D., Greenblatt, M. & Nystrom, M. Uncertain pathogenicity of MSH2 variants N127S and G322D challenges their classification. *Int. J. Cancer* **123**, 720-724 (2008).
373. Couch, F. J. *et al.* Assessment of functional effects of unclassified genetic variants. *Hum. Mutat.* **29**, 1314-1326 (2008).
374. Bonnet, C. *et al.* Screening BRCA1 and BRCA2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription-PCR on patient RNA and an ex vivo assay based on a splicing reporter minigene. *J. Med. Genet.* (2008).