



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Medicina
Programa de doctorado de Medicina 3139

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS REPARADORAS DEL ADN
MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA EN LAS BIOPSIAS ENDOSCÓPICAS Y LA PIEZA
QUIRÚRGICA CORRESPONDIENTE DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL**

Tesis presentada por CARMEN MARTÍNEZ LAPIEDRA

Licenciada en Medicina y Cirugía

Dirigida por:

Dr. Isidro Machado Puerto

Dr. Samuel Navarro Fos

Valencia, octubre de 2022

DR. ISIDRO MACHADO PUERTO: Doctor en Medicina. Jefe de Sección de Anatomía Patológica del Instituto Valenciano de Oncología

DR. SAMUEL NAVARRO FOS: Doctor en Medicina. Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina y Odontología de Valencia en el Departamento de Patología

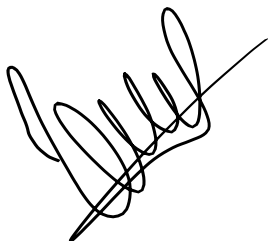
CERTIFICAN:

Que la licenciada en Medicina y Cirugía, CARMEN MARTÍNEZ LAPIEDRA, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo titulado: **“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS REPARADORAS DEL ADN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA EN LAS BIOPSIAS ENDOSCÓPICAS Y LA PIEZA QUIRÚRGICA CORRESPONDIENTE DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL”**

que se presenta en esta memoria para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste, firmamos la presente en Valencia a 3 de octubre del 2022

Dr. Isidro Machado Puerto



Dr. Samuel Navarro Fos



A mis padres y a Carlos

Agradecimientos

En primer lugar, quiero darles las gracias a mis directores de la tesis doctoral. Al Dr. Isidro Machado, por hacer posible esta tesis, apostando por este proyecto, trabajando en él realizando el estudio inmunohistoquímico y supervisándolo. Gracias Isidro por tu tiempo y por estar disponible siempre. Mi agradecimiento también al Prof. Samuel Navarro por su confianza en mi trabajo.

A mis compañeros, mi familia de endoscopias, por su paciencia infinita, su tolerancia y por crear el buen ambiente de trabajo que tenemos a diario.

A mis padres, porque todo lo que he hecho en la vida se lo debo a ellos. A mi hijo, por su comprensión al permitirme dedicarle tiempo a esta tesis. A toda mi familia, que es la mejor familia que uno puede tener.

A Alfonso, por su ayuda, su motivación y su apoyo.

A Zaida, por su colaboración en este trabajo.

A Mari Cruz, Gemma y María, integrantes del Servicio de Anatomía Patológica del IVO, por su ayuda desinteresada y su generosidad.

Índice General

Agradecimientos	vi
Índice General	x
Índice de abreviaturas	xiv
Índice de Tablas.....	xviii
Índice de Figuras.....	xxii
Índice de ilustraciones	xxvi
Justificación y planteamiento de la tesis doctoral.....	xxx
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades del cáncer colorrectal.....	3
1.1.1 Epidemiología	3
1.1.2 Factores de riesgo	5
1.1.3 Prevención.....	10
1.1.4 Etiopatogenia	12
1.1.5 Diagnóstico endoscópico	16
1.1.6 Clasificación	17
1.1.7 Biomarcadores en el cáncer colorrectal	23
1.1.8 Tratamiento	24
1.2 Síndromes hereditarios de cáncer colorrectal.....	27
1.3 Síndrome de Lynch	28
1.3.1 Criterios de Ámsterdam y Bethesda	30
1.3.2 Métodos diagnósticos. Inmunohistoquímica e inestabilidad de microsatélites	32
1.3.3 Algoritmo diagnóstico. Screening universal.....	37
1.3.4 Recomendaciones de manejo y seguimiento	39
2. HIPÓTESIS.....	41
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAL Y MÉTODOS	49
4.1 Población.....	51
4.1.1 Población diana	51
4.1.2 Diseño del estudio.....	51
4.1.3 Criterios de inclusión y exclusión	51
4.2 Métodos	52
4.2.1 Algoritmo del estudio	52
4.2.2 Consideraciones éticas.....	54
4.2.3 Variables del estudio.....	56

4.2.4 Estudio inmunohistoquímico MMR.....	58
4.2.5 Estudio de inestabilidad de microsatélites	59
4.2.6 Análisis de la hipermetilación del promotor del gen MLH1	60
4.2.7. Análisis del gen BRAF.....	60
4.3 Análisis estadístico	60
5. RESULTADOS	63
5.1 Descripción general de la muestra.....	65
5.2 Resultados de la inmunohistoquímica en la población de estudio	69
5.3 Estudio inmunohistoquímico comparativo entre la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica	73
5.4 Respuestas patológicas completas tras la neoadyuvancia.....	84
5.5 Inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN tras la neoadyuvancia	86
5.6 Relación de la inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN con distintas variables clínico-patológicas.....	88
5.7 Análisis comparativo entre la inmunohistoquímica y la inestabilidad de microsatélites	92
6. DISCUSIÓN	97
7. CONCLUSIONES.....	117
8. BIBLIOGRAFÍA.....	121

Índice de abreviaturas

- ACG: American college of gastroenterology
- ADC: Adenocarcinoma
- AEG: Asociación Española de Gastroenterología
- AJCC: American Join Committee on Cancer
- CCHNP: Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis
- CCR: Cáncer colorrectal
- CCRm: CCR metastásico
- CIMP: CpG island methylator phenotype
- CIN: Chromosomal instability pathway
- CMS: Clasificación molecular de consenso
- CRCSC: Colorectal Cancer Subtyping Consortium
- CTF: Canadian Task Force
- ECA: Ensayo clínico aleatorizado
- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- EII: Enfermedad inflamatoria intestinal
- EUROCare: European Cancer Registry Study of Survival and Care of Cancer Patients
- FDA: Food and Drug Administration (EEUU)
- GIST: Tumor del estroma gastrointestinal
- Hb: Hemoglobina
- IHQ-MMR: Inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN
- IHQ: Inmunohistoquímica
- IMS-H: Inestabilidad de microsatélites alta
- IMS-L: Inestabilidad de microsatélites baja
- IMS: Inestabilidad de microsatélites
- IQR: Rango intercuartílico
- LOH: Loss of heterozygosity (pérdida de heterocigosidad)
- MMR: Mismatch repair
- MMS: Estabilidad de microsatélites
- MS: Tumor estable (microsatellite stable)
- NGS: Secuenciación de nueva generación
- PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

- QT: Quimioterapia
- RPC: Respuesta patológica completa
- RR: Riesgo relativo
- SG: Supervivencia global
- SL: Síndrome de Lynch
- SLP: Supervivencia libre de enfermedad
- SOHg: Test de sangre oculta de guayaco
- SOHi: Test de sangre oculta inmunológico
- TC: Tomografía axial computarizada
- UCG: Unidad de consejo genético
- USPSTF: US Preventive Services Task Force
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
- WCRF-AICR: World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research
- WT: Wild type

Índice de Tablas

Tabla 1. Recomendaciones de las pruebas de cribado en la población de riesgo medio. Guía clínica de diagnóstico y prevención del CCR (41).....	12
Tabla 2. Clasificación histológica de los tumores colorrectales (mod.OMS 2010, 5ª).....	18
Tabla 3. Clasificación TNM del cáncer colorrectal. AJCC 8ª Ed. 2017.....	21
Tabla 4. Clasificación por estadios del cáncer colorrectal. AJCC 8ª Ed. 2017	22
Tabla 5. Riesgo de neoplasias en el SL por genotipo comparado con la población general. Adaptado Guía NCCN 3.2019.....	29
Tabla 6. Criterios clínicos del síndrome de Lynch.....	31
Tabla 7. Recomendaciones de manejo y seguimiento del SL. Guía ACG 2015	40
Tabla 8. Variables clínicas de los pacientes	56
Tabla 9. Variables anatomopatológicas de los tumores	57
Tabla 10. Panel de anticuerpos empleados.....	59
Tabla 11. Características demográficas y clínicas de la población de estudio	66
Tabla 12. Distribución de la ausencia de expresión de las proteínas reparadoras del ADN.....	70
Tabla 13. Características de los pacientes con pérdida de expresión MMR	71
Tabla 14. Características demográficas y clínicas del subgrupo de estudio	74
Tablas 15 y 16. Inmunohistoquímica no valorable en la biopsia endoscópica o en la pieza quirúrgica	76
Tabla 17. MLH1 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica	78
Tabla 18. PMS2 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica	80
Tabla 19. MSH2 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica.....	81
Tabla 20. MSH6 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica.....	82
Tabla 21. Neoadyuvancia. Localización del tumor y tipo de tratamiento.....	85
Tabla 22. Respuestas patológicas completas tras neoadyuvancia.....	85
Tabla 23. Inmunohistoquímica de las proteínas MMR en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica tras la neoadyuvancia	87
Tabla 24. Asociación de la expresión inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN y distintas variables	90
Tabla 25. Estudio multivariado	91
Tabla 26. Comparación entre los resultados de la IHQ y la inestabilidad de microsatélites	92
Tabla 27. Comparación de nuestro estudio con otros similares publicados en la literatura.	105

Índice de Figuras

Figura 1. Estimación de la mortalidad por cáncer a nivel mundial en el 2020 para ambos sexos, todas las edades. Fuente: GLOBOCAN.....	3
Figura 2. Estimación de la incidencia y mortalidad por cáncer en España en el 2020 para ambos sexos. Fuente: GLOBOCAN.....	4
Figura 3. Distribución del cáncer colorrectal en Europa por edad. Fuente: European Cancer Information System.....	6
Figura 4. Estratificación del riesgo de cáncer colorrectal. Fuente: Cubiella J et al (41)	10
Figura 5. Vía de carcinogénesis de la inestabilidad cromosómica. Imagen adaptada de Ahnhen DJ.(68)	14
Figura 6. Vía de carcinogénesis de la inestabilidad de microsatélites. Imagen adaptada de Ahnhen DJ.(68)	15
Figura 7. Clasificación molecular de consenso del CCR (adaptada de Guinney J et al. Nat Med 2015). SCNA: alteración de número de copias somático. SLP: supervivencia libre de progresión. SP: supervivencia global.....	23
Figura 8. Distribución epidemiológica de las formas de cáncer colorrectal /Tomada del artículo original (A. Castells, Gastroenterol Hepatol 2016).....	28
Figura 9. Panel de 8 marcadores de microsatélites (IMS alta en tumor).....	35
Figura 10. Algoritmo diagnóstico del Síndrome de Lynch. Modificado de Castro-Mujica et al, Rev Gastroenterol Peru 2018 (138)	38
Figura 11. Algoritmo del estudio.....	54
Figura 12. Características de la población de estudio	68
Figura 13. Expresión IHQ de los genes MMR.....	69
Figura 14. Estudios realizados en pacientes con IMS alta	73
Figura 15. Análisis comparativo de la IHQ de las proteínas MMR en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica.....	83
Figura 16. Pacientes con tratamiento neoadyuvante	84
Figura 17. Variables clínico-patológicas en relación a la expresión IHQ-MMR	89
Figura 18. Panel de 8 marcadores de microsatélites. Tumor estable en un paciente con pérdida de expresión MLH1 y PMS2 (Ilustración 9)	94
Figura 19. Panel de 8 marcadores de microsatélites. Tumor con inestabilidad alta en un paciente con expresión conservada de las 4 proteínas MMR (Ilustración 10).....	95
Figura 20. Algoritmo diagnóstico para la detección de CCR con inestabilidad de microsatélites.....	110

Índice de ilustraciones

<i>Ilustración 1. Imágenes endoscópicas de cánceres colorrectales.</i>	17
<i>Ilustración 2. Adenocarcinoma convencional (NOS).</i>	19
<i>Ilustración 3. Adenocarcinoma mucinoso.</i>	19
<i>Ilustración 4. Carcinoma indiferenciado.</i>	20
<i>Ilustración 5. Tinción inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN en un cáncer colorrectal. A, B. Pérdida de expresión de MLH1/PMS2 en las células tumorales. C,D. Expresión conservada de MSH2/ MSH6.</i>	33
<i>Ilustración 6. Tinción inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN en un cáncer colorrectal. A, B. Expresión conservada de MLH1/PMS2 en las células tumorales. C,D. Pérdida de expresión de MSH2/ MSH6.</i>	33
<i>Ilustración 7. A. Tinción inmunohistoquímica no valorable en la pieza quirúrgica de la proteína MSH2 por fallo en el control interno. B. Expresión conservada de la proteína MSH6</i>	77
<i>Ilustración 8. Tinción inmunohistoquímica no valorable en la biopsia endoscópica de la proteína por ausencia de tumor</i>	77
<i>Ilustración 9. Tinción inmunohistoquímica de MLH1 y PMS2 en la biopsia endoscópica (expresión conservada) y la pieza quirúrgica (pérdida de expresión) correspondiente.</i>	79
<i>Ilustración 10. Tinción inmunohistoquímica de MLH1 en la biopsia endoscópica (A: pérdida de expresión) y la pieza quirúrgica (B: expresión conservada) correspondiente.</i>	79
<i>Ilustración 11. Tinción IHQ de las proteínas reparadoras del ADN en un cáncer colorrectal con pérdida de expresión MLH1 (A) y PMS2 (B) de un paciente con IMS estable (Fig. 17).</i>	93
<i>Ilustración 12. Tinción IHQ con expresión conservada de las 4 proteínas reparadoras del ADN en un cáncer colorrectal de un paciente con IMS alta (Fig. 18).</i>	93

***Justificación y
planteamiento de la tesis
doctoral***

El carcinoma colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más frecuentes en los países desarrollados. En España, es la segunda causa de cáncer en hombres, por detrás del cáncer de próstata, y de las mujeres tras el cáncer de mama (1,2). El estudio EUROCORE-5 (European Cancer Registry Study of Survival and Care of Cancer Patients) sitúa la supervivencia media a los 5 años del cáncer de colon en el 57,1% y la del cáncer de recto en el 56,4% (3). Esta supervivencia depende fundamentalmente del estadio tumoral en el momento del diagnóstico. Los programas de cribado, que permiten la detección del CCR en estadios precoces, junto con los avances en el tratamiento y el mayor conocimiento de sus bases moleculares, han reducido la mortalidad del mismo (4,5).

El CCR es una enfermedad heterogénea y surge por la acumulación secuencial de procesos genéticos y epigenéticos (6–9). Se han descrito 3 mecanismos de carcinogénesis en el CCR esporádico: la inestabilidad cromosómica (CIN), la inestabilidad de microsatélites (IMS) y el fenotipo metilador (CIMP). La vía oncogénica CIN, o vía supresora, ocurre en el 70%-75% de los casos y en ella coexisten tanto la activación de oncogenes como el *K-ras* como la inhibición de genes supresores (*APC*, *DCC*, *TP53*). Otra vía mucho menos frecuente es la IMS caracterizada por la alteración del sistema de reparación de errores durante la replicación del ADN, controlado por los genes MMR (mismatch repair), principalmente *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Los tumores desarrollados por esta vía presentan cientos de mutaciones en secuencias altamente repetitivas denominadas microsatélites. Se observa en el 15% de los CCR esporádicos y en el 95% de los CCR hereditarios (síndrome de Lynch)(10–12). Por último, la vía CIMP se caracteriza por una amplia hipermetilación de los islotes CpG en los promotores de genes supresores de tumores, provocando su inactivación. Se presenta en el 15%-20% de CCR esporádicos y se asocia a mal pronóstico (13–15).

El síndrome de Lynch (SL), también llamado CCR hereditario no asociado a poliposis (CCHNP), es un síndrome genético con patrón de herencia autosómico dominante. Se caracteriza por mutaciones germinales en alguno de los genes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) y recientemente se le han asociado las deleciones en el extremo 3' del gen *EPCAM* al producir un silenciamiento epigenético del promotor del gen *MSH2* (16,17). Los pacientes afectados por este síndrome muestran una predisposición a desarrollar diversos

tumores, generalmente a edades tempranas. El más frecuente es el CCR, pero también se asocia a neoplasias extracolónicas como el cáncer de endometrio, ovario, intestino delgado, estómago, uréter, vía biliar, páncreas y próstata, entre otros (18,19). La sospecha clínica del síndrome de Lynch se establece basándose en la historia personal y familiar, y el diagnóstico de certeza requiere la identificación de la mutación germinal en alguno de los genes reparadores del ADN. Dada la complejidad y el coste de dicho procedimiento se recomienda la realización previa de una técnica molecular de cribado sobre tejido tumoral: el estudio de inestabilidad de microsatélites (IMS) y/o la inmunohistoquímica (IHQ). El análisis de la IMS se realiza mediante la comparación del ADN amplificado de tumores frente al de tejido adyacente normal. La IHQ evalúa la expresión nuclear de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 en el tejido tumoral (IHQ-MMR), que se corresponden con el gen mutado (20,21). La elección de uno u otro método debe basarse en la disponibilidad del centro ya que ambos han demostrado una eficacia equivalente (22). La IHQ posee, no obstante, la ventaja de dirigir el análisis genético al gen que codifica para la proteína no expresada.

De todos los CCR, aproximadamente el 3% corresponden al SL y de ellos el 90% presentan IMS. Sin embargo, la IMS no es exclusiva del SL, ya que existen casos de CCR esporádicos con IMS debido al silenciamiento epigenético de *MLH1* mediante la hipermetilación del promotor de éste (23).

Desde hace unos años, las sociedades científicas recomiendan el cribado universal de SL con IMS o IHQ a todos los CCR diagnosticados, ya que la identificación de estos casos es coste-efectiva porque incrementa la tasa de diagnósticos precoces (de CCR y de tumores extracolónicos) mediante la adecuada vigilancia de los familiares portadores (24–28). Además, la IMS es un factor predictivo de gran relevancia para determinar si procede el tratamiento adyuvante del paciente con estadio II de CCR porque su presencia confiere mejor pronóstico (29–31). Al mismo tiempo, se ha objetivado que los tumores colorrectales metastásicos con IMS tienen mejor respuesta y una supervivencia libre de progresión mayor cuando reciben inmunoterapia que cuando son tratados con quimioterapia convencional (30,93). A pesar de todo lo referido, la estrategia de cribado poblacional ha sido implementada de forma irregular en los distintos hospitales (32,33), y en los casos en los que se lleva a cabo, el estudio se hace en la pieza quirúrgica.

La realización de la IHQ-MMR en las biopsias endoscópicas de CCR ofrece grandes ventajas, ya que la detección preoperatoria de los casos afectos de SL permitiría tomar decisiones sobre la extensión de la cirugía (colectomía vs resección segmentaria, histerectomía profiláctica o no). Además, en el caso del carcinoma rectal con respuesta patológica completa tras la neoadyuvancia, no se dispone de tumor en el espécimen quirúrgico para poder realizar el estudio, y el tratamiento previo podría alterar la expresión proteica de los genes reparadores del ADN.

Dada la importancia de la identificación de los tumores con inestabilidad de microsatélites, especialmente en el momento del diagnóstico del CCR, hemos querido realizar este estudio para evaluar la eficacia del análisis IHQ de las proteínas reparadoras del ADN en las biopsias endoscópicas, comparando los resultados con los de la pieza quirúrgica correspondiente.

Existen sólo 5 estudios previos (34–38) que evalúan la utilidad de la realización de la IHQ-MMR en las biopsias endoscópicas y todos ellos demuestran una excelente correlación con la IHQ en el espécimen quirúrgico. Esperamos obtener unos resultados reproducibles a los publicados en la literatura aportando un mayor número de casos. Asimismo, queremos contribuir al diagnóstico del Síndrome de Lynch, previo a la cirugía del cáncer colorrectal, mediante el estudio IHQ de las proteínas reparadoras del ADN en las biopsias endoscópicas, por todos los beneficios que supone.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del cáncer colorrectal

1.1.1 Epidemiología

El cáncer es uno de los principales problemas de salud en la actualidad y en los últimos años se ha incrementado su incidencia, alcanzando 19,3 millones de personas en el mundo en 2020. También supone una de las primeras causas de muerte: casi 10 millones de fallecimientos (Fig.1). Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos aumentará en las dos próximas décadas hasta 29,5 millones al año en 2040 (39).

A nivel mundial, el cáncer colorrectal (CCR) es el tercero en incidencia en ambos sexos después del cáncer de pulmón y mama, con una estimación global de 1.931.590 nuevos casos en el año 2020. Entre el 2007 y el año 2017 la incidencia aumentó un 38% (40) y se prevé una continuidad de esta tendencia al alza, sobre todo en países desarrollados.

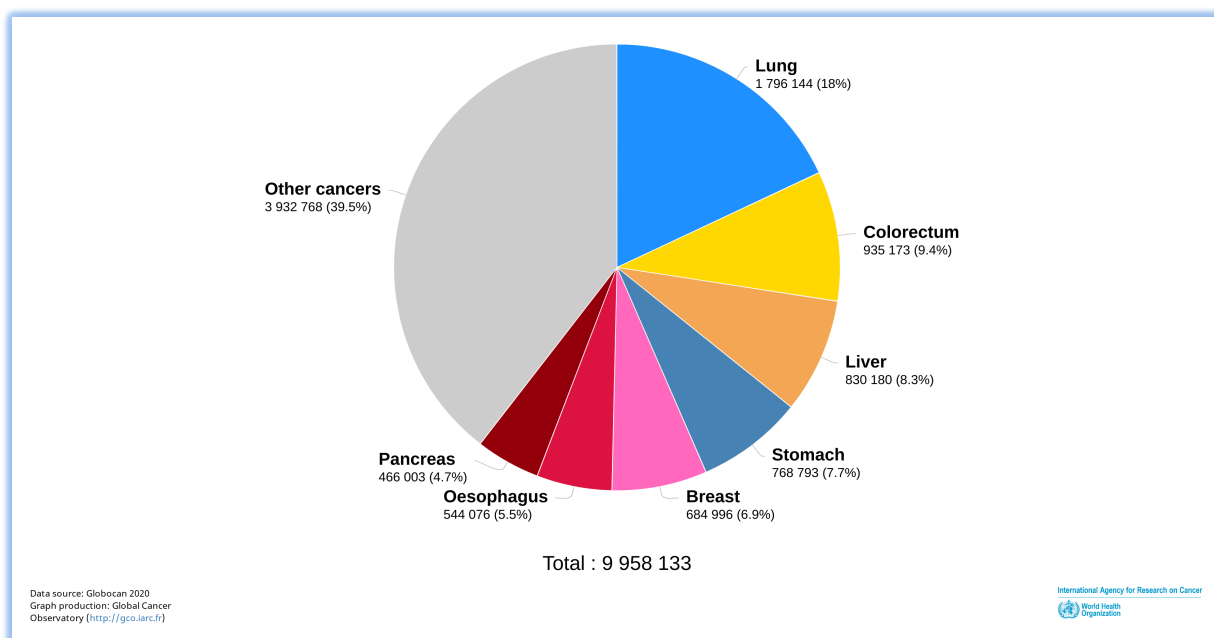


Figura 1. Estimación de la mortalidad por cáncer a nivel mundial en el 2020 para ambos sexos, todas las edades. Fuente: GLOBOCAN

En España, el cálculo de casos nuevos de CCR para el 2020 fue de 40.441 representando así el tumor más frecuente diagnosticado globalmente. La incidencia comparada con otros países europeos, ocupa una posición media, siendo más elevada en hombres. En éstos, es el segundo tumor más frecuente, por detrás del cáncer de próstata y en mujeres, también es el segundo por detrás del cáncer de mama. En relación a la mortalidad, es la segunda neoplasia responsable de mayor número de muertes en España (1,2) (Fig. 2).

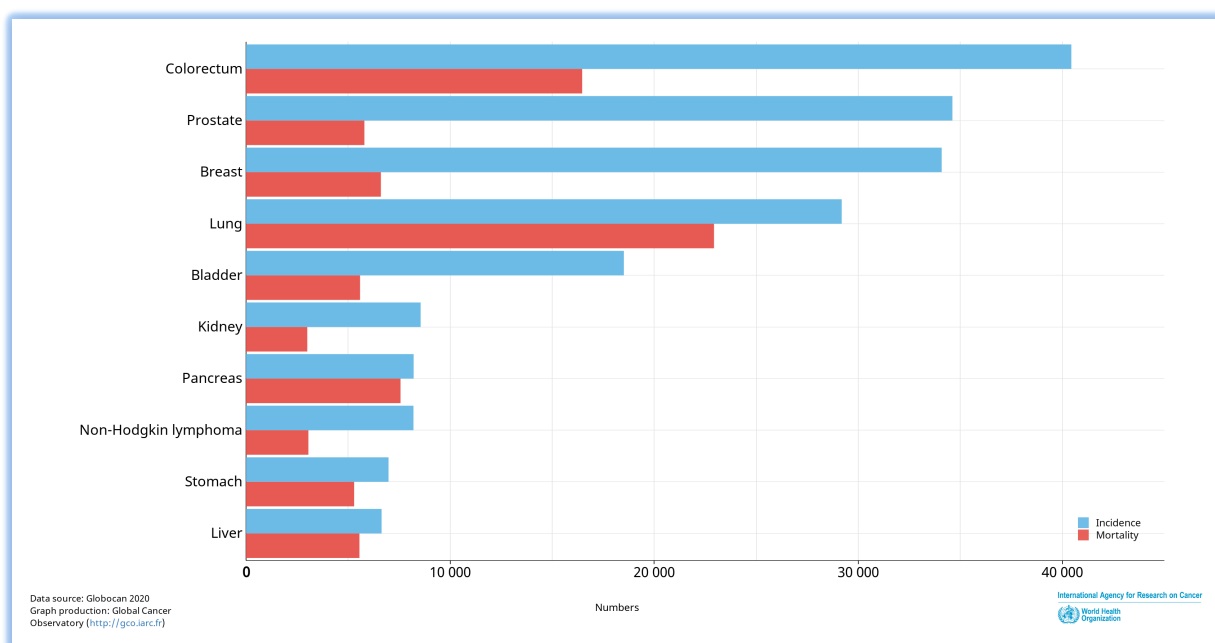


Figura 2. Estimación de la incidencia y mortalidad por cáncer en España en el 2020 para ambos sexos. Fuente: GLOBOCAN

La incidencia del CCR se incrementa de forma notable a partir de los 50 años, de ahí que el progresivo envejecimiento de la población y la exposición a riesgos ambientales sean los principales factores que influyan en la evolución del número de casos observados de CCR en nuestro país. La implementación reciente de los programas de cribado también es una circunstancia que determina la incidencia del mismo(41).

En Europa, el proyecto EUROCORE (European Cancer Registry Based Study on Survival and Care of Cancer Patients), proporciona información sobre la supervivencia global de los pacientes diagnosticados de cáncer. Este estudio sitúa la supervivencia media a los 5

años del cáncer de colon en el 57,1% y la del cáncer de recto en el 56,4% (3). Esta supervivencia depende fundamentalmente del estadio tumoral en el momento del diagnóstico. Los planes de cribado, que permiten la detección del CCR en estadios precoces, junto con los avances en el tratamiento y el mayor conocimiento de sus bases moleculares, han reducido la mortalidad del mismo (4,5).

1.1.2 Factores de riesgo

El CCR es el resultado de una combinación de factores genéticos y ambientales (6,7). Estos factores pueden interaccionar en las diferentes etapas del desarrollo del cáncer: durante la transformación de la mucosa colónica normal en lesiones precursoras (adenomas), durante el crecimiento de éstos y/o en la evolución hacia carcinoma posteriormente, con el transcurso de los años. Varios estudios indican que, entre los factores ambientales, hay algunos que podrían facilitar el proceso carcinogénico, mientras que otros actuarían como elementos protectores. Esta evidencia apoyaría la modificación de dichos factores para reducir el riesgo de enfermedad realizando intervenciones de prevención en la dieta o el estilo de vida (42,43).

Otras circunstancias que influyen en el desarrollo del CCR, como la edad o el sexo, no son modificables. Lo mismo ocurre con el riesgo en relación con los antecedentes personales (adenomas, enfermedad inflamatoria intestinal (EII)), los antecedentes familiares y los síndromes hereditarios.

1.1.2.1 Edad

El factor más relacionado con la incidencia del CCR sigue siendo la edad, ocurriendo la mayor parte de los diagnósticos en mayores de 50 años (*Fig. 3*). La mediana de edad en el momento de la detección del cáncer de colon es 68 y 72 años en hombres y mujeres, respectivamente; para los pacientes con cáncer de recto es 63 años para los dos sexos.

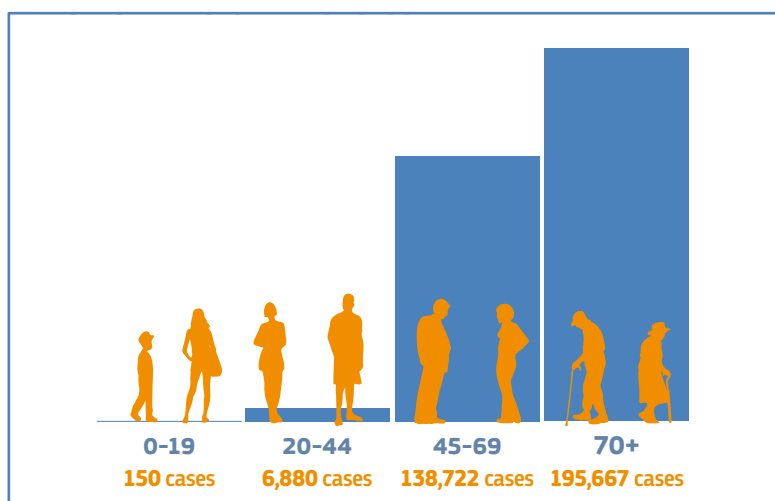


Figura 3. Distribución del cáncer colorrectal en Europa por edad. Fuente: European Cancer Information System

Recientemente se está observando un ligero descenso entre la población mayor de 50 años (posiblemente debido a los programas de cribado) frente a un aumento de la incidencia entre individuos más jóvenes. En EEUU, en pacientes con edades de los 20 a los 49 años, los diagnósticos se han incrementado un 26 % desde principios de los años 90 al 2013 (de 8.5 por 100.000 en 1992 a 10.7 por 100.000 en 2013). Pero el aumento más significativo ha ocurrido en el grupo de edad de los 40 a los 49 años (de 18.2 por 100.000 a 22.3 por 100,000), probablemente relacionado con factores de riesgo como la dieta y la obesidad (44,45).

1.1.2.2 Factores de riesgo ambientales

DIETA

Existen muchos estudios que señalan que la dieta puede contribuir a un incremento del riesgo de CCR. Se ha visto que en inmigrantes procedentes de zonas con menor incidencia de CCR, al adoptar los hábitos dietéticos occidentales, tienen incidencias similares a las de sus países de acogida. A pesar de ello es muy difícil demostrar qué alimentos o nutrientes pueden influir en el desarrollo del mismo porque no es posible aislar los diferentes componentes de la dieta (42).

Dieta rica en grasas

Los ensayos clínicos aleatorizados (ECA) disponibles en la literatura ofrecen una evidencia limitada con respecto al consumo de grasas y su relación con el riesgo de CCR. El estudio Women's Health Initiative, que incluye casi 50.000 mujeres postmenopáusicas, no pudo demostrar una reducción en el riesgo de CCR al disminuir la ingesta grasa de la dieta, incluyendo grasa animal, tras 8 años de seguimiento (46). Lo que sí se asocia a un mayor riesgo es el hecho de padecer obesidad (47).

Carne roja y carne procesada

El World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research (WCRF-AICR) concluye que existe suficiente evidencia para relacionar su consumo con un aumento del riesgo de CCR, aunque es marginalmente significativa (48). Esta asociación puede deberse a diferentes mecanismos. Por una parte, por los propios componentes de la carne (como proteínas y hierro) y por otra por los compuestos generados durante la cocción a altas temperaturas. Estas conclusiones están basadas en estudios observacionales y de cohortes con poblaciones heterogéneas pero han sido apoyados por varios metaanálisis. No se dispone de suficiente información para discriminar si hay mayor o menor riesgo según el tipo de carne roja o procesada (49).

Fibra, fruta y verdura

La fibra (grano entero, integral) se asocia con una disminución del riesgo de CCR. En un metaanálisis de 25 estudios prospectivos, el consumo de 10 g de fibra total al día se relacionó con un riesgo menor de CCR. Por este motivo, se recomienda la elevada ingesta de fibra en la dieta (50). Sin embargo, es más controvertido el efecto protector de las frutas y verduras. El estudio EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) realizó un seguimiento a 521.448 participantes en un periodo de 13 años y no demostró una clara asociación inversa entre el consumo de frutas y verduras y CCR (51). Cuando éstas se incluyen en las cantidades diarias recomendadas dentro de una dieta equilibrada se ha objetivado cierto beneficio, aunque no aumenta al incrementar su consumo.

Leche y productos lácteos

La leche y los productos lácteos son un factor de protección frente al CCR debido a su alto contenido en calcio tal y como muestra la última actualización de la revisión del WCRF-AICR (48). En un metanálisis de 19 estudios de cohortes se vio una asociación significativa con la reducción del riesgo de cáncer de colon y la ingesta de lácteos, aunque este beneficio no se observa con el queso y otros productos. Por el contrario, no se asociaron con una disminución del riesgo de cáncer de recto (52).

Pescado

Un aumento de 100 g/día de pescado se asocia con un 11 % de disminución del riesgo de CCR pero cuando se analizan por separado el cáncer de colon y el de recto los resultados no son tan consistentes para este último (48).

Micronutrientes

Los datos epidemiológicos sobre los micronutrientes y el CCR son heterogéneos. La ingesta de suplementos de ácido fólico no ha demostrado un efecto significativo sobre el riesgo de CCR según una revisión sistemática reciente. En 15 estudios observacionales prospectivos se ha objetivado una reducción del riesgo del CCR en un 8% cuando se realiza una dieta rica en calcio (53). Con respecto a los adenomas colorrectales se ha evidenciado un efecto protector tanto en el consumo de calcio como en el de suplementos de calcio, sobre todo para los adenomas avanzados (54).

Los datos obtenidos de estudios epidemiológicos y experimentales apoyan la potencial capacidad de la vitamina D en la quimioprevención del CCR, pero la evidencia de los ECA no es concluyente. En cuanto a los suplementos de vitamina A, vitaminas del grupo B, vitamina C y vitamina E, no han demostrado una asociación consistente con la disminución del riesgo de CCR (55,56).

ESTILO DE VIDA

Obesidad y síndrome metabólico

La obesidad incrementa el riesgo de CCR en un 16% sobre todo la obesidad abdominal. Así lo puso de manifiesto un metanálisis reciente en el que se observó una asociación significativa entre el CCR y mayor circunferencia de la cintura (57), relacionada también con el síndrome metabólico (58). Lo mismo ocurre con la diabetes mellitus, que aumenta de forma moderada el riesgo de cáncer de colon frente a personas no diabéticas. En este sentido, se recomienda prevenir las diferentes condiciones que conforman el síndrome metabólico para llevar a cabo la prevención del cáncer.

Actividad física

Un estilo de vida sedentario se ha asociado con el riesgo de CCR, más con el cáncer de colon que con el de recto. En un metanálisis de 21 estudios observacionales se ha observado que el ejercicio físico presenta una relación inversamente proporcional con el desarrollo de CCR, reduciendo el riesgo de cáncer de colon proximal en un 27% (59).

Alcohol

La actualización reciente de la revisión del WCRF-CUP (48) muestra asociación dosis-respuesta entre el consumo de alcohol y CCR, cáncer de colon y cáncer de recto. Un consumo moderado (2-3 bebidas al día) se asocia a un RR de 1.21 (IC del 95%, 1.13-1.28) mientras que cuando el consumo es severo (4 o más bebidas al día) el RR aumenta a 1.52 (60).

Tabaco

El tabaquismo es un factor de riesgo para el desarrollo tanto de CCR como de pólipos colónicos. En un metanálisis reciente de 30 estudios prospectivos se evidencia un RR en los fumadores actuales frente los que nunca han fumado de 1.09 (IC del 95%, 1.01-1.18) para el cáncer de colon y de 1.24 (IC del 95%, 1.16-1.39) para el de recto (61).

1.1.3 Prevención

1.1.3.1 Estratificación del riesgo de cáncer colorrectal

Aproximadamente el 75% de todos los casos diagnosticados de CCR son de tipo esporádico, y los restantes se relacionan con la historia familiar y/o EII; de los casos familiares, alrededor del 5% tienen un patrón de herencia mendeliano y se corresponden con los síndromes hereditarios. De esta manera, estratificamos el riesgo de desarrollar un CCR para poder ajustar los programas de cribado a cada grupo.

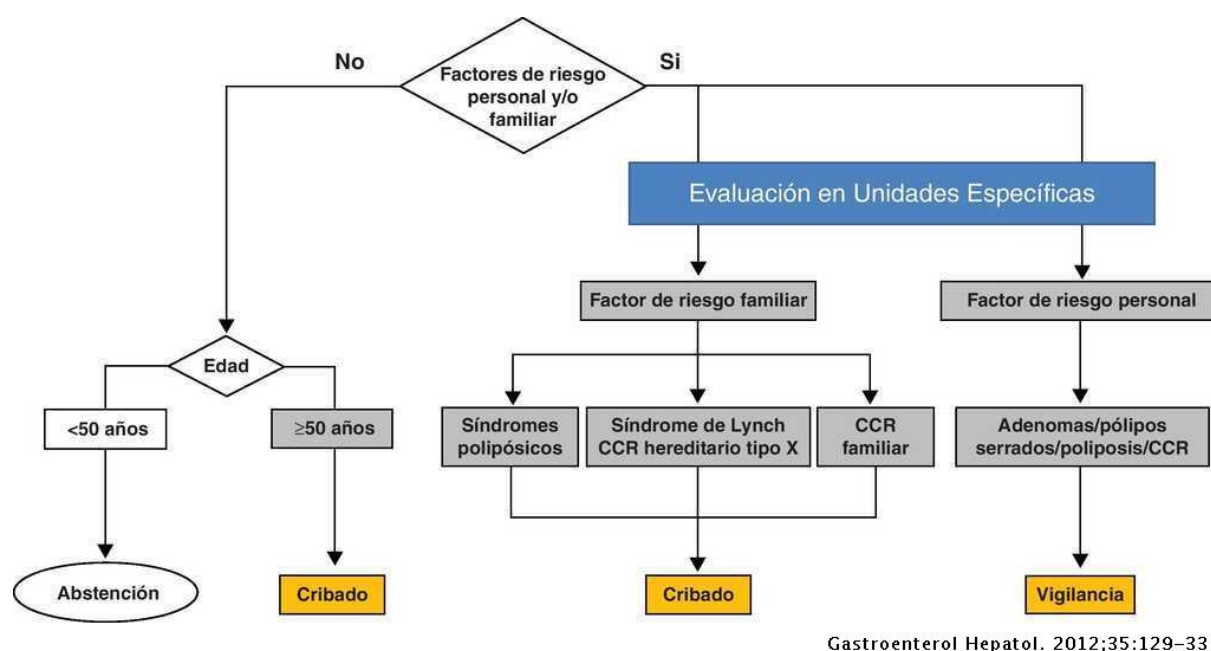


Figura 4. Estratificación del riesgo de cáncer colorrectal. Fuente: Cubiella J et al (41)

1.1.3.2 Cribado en la población de riesgo medio

El objetivo de la prevención secundaria es reducir la incidencia del cáncer al diagnosticar la enfermedad en estadios precoces o detectar lesiones precursoras. El hecho de tener una historia natural bien establecida y una lesión premaligna fácilmente tratable, el adenoma colorrectal, hace que el CCR sea considerado tributario de un programa de cribado poblacional. Su implementación es altamente coste-efectiva y es capaz de reducir la mortalidad asociada a esta enfermedad (43).

Las personas mayores de 50 años sin factores de riesgo añadidos, son los que se consideran la población de riesgo medio de CCR y es a ellos a los que van dirigidos los programas de prevención. Existen 4 grupos de pruebas diagnósticas de cribado: pruebas en heces, pruebas endoscópicas, pruebas de imagen y biomarcadores en sangre periférica. La última actualización del 2018 de la guía para el diagnóstico y la prevención del CCR de la Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria y la Asociación Española de Gastroenterología (41) (AEG), realiza unas recomendaciones sobre las diferentes métodos de cribado, que se resumen en la figura 4.

Los test de sangre oculta en heces (TSOH) determinan la Hemoglobina (Hb) fecal y hay dos tipos: uno químico o método de guayaco (SOHg) y uno inmunológico (SOHi). Están basados en la friabilidad de los tumores y de los adenomas, que les ocasiona pérdidas de sangre indetectables en las heces a simple vista. El SOHi tiene la ventaja de poder ser un test cuantitativo, que precisa de una sola muestra y que no requiere restricción dietética ni de fármacos previamente.

Los metanálisis de ECA realizados por la US Preventive Services Task Force (USPSTF), la Canadian Task Force (CTF) y la Cochrane revelan resultados similares con respecto a la prevención del CCR con SOHg. Todos coinciden en que es capaz de reducir la mortalidad por CCR, pero no disminuye la mortalidad global. No disponemos de ECA bien diseñados para evaluar la eficacia del SOHi en términos de reducción de la incidencia y la mortalidad del CCR, pero estudios recientes de tendencia temporal en áreas geográficas donde se ha instaurado el cribado, apoyan su efectividad. Lo que sí se ha constatado es que el test de SOHi tiene una mayor validez diagnóstica del test para detectar neoplasia avanzada (62–64).

El cribado con sigmoidoscopia flexible ha demostrado disminuir la incidencia y mortalidad del CCR sobre todo en individuos mayores de 60 años y con tumores de localización distal. Cuando se compara de forma indirecta con el TSOH las diferencias no son significativas, pero parece aportar mayor beneficio frente al cribado con SOH bienal. En cuanto a la prevención con colonoscopia, carecemos de evidencias de su efecto sobre la incidencia y mortalidad del CCR. Hay 4 ECA en curso que analizan su validez. El estudio COLONPREV, propuesto por la AEG, compara la eficacia para disminuir la mortalidad a los

10 años de una colonoscopia única contra el SOH bienal. Los resultados preliminares reflejan que la colonoscopia diagnóstica más adenomas avanzados pero la tasa de detección de CCR es similar en ambas pruebas (64). La colonoscopia es, hoy en día, el test de cribado menos aceptado, más cara y con más riesgos.

Tabla 1. Recomendaciones de las pruebas de cribado en la población de riesgo medio. Guía clínica de diagnóstico y prevención del CCR (41)

PRUEBAS DE CRIBADO RECOMENDADAS	PRUEBAS DE CRIBADO NO RECOMENDADAS
⇒ Una sola determinación de SOHi cada dos años entre los 50 y los 75 años de edad	⇒ Detección de ADN en heces
⇒ La sigmoidoscopia flexible si está disponible, con un intervalo entre ellas de 10 años	⇒ La colonoscopia
	⇒ La colonografía TC (salvo colonoscopia contraindicada o incompleta tras SOH positiva)
	⇒ La cápsula endoscópica de colon (salvo colonoscopia contraindicada o incompleta tras SOH positiva)
	⇒ Biomarcadores en sangre periférica

1.1.4 Etiopatogenia

1.1.4.1 Historia natural

El conocimiento de los mecanismos implicados en la aparición y desarrollo del CCR ha sufrido un gran avance a lo largo de los últimos años. La historia natural del CCR consta de una serie de etapas evolutivas, que se van solapando unas con otras, en las que las células adquieren un comportamiento invasor, y que conduce en última instancia a la formación de un tumor. Este proceso se llama carcinogénesis y es una secuencia compleja de eventos moleculares genéticos y epigenéticos (ambientales) que le van a conferir una gran heterogeneidad al CCR y que es necesario entenderlos ya que tienen implicación en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad (6–9).

Gran parte de los CCR se originan a partir de lesiones benignas denominadas pólipos, que son lesiones precursoras que surgen en la mucosa colónica sana cuando existe una

alteración en el sistema que controla la renovación celular epitelial. Estos pólipos, a su vez, presentan una proliferación excesiva y una diferenciación anormal, que puede evolucionar al CCR. Esta transformación puede durar años y no todas estas lesiones preneoplásicas crecen (algunos se mantienen estables e incluso regresan) y se convierten en lesiones avanzadas con más capacidad de transformación maligna (65). De entre todos los pólipos, los adenomatosos son los más frecuentes y los que más se han involucrado en la aparición del CCR, seguidos de los adenomas serrados. Este modelo de carcinogénesis implicado en el desarrollo del CCR y basado en la secuencia “adenoma-carcinoma” fue descrito por Volgestein y cols. en 1990 y, a día de hoy, es el modelo más predominante (66).

Desde el punto de vista molecular, en el CCR se han identificado tres vías de carcinogénesis bien diferenciadas que permiten clasificarlo en distintos fenotipos: vía de inestabilidad cromosómica o vía supresora, que es la más frecuente; la vía de inestabilidad de microsatélites (IMS) o vía mutadora y, por último, el fenotipo metilador de las islas CpG (CIMP) o vía serrada. Debido a la heterogeneidad de la enfermedad, estas vías no son excluyentes entre sí.

1.1.4.2 Vías de carcinogénesis

Vía de la inestabilidad cromosómica

La inestabilidad cromosómica (CIN) es la vía patogénica más frecuente, estando presente en el 70-75% de los CCR esporádicos, aunque también se encuentra en síndromes hereditarios como la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) (67). La característica primordial de estos tumores es la alteración en el cariotipo debido a la pérdida o ganancia de cromosomas (aneuploidía) y como consecuencia de ello, una pérdida de heterocigosidad (LOH o Loss Of Heterozygosity).

En esta vía coexisten tanto la activación de oncogenes como el *KRAS* y *c-MYC* como la inhibición de genes supresores del crecimiento tumoral (*APC*, *DCC*, *gen p53*) (Fig. 4). El acontecimiento que pone en marcha la vía es la mutación del gen supresor APC, y por ese motivo también es conocida como **vía supresora**. Esto provoca una sobreestimulación de la vía denominada wingless (Wnt) y promueve la proliferación celular, transformando

una mucosa colónica normal en focos de criptas aberrantes. A continuación, aparece la mutación en el oncogén *Kras* que favorece el crecimiento de adenomas pequeños y por último, hay una transformación progresiva a adenomas avanzados y a carcinoma gracias a eventos genéticos alterados en las vías *SMAD 2/4*, *PIK3CA*, *P53*, *DCC* y *TFG-β* (9,67).

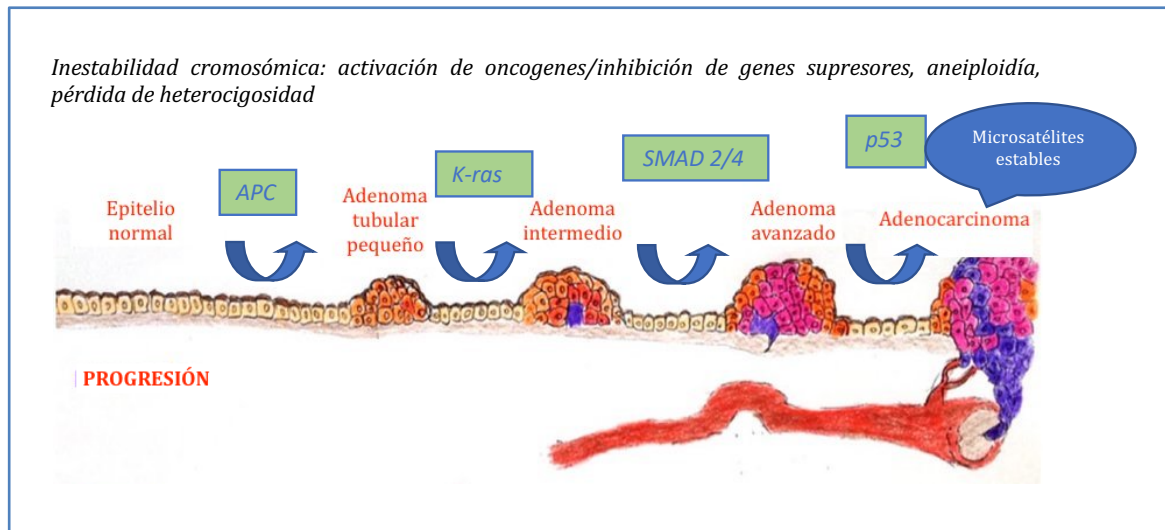


Figura 5. Vía de carcinogénesis de la inestabilidad cromosómica. Imagen adaptada de Ahnne DJ.(68)

Vía de la inestabilidad de microsatélites

La segunda vía oncogénica en frecuencia se caracteriza por una alteración del sistema de reparación de errores durante la replicación del ADN, que está controlada por los genes de los microsatélites o mismatch repair (MMR). Este sistema está formado por varios genes, entre ellos *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* y *EPCAM*, que además codifican proteínas que son las que desempeñan la función correctora. Los microsatélites son secuencias únicas, repetitivas de nucleótidos que en condiciones normales están distribuidas a lo largo de todo el genoma y que tienen tendencia a presentar inserciones o deleciones, que son reparadas por los genes reparadores de errores. Si estos genes están inactivos no se expresa su proteína correspondiente, se produce una acumulación de secuencias repetidas de ADN durante su replicación. Cuando afectan a microsatélites de oncogenes o genes supresores del crecimiento tumoral los errores en el ADN continúan y se produce así el fenómeno de la inestabilidad de microsatélites (IMS). Esta circunstancia favorece la generación de miles de mutaciones por lo que esta vía molecular también se denomina **vía mutadora** (11,69,70).

Para llevar a cabo la reparación de apareamientos erróneos estas proteínas deben constituir heterodímeros, *MSH2* con *MSH6* que reconocen el error y *MLH1* con *PMS2* que dirigen la reparación. En cada uno de ellos hay una proteína dominante (*MLH1* y *MSH2*) y una dependiente (*MSH6* y *PMS2*). Las primeras se expresan independientemente del estado de su compañera mientras que las segundas, no se expresan en ausencia de su pareja (71). Más del 90 % de los CCR son debidos a mutaciones en *MLH1* sobre todo y *MSH2*, en menor grado.

El fenotipo de la IMS está presente en el 10-15 % de todos los CCR. Alrededor del 75 % son de tipo esporádico si bien el resto son tumores de origen hereditario (el arquetipo es el síndrome de Lynch). El SL representa el 3% de todos los CCR y en él existe una mutación a nivel germinal (presente en el ADN constitucional) de algunos de los genes del sistema MMR. En contraposición, en los tumores esporádicos la alteración es epigenética y solamente se encuentra en las células tumorales. En estos casos, la causa de la IMS es la hipermetilación de la región promotora de algunos de los genes del sistema de reparación del ADN (fundamentalmente el gen *MLH1*), que tiene como consecuencia la pérdida de expresión proteica por la inactivación de la transcripción (10,72,73).

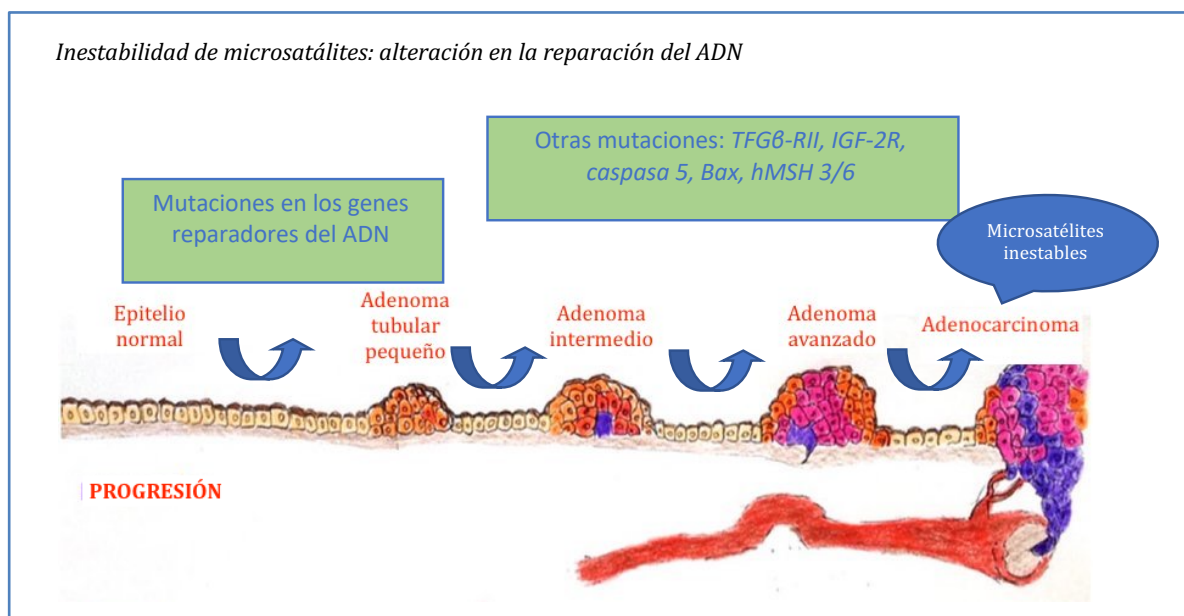


Figura 6. Vía de carcinogénesis de la inestabilidad de microsatélites. Imagen adaptada de Ahnne DJ.(68)

Vía serrada

Existe una tercera vía de carcinogénesis descrita en el año 1999, la vía serrada, que es la responsable del 15-20 % de los CCR. El mecanismo primordial de su oncogénesis es el silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores causado por la hipermetilación de las islas CpG (CIMP) en las regiones promotoras. Este es el motivo por el cual también se la llama **vía metiladora** o CIMP. A diferencia de las otras dos vías no sigue la secuencia clásica adenoma-carcinoma sino que surge de otra lesión precursora: los pólipos serrados (incluye a pólipos hiperplásicos, lesiones serradas sesiles, y adenomas serrados tradicionales) (74–78).

Hay dos subtipos de vía serrada en función del grado de metilación:

- a) Mutaciones en el gen *BRAF* (alto grado de metilación). Es el primer acontecimiento que ocurre seguido de cambios epigenéticos como la hipermetilación de las islas CpG y la inhibición de la apoptosis fisiológica a nivel de las células epiteliales del colon, promoviendo el desarrollo de IMS. Aparecen predominantemente en el colon derecho y suelen surgir a partir de adenomas serrados sésiles.
- b) Mutaciones en el gen *KRAS* (bajo grado de metilación). La mutación *KRAS* altera la vía *RAS/RAF/MAPK* y su lesión precursora es el adenoma serrado tradicional. Son más frecuentes en el lado izquierdo.

1.1.5 Diagnóstico endoscópico

La colonoscopia es la exploración de elección para diagnosticar el CCR, puesto que además de detectar el tumor nos permite tomar biopsias para un estudio histológico y descartar la existencia de lesiones sincrónicas en el resto del colon. La colonoscopia debe ser completa y en el caso de no poder realizarse se recomienda practicar otras pruebas de imagen como una colonografía por TC.

A día de hoy, no existen guías clínicas en las que se indique el número óptimo de biopsias que se deben tomar para diagnosticar un CCR, y esto es debido a la falta de estudios bien diseñados que lo determinen (79). Solo hay un estudio prospectivo del año 1993 con 70 pacientes que recomendaba la toma de 4 a 6 biopsias (80) para rentabilizar el diagnóstico.

Se han publicado posteriormente otros 2 trabajos retrospectivos y con escaso número de enfermos, que concluyeron que la sensibilidad diagnóstica era cercana al 100% cuando se tomaban 6 (81) y 7 (82) biopsias respectivamente. En todos ellos se ha puesto de manifiesto que la sensibilidad diagnóstica incrementa con el número de biopsias extraído y esto es debido a la heterogeneidad dentro del tumor y en muchas ocasiones, al componente de adenoma en el mismo.

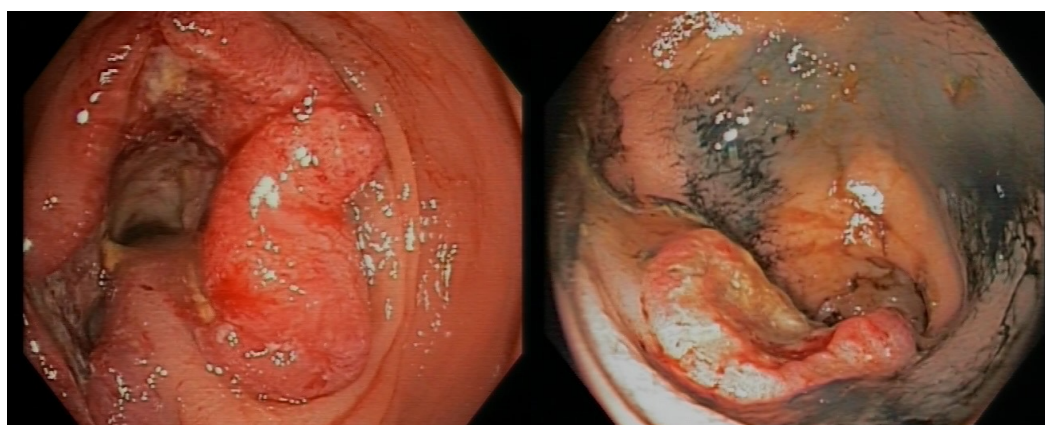


Ilustración 1. Imágenes endoscópicas de cánceres colorrectales.

Lesiones excrecentes, mamelonadas, irregulares, friables y ulceradas.

1.1.6 Clasificación

1.1.6.1 Clasificación anatómica

Los tumores situados distalmente al ángulo esplénico se consideran izquierdos mientras que los proximales a esta flexura son derechos. La lateralidad del tumor primario se ha descrito en los últimos años como un factor pronóstico importante en los pacientes con CCR y con CCRm. Así, se asocia a un peor pronóstico los que tienen tumores en el colon derecho, con peor respuesta al tratamiento, peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (83).

1.1.6.2 Clasificación histológica

El adenocarcinoma (ADC) es, con diferencia, la forma más frecuente representando más del 90 % de los CCR. Se definen por la invasión de la submucosa a través de la muscularis mucosae. Aunque la mayoría de los casos son adenocarcinoma NOS, se pueden distinguir además otros subtipos histopatológicos con características clínicas y moleculares específicas. En el colon también pueden aparecer tumores no epiteliales como los linfomas o los sarcomas. La clasificación histológica de la OMS para CCR es la más aceptada (84–86)(tabla 2).

Tabla 2. Clasificación histológica de los tumores colorrectales (mod.OMS 2010, 5ª)

TUMORES EPITELIALES	TUMORES NO EPITELIALES
• Adenoma - Tubular - Velloso - Tubulo-velloso - Serrado • Neoplasia intraepitelial glandular (de alto o bajo grado) asociada a EII • Adenocarcinoma NOS - Adenocarcinoma adenoma-like - Adenocarcinoma serrado - Adenocarcinoma micropapilar - Adenocarcinoma mucinoso - Carcinomas de células en anillo de sello - Carcinoma pobremente cohesivo - Carcinoma adenoescamoso - Adenocarcinoma medular - Carcinoma indiferenciado • Tumores neuroendocrinos	• Lipoma • Leiomioma • Tumor del estroma gastrointestinal (GIST) • Leiomiosarcoma • Angiosarcoma • Sarcoma de Kaposi • Melanoma maligno • Ganglioneuroma • Schwannoma • Tum. células granulares • Perineuroma • Linfomas

Los adenocarcinomas se clasifican en:

- a. Adenocarcinoma NOS: es el más frecuente de los CCR y se origina en el epitelio glandular de la mucosa con variabilidad en el tamaño y el porcentaje de las estructuras glandulares (Ilustración 2). En función de ello se subdivide en bien diferenciados (>95% del tumor formado por glándulas), moderadamente diferenciados (50-95 % del tumor formado por glándulas) y pobremente diferenciados (5-50% del tumor formado por glándulas).

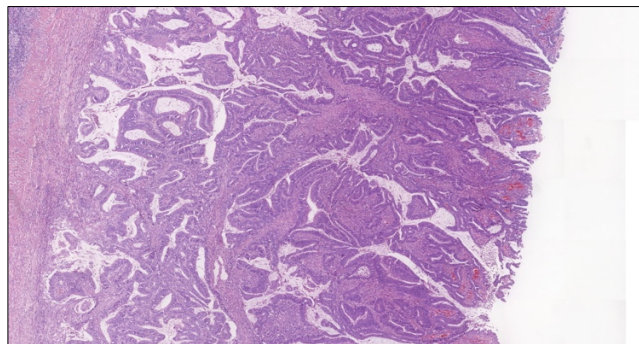


Ilustración 2. Adenocarcinoma convencional (NOS).

- b. Adenocarcinoma mucinoso: se denomina así porque más del 50% de la lesión está formada por mucina extracelular. Suele estar situado en el lado derecho del colon, se detecta en estadios más avanzados y tiene con mayor frecuencia IMS (Ilustración 3).

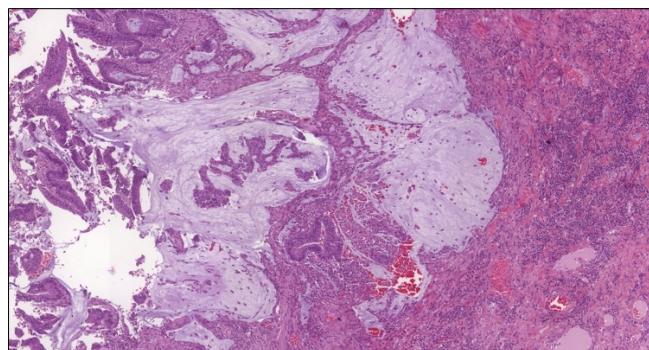


Ilustración 3. Adenocarcinoma mucinoso.

- c. Adenocarcinoma de células en anillo de sello: se define por la presencia de > 50% de células tumorales con mucina intracitoplasmática que desplaza al núcleo y le confiere el típico aspecto de “anillo de sello”. Son tumores infrecuentes, pero con mayor potencial de diseminación.
- d. Adenocarcinoma medular: es una variante rara que se asocia a IMS y el síndrome de Lynch, pero tiene buen pronóstico. Se caracteriza por una importante infiltración linfocitaria intraepitelial.
- e. Carcinomas indiferenciados: son aquellos que tienen < 5% del tumor con componente glandular (Ilustración 4).

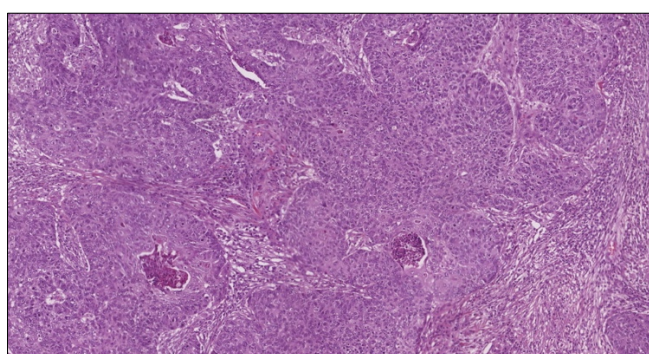


Ilustración 4. Carcinoma indiferenciado.

1.1.6.3 Clasificación según el grado de invasión

Tras el diagnóstico del CCR se debe realizar una estadificación ya que la extensión tumoral condiciona el tratamiento y es el mejor medidor del pronóstico a largo plazo. La diseminación del CCR se puede producir por contigüidad, por vía linfática y por vía hematógena, siendo las metástasis más frecuentes las hepáticas, por el drenaje venoso del sistema portal. Los cánceres de recto tienen un drenaje directo a la vena cava inferior a través del plexo hemorroidal por lo que pueden metastatizar de inicio en el pulmón.

Aunque se han utilizado desde hace años diferentes clasificaciones para estadificar los tumores colorrectales como la de Dukes o la de Astler-Coller, la clasificación más empleada actualmente es la de la AJCC (American Join Committee on Cancer) basada en el sistema TNM.

El sistema AJCC/TNM tiene en cuenta el tamaño-extensión tumoral (T), la presencia o ausencia de afectación linfática regional (N) y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M) (Tabla 3). Los estadios se clasifican en 5 categorías que se señalan con números romanos (del 0 al IV) y se establecen a partir de la combinación de las variables T, N y M (Tabla 4)(87).

Tabla 3. Clasificación TNM del cáncer colorrectal. AJCC 8ª Ed. 2017

TUMOR PRIMARIO (T)	
Tx	Tumor primario no ha podido ser evaluado
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Tumor limitado a la mucosa. In situ.
T1	Invasión de submucosa sin alcanzar la muscular propia
T2	Invasión de muscular propia
T3	Desde la muscular propia hasta los tejidos que rodean el colon sin alcanzar peritoneo
T4a	Afectación del peritoneo visceral
T4b	Afectación de órganos vecinos
GANGLIOS REGIONALES (N)	
Nx	Ganglios no han podido ser evaluados
N0	No evidencia de adenopatías regionales
N1	1-3 adenopatías regionales afectadas
N1a	1 adenopatía con metástasis
N1b	2-3 adenopatías con metástasis
N1c	No hay adenopatías regionales positivas, pero sí hay depósitos tumorales en subserosa o en tejido adiposo subseroso.
N2	>4 adenopatías regionales con metástasis
N2a	4-6 adenopatías con metástasis
N2b	≥7 adenopatías con metástasis
METÁSTASIS A DISTANCIA (M)	
M0	No evidencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Afectación de un órgano a distancia (sin afectación peritoneal)
M1b	Afectación de más de un órgano a distancia (sin afectación peritoneal)
M1c	Afectación peritoneal (carcinomatosis peritoneal con o sin afectación de órganos a distancia)

Tabla 4. Clasificación por estadios del cáncer colorrectal. AJCC 8ª Ed. 2017

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

1.1.6.4 Clasificación molecular de consenso

En el año 2015 se formó un consorcio internacional de expertos con el fin de crear una clasificación que tuviera mayor aplicación clínica. De esta manera, el Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC) elaboró la “Clasificación molecular de consenso” (CMS) teniendo en cuenta las vías de carcinogénesis, el estado mutacional de los genes *BRAF*, *KRAS* y *PI3KCA* y las propiedades clínico-patológicas. Se definieron 4 subgrupos moleculares categorizados de CMS 1 a 4 (*Fig. 7*): CMS1 o grupo de inestabilidad de microsatélites inmune, CMS2, canónico o epitelial, CMS3 o metabólico y CMS4 o mesenquimal. Casi un cuarto de los CCR no pudieron ser clasificados en ninguno de los 4 subtipos (13,15,74).

CMS1 MSI inmune	CMS2 Canónico	CMS3 Metabólico	CMS1 Mesenquimal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP alto, hipermutación	SCNA alto	MSI mixto, SCNA bajo, CIMP bajo	SCNA alto
Mutaciones <i>BRAF</i>	Mutaciones <i>KRAS</i>		
Infiltración y activación inmune	Activación WNT y MYC	Desregulación metabólica	Infiltración estromal, activación TFG- β , angiogénesis
Peor supervivencia tras la recaída	Peor SLP y SG		

Figura 7. Clasificación molecular de consenso del CCR (adaptada de Guinney J et al. Nat Med 2015). SCNA: alteración de número de copias somático. SLP: supervivencia libre de progresión. SP: supervivencia global

1.1.7 Biomarcadores en el cáncer colorrectal

Existen biomarcadores en el CCR con capacidad diagnóstica, pronóstica y terapéutica en cuya investigación se ha progresado en los últimos años. Algunos de ellos son marcadores relevantes del CCR localizado mientras que otros lo son del CCR avanzado. Vamos a describir los más significativos.

1.1.7.1 BRAF

La mutación más común del gen *BRAF* es la V600E, en la que se sustituye valina por glutamato en el codón 600 del cromosoma 7 y está presente en el 8-10% de los pacientes con CCR metastásico. Se relaciona con la vía serrada de carcinogénesis. Es más frecuente en tumores pobremente diferenciados, con componente mucinoso, en el lado derecho, en el sexo femenino, y se asocian a la presencia de carcinomatosis peritoneal (88,89).

La existencia de mutaciones en *BRAF* confiere mal pronóstico a los pacientes con CCR esporádico, ya que en ausencia de IMS (pacientes con *BRAF* mutado y MSS), se ha demostrado una disminución significativa de la supervivencia libre de enfermedad (SLP)

y de la supervivencia global (SG). Asimismo, también hay estudios recientes que apoyan el valor predictivo del *BRAF* y que muestran una pobre respuesta al tratamiento adyuvante con anti-EGFR (8,90).

1.1.7.2 RAS

Los genes *RAS* (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*) son integrantes de la familia de las RAS-quinasas y su mutación es la más frecuente (50 % de los pacientes) e importante por su relevancia clínica en el CCR metastásico. Como factor predictivo, la propiedad fundamental de estos tumores es la ausencia de respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR (inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico) como panitumumab y cetuximab(8,90).

1.1.7.3 Inestabilidad de microsatélites

La inestabilidad de microsatélites (IMS) está presente en el 15 % de los CCR en estadio II, en el 10 % de los estadios III y en el 4 % de los pacientes con estadio IV. En numerosos estudios la IMS se ha vinculado a un mejor pronóstico en los estadios II y III (menor tasa de recaídas y mayor SG) (8,90) que los tumores estables. Esto ocurre tanto en CCR esporádico como familiar. Por el contrario, el pronóstico no es tan bueno en los estadios IV probablemente por la asociación de la mutación *BRAF*. Además, la IMS tiene un valor predictivo de respuesta al tratamiento adyuvante con fluoropirimidinas, demostrando en diferentes series, que los tumores inestables en estadios II no responden a la quimioterapia y por tanto no se benefician de ella (91,92). Hay dos estudios nuevos que han puesto de manifiesto el posible poder predictivo del status MMR y la inmunoterapia, de ahí que las guías NCCN recomienden su estudio en todos los pacientes con CCR metastásico (30,93).

1.1.8 Tratamiento

1.1.8.1. Cirugía

La cirugía es el tratamiento de elección en los CCR localizados y su intención es la extirpación del tumor con márgenes de seguridad y de los ganglios locorregionales

correspondientes. Se considera una cirugía óptima aquella que consigue un margen distal de al menos 5 cm en el cáncer de colon y de 1 cm en cáncer de recto, y con una disección y estudio histológico de al menos 12 ganglios para poder realizar una correcta estadificación (94). La resección quirúrgica se considera oncológicamente completa (resección R0) cuando los márgenes microscópicos son negativos; resección R1, cuando la extirpación tumoral macroscópica ha sido completa, pero los márgenes microscópicos son positivos o incompleta (resección R2), cuando la extirpación tumoral macroscópica ha sido incompleta.

La técnica quirúrgica variará según la localización del tumor primario, su vascularización y el drenaje linfático. La situación pélvica y en parte extraperitoneal del cáncer de recto condiciona su abordaje y manejo. Así, tras su estudio de extensión con TAC y resonancia magnética pélvica, en algunos casos está indicado realizar un tratamiento previo con quimioterapia y radioterapia para disminuir la tasa de recaídas locales. Este manejo multidisciplinar del cáncer de recto junto a la estandarización de la técnica quirúrgica de escisión mesorrectal total propuesta por Heald, (95) ha conseguido disminuir la tasa de recaídas locales de un 40% en las series históricas, a menos del 10% en la actualidad (96).

La cirugía mínimamente invasiva (laparoscópica o robótica) cuando es posible, ofrece similares resultados en cuanto a la tasa de supervivencia global y tasa de recaída local, con el beneficio de una menor agresión quirúrgica, menor tiempo de hospitalización y retorno más precoz a la vida normal previa (97–99).

La cirugía tiene además un papel importante en el tratamiento de las metástasis, que están presentes en el momento del diagnóstico en un 20 % de los pacientes con CCR (metástasis sincrónicas) (100). La localización más habitual es la hepática (70%), seguida por el pulmón y el peritoneo (21%). Aunque a lo largo de años se planteaba el CCR metastásico (CCRm) como una situación clínica terminal, la mejor selección de candidatos a la cirugía hepática, pulmonar y peritoneal, junto a la aparición de nuevos fármacos, han aumentado las tasas de supervivencia a 5 años casi al 40% (100,101). A esto también ha contribuido la creación de comités multidisciplinarios para la toma de decisiones terapéuticas y la mayor participación de los cirujanos en el tratamiento del CCRm (102).

1.1.8.2 Tratamiento adyuvante

En los años 80 se demostró que la quimioterapia (QT) complementaria tras la cirugía del cáncer de colon con intención curativa aumentaba la supervivencia de la enfermedad. Los avances a lo largo de estas décadas en el estudio del CCR han permitido el aumento del arsenal terapéutico. Actualmente disponemos de fármacos citostáticos de gran eficacia como el 5-Fluoruracilo, las fluoropirimidinas orales (capecitabina), el oxaliplatino y el irinotecan. Los últimos en incorporarse al tratamiento del CCR han sido los fármacos antiangiogénicos o anticuerpos monoclonales frente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (bevacizumab, aflibercept, regorafenib y ramucirumab) y los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a EGFR (cetuximab y panitumumab). Estos nos han permitido realizar terapias dirigidas en pacientes exclusivamente en aquellos pacientes con perfiles moleculares donde estos fármacos son útiles.

La QT adyuvante es de uso habitual en pacientes con estadio III de bajo riesgo (T1-3, N1) con 3 meses de CAPEOX o 3-6 meses de FOLFOX, y en pacientes con estadio III de alto riesgo (T4, N1-2 o cualquier T, N2) con preferencia por 6 meses de tratamiento con FOLFOX (94). Su empleo en pacientes con estadio II es mucho más discutido a la luz de los resultados del ensayo MOSAIC y la posibles secuelas de la quimioterapia basada en oxaliplatino (103).

En el momento actual la QT adyuvante se recomienda solo en los casos de estadios II con riesgo elevado de recurrencia: estabilidad de microsatélite, enfermedad avanzada (pT4), invasión linfovascular, invasión perineural, tumores pobremente diferenciados, tumor budding, y menos de 12 ganglios linfáticos analizados, perforación al diagnóstico o margen afecto (104,105).

La elección del esquema de QT dependerá de la edad, el estado general del paciente, la comorbilidad y de su voluntad entre otros, y la administración del mismo debe ser en las 8 semanas tras la cirugía. Los regímenes de tratamiento más utilizados son FOLFOX (5-Fluoruracilo ó 5-FU, leucovorín y oxaliplatino), y XELOX (oxaliplatino y capecitabina).

La radioterapia adyuvante sólo se contempla en tumores de recto que no se han irradiado con intención neoadyuvante y que presentan resecciones incompletas o márgenes afectados.

1.1.8.3 Tratamiento neoadyuvante

El tratamiento neoadyuvante en el cáncer de colon previo a la cirugía se ha establecido después de los resultados del ensayo FOxTROt en pacientes con cáncer de colon T3 con más de 5mm de invasión de la muscular o T4 en el estudio de TC. Una regresión histológica se evidenció en el 59% de los pacientes que recibieron neoadyuvancia con una disminución en la tasa de resecciones incompletas. Con un seguimiento de 2 años la tasa de recaídas locales o sistémicas también fue menor en el grupo de estudio pero sin conseguir una significación estadística (106).

En cuanto a la neoadyuvancia en el cáncer de recto, en pacientes seleccionados de alto riesgo (T3-T4 de tercio medio-inferior, con amenaza o afectación de fascia mesorrectal, o afectación del aparato esfintérico) el objetivo es conseguir reducir la tasa de recaídas locales y aumentar las resecciones quirúrgicas completas. Así, tres estudios randomizados (Intergroup 0147, NSABP R-03 y CAO/ARO/AIO-94) han comparado la QT+RT preoperatoria con la postoperatoria en cáncer de recto. En el estudio alemán (106) aleatorizaron 799 pacientes con estadios II y III de cáncer de recto a regímenes de 5FU infusión continua concurrente con RT. Tras la cirugía, se administraban 4 ciclos más de 5FU. Con una mediana de seguimiento de 4 años, no se observaron diferencias en la supervivencia global a 5 años. Sin embargo, las toxicidades grado 3-4, la respuesta del tumor, la tasa de preservación de esfínteres y las recidivas pélvicas fueron favorables en el grupo estudio (107).

1.2 Síndromes hereditarios de cáncer colorrectal

El CCR tiene una etiología heterogénea en la que influyen factores genéticos y ambientales. Epidemiológicamente, el *CCR esporádico* es el más frecuente y aparece generalmente en individuos mayores de 50 años sin factores de riesgo personales asociados ni antecedentes familiares de esta neoplasia (*Fig. 8*). En segundo lugar, en torno a un 25-30 %, está el *CCR familiar* que se presenta en personas que no cumplen criterios diagnósticos para un síndrome hereditario, pero tienen una fuerte agregación familiar sin un patrón de herencia mendeliano. Cuando existe una alteración genética bien definida

por una mutación germinal, surgen las *formas hereditarias* de CCR (principalmente el SL y los síndromes de poliposis intestinal) que son las responsables de un 3-5 % de todos los cánceres. Finalmente, los tumores que aparecen en el contexto de una EII de larga evolución, debido al efecto carcinogénico de la inflamación mucosa, suponen < 1 % (19,108).

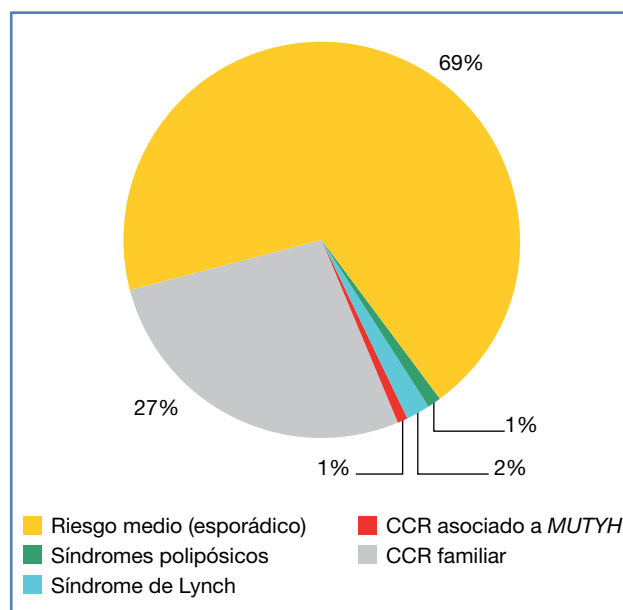


Figura 8. Distribución epidemiológica de las formas de cáncer colorrectal /Tomada del artículo original (A. Castells, Gastroenterol Hepatol 2016)

1.3 Síndrome de Lynch

El síndrome de Lynch (SL), también llamado CCR hereditario no polipósico (HNPCC), es el más frecuente de las formas hereditarias de CCR y tiene una herencia autosómica dominante con una penetrancia del 80% (109). Las características fundamentales de los tumores colónicos que se desarrollan en el SL son: aparición temprana (generalmente < 50 años), localización en el lado derecho, grado de diferenciación bajo, componente mucinoso o medular, infiltrado linfocitario y asociación a lesiones sincrónicas o metacrónicas (110). Este síndrome también predispone a la aparición de neoplasias extracolónicas como el el cáncer de endometrio, estómago, ovario, intestino delgado, páncreas, vías urinarias, vía biliar y próstata, entre otros (111). Otro rasgo distintivo de

esta entidad es la existencia de una aceleración en la carcinogénesis, de manera que la transformación de un adenoma a un carcinoma ocurre en 2-3 años.

A nivel molecular, en el SL hay una mutación en la línea germinal de algunos de los genes del sistema de reparación de errores durante la replicación del ADN o mismatch repair (MMR), principalmente *MLH1* (50%), *MSH2* (40%), *MSH6* (5-10%) y *PMS2* (< 5%) (25). Esto conduce a la existencia de un fenotipo mutador por la acumulación de numerosos fragmentos repetitivos de ADN o microsatélites (IMS). Últimamente se ha detectado una variante nueva caracterizada por un silenciamiento epigenético del promotor del gen *MSH2* producida por deleciones en el extremo 3' del gen *EPCAM* (16)(17). El tipo de gen mutado se correlaciona con diferentes entidades clínicas. Los portadores de la mutación en el gen *MSH2* tienen mayor riesgo de padecer cánceres extracolónicos que los portadores de la mutación en *MLH1*. Asimismo, las mutaciones en los genes *MSH6* y *PMS2* tienen menor penetrancia, por ello sus portadores suelen desarrollar el CCR en edades más avanzadas, a excepción del cáncer de endometrio en los portadores de *MSH6* (112,113) (Tabla 5).

Tabla 5. Riesgo de neoplasias en el SL por genotipo comparado con la población general. Adaptado Guía NCCN 3.2019

Tipo de cáncer	Riesgo en la población general	<i>MLH1</i>		<i>MSH2</i>		<i>MSH6</i>		<i>PMS2</i>	
		Riesgo	Edad media de diagnóstico	Riesgo	Edad media de diagnóstico	Riesgo	Edad media de diagnóstico	Riesgo	Edad media de diagnóstico
CCR	4.5%	46-49%	43-45 años	43-52%	44 años	15-44%	51-63 años	12-20%	47-66 años
Endometrio	2.7%	43-57%	49 años	21-57%	47-48 años	17-46%	53-55 años	NE	
Mama	13%	12-17%	53 años	12%	52 años	0-13%	52 años	NE	
Ovario	1.3%	5-20%	44-47 años	10-38%	43-44 años	1-11%	44-48 años	NE	
Gástrico	<1%	5-7%	49-52 años	0.2-16%	49-52 años	0-5%	49-63 años	NE	
Páncreas	1.5%	6%	52-57 años	NE		NE		NE	
Vesícula	2.5%	2-4%	53-59 años	4-17%	53-59 años	2%	53-71 años	NE	
Vía biliar	<1%	2-4%	50 años	0.02 %	57 años	NE		NE	
Urotelial	<1%	0.2-5%	52-60 años	2-18%	52-61 años	0.7-7%	52-69 años	NE	
I. delgado	<1%	0.4-11%	46-47 años	1-10%	46-48 años	0-0.3%	46-54 años	NE	
Próstata	11.6%	0-17%	59 años	30-32%	59 años	0-5%	59 años	NE	
Cerebro/SNC	<1%	NE		NE		NR		NE	

NE: No bien establecido; NR: no reportado

1.3.1 Criterios de Ámsterdam y Bethesda

El diagnóstico del SL es complejo debido a que se trata de una enfermedad muy heterogénea. Originariamente la sospecha diagnóstica estaba basada en la historia familiar de acuerdo a los “Criterios de Ámsterdam”, establecidos por el Grupo Colaborativo Internacional de Investigadores del HNPCC en el año 90 para poder detectar a individuos con SL (114). Estos criterios clínicos aseguraban el uso de la misma nomenclatura a nivel mundial, pero eran demasiado restrictivos ya que excluían a familias con pocos miembros o con tumores extracolónicos. Así pues, en el año 1999 se desarrollaron los “Criterios de Ámsterdam II” con el fin de aumentar la sensibilidad diagnóstica (115). En 1996 se elaboraron las “Guías de Bethesda”, que exponían las diferentes situaciones clínicas en las que había una sospecha de SL, y su objetivo era seleccionar a los candidatos para el estudio de IMS y/o inmunohistoquímica (IHQ). Finalmente se revisaron estas guías en el año 2004 (116) (*Tabla 6*). A lo largo de los últimos años también han aparecido modelos matemáticos predictivos para calcular la probabilidad de presentar una mutación patogénica en los genes MMR, como el PREMM 126, el MMR predict o el MMR (117).

El valor predictivo positivo de los criterios de Ámsterdam I para identificar pacientes con SL es del 50% en tanto que el de los de Bethesda supone el 20%. Estos datos muestran que no son suficientes para identificar al mayor número de individuos con esta enfermedad (118).

Tabla 6. Criterios clínicos del síndrome de Lynch

Criterios de Ámsterdam I

1. Tres o más familiares con CCR, uno de los cuales es familiar de primer grado de los otros dos.
2. Dos generaciones sucesivas afectadas
3. Uno o más casos de CCR diagnosticado antes de los 50 años.
4. Excluir el diagnóstico de Poliposis Adenomatosa Familiar.

Criterios de Ámsterdam II

1. Tres o más familiares con un cáncer asociado al Síndrome de Lynch (CCR, endometrio, intestino delgado, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro, tracto hepatobiliar, tumores sebáceos de piel), uno de los cuales es familiar de primer grado de los otros dos.
2. Al menos en dos generaciones afectadas.
3. Uno o más casos de cáncer asociado debe haber sido diagnosticado antes de los 50 años.
4. En los casos de CCR, debe excluirse el diagnóstico de Poliposis Adenomatosa Familiar.

Criterios de Bethesda revisados

1. Cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años.
2. Presencia en forma sincrónica o metacrónica de CCR u otro tipo de cáncer relacionado a Síndrome de Lynch, independientemente de la edad.
3. CCR con fenotipo histológico de Inestabilidad de Microsatélites alta (presencia de linfocitos infiltrantes de tumor, carcinoma con diferenciación mucinosa o en anillo de sello, reacción linfocitaria peritumoral tipo Crohn, patrón de crecimiento medular), diagnosticado antes de los 60 años.
4. Individuos con CCR a cualquier edad, que posean al menos un familiar de primer grado con diagnóstico de CCR u otro cáncer relacionado al Síndrome de Lynch diagnosticado antes de los 50 años.
5. Individuos con CCR a cualquier edad, que posean dos o más familiares de primer o segundo grado con diagnóstico de CCR u otro cáncer relacionado al Síndrome de Lynch.

1.3.2 Métodos diagnósticos. Inmunohistoquímica e inestabilidad de microsatélites

1.3.2.1 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) analiza la expresión de las proteínas de los genes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*) en el tejido tumoral mediante el empleo de anticuerpos. En función de la proteína no expresada se podrá deducir el gen alterado y así dirigir la investigación hacia una variante patogénica concreta en la línea germinal (119).

Las proteínas MMR están localizadas en el núcleo de la célula, particularmente en las células del tercio inferior de las criptas de la mucosa y en componentes del estroma como las células endoteliales o inflamatorias. La presencia de tinción nuclear es el patrón habitual en todos los tejidos y pone de manifiesto una expresión normal de las proteínas. Cuando uno de los genes que codifican para estas proteínas tiene inactivados sus dos alelos se produce una pérdida de expresión y hay una ausencia de tinción nuclear en las células tumorales. Para realizar una evaluación adecuada, es necesaria la existencia de un control interno que nos permita constatar la tinción indemne de las células adyacentes al tumor. De esta manera, los casos en los que no hay una tinción nuclear en las células tumorales ni en las células del estroma no se pueden interpretar (120).

Las proteínas implicadas en la reparación de errores del ADN trabajan conjuntamente e interaccionan entre sí, constituyendo heterodímeros; *MSH2* con *MSH6* reconocen el error y *MLH1* con *PMS2* dirigen la reparación. En cada uno de ellos hay una proteína dominante (*MLH1* y *MSH2*) y una dependiente (*MSH6* y *PMS2*). Las segundas están subordinadas a las primeras, de manera que si hay una mutación en el gen *MLH1* se perderá tanto la expresión de la proteína *MLH1* como la de *PMS2* (Ilustración 5); de igual modo, si existe una mutación germinal en el gen *MSH2* habrá una pérdida de expresión de las proteínas *MSH2* y *MSH6* (Ilustración 6). En cambio, cuando la mutación afecta a los genes *PMS2* o *MSH6*, sólo hay una pérdida de expresión de las proteínas *PMS2* o *MSH6* (71,121,122).

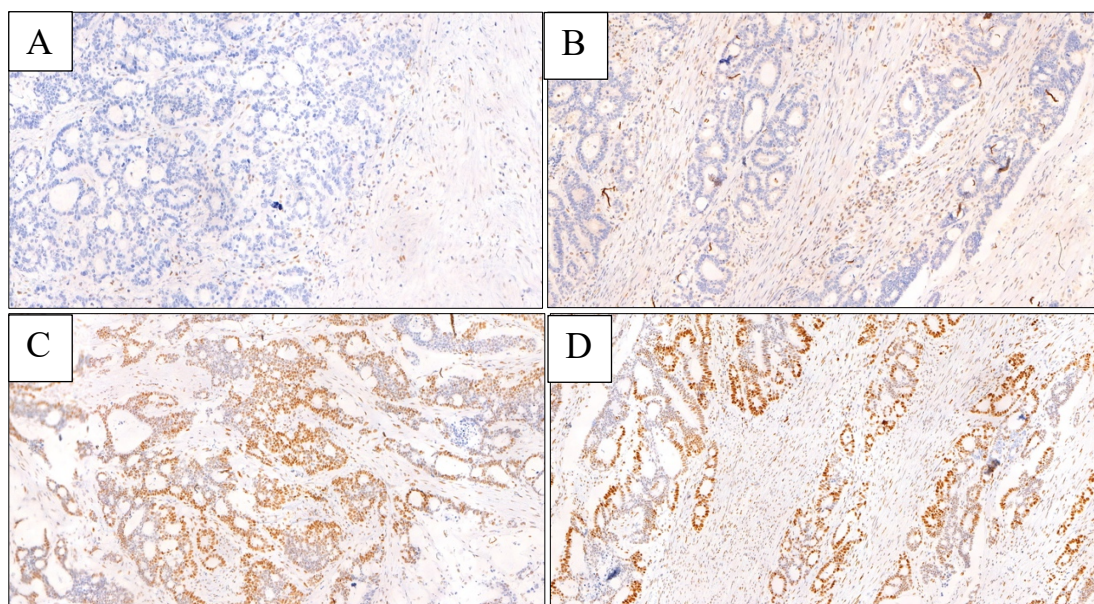


Ilustración 5. Tinción inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN en un cáncer colorrectal. A, B. Pérdida de expresión de MLH1/PMS2 en las células tumorales. C,D.Expresión conservada de MSH2/MSH6.

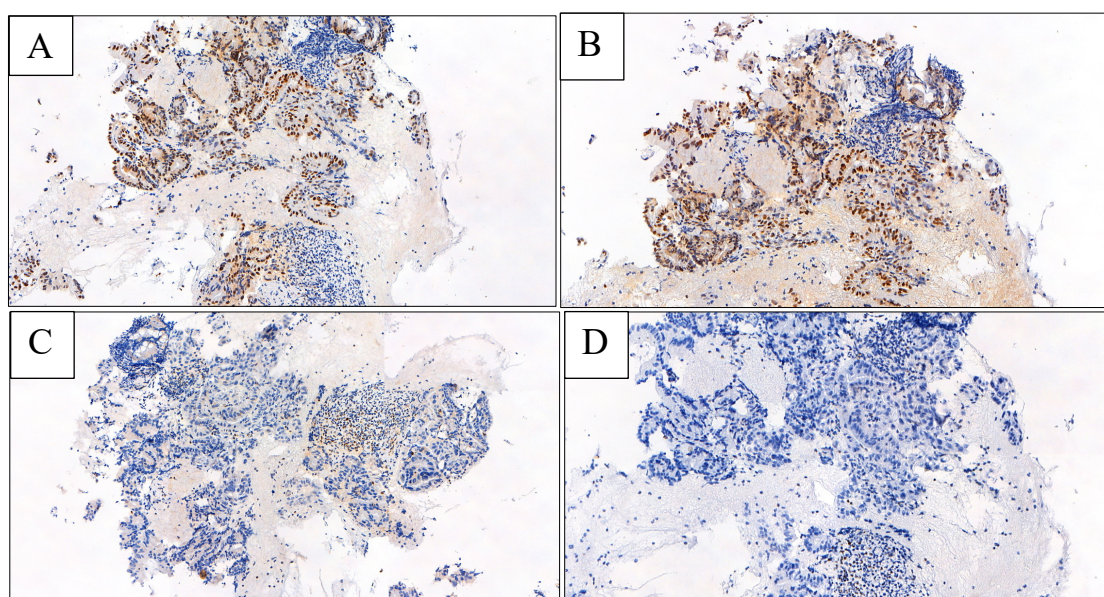


Ilustración 6. Tinción inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN en un cáncer colorrectal. A, B. Expresión conservada de MLH1/PMS2 en las células tumorales. C,D.Pérdida de expresión de MSH2/MSH6.

1.3.2.2 Inestabilidad de microsatélites mediante PCR

Otro método de cribado del SL es el análisis de marcadores para el estudio de la inestabilidad de microsatélites mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con esta finalidad, se creó el “panel de Bethesda” (123) formado por cinco marcadores de microsatélites: tres de repeticiones de dinucleótidos (D2S123, D5S346 y D17S250) y dos de repeticiones de mononucleótidos (BAT25 y BAT26). Éste compara el patrón del tejido tumoral con el del tejido sano (normalmente sangre). De cara a poder analizar el MSI a partir de DNA tumoral sin necesidad de comparar con el DNA de sangre, se han introducido marcadores de microsatélites mononucleotídicos para sustituir a los de dinucleótidos del panel de Bethesda (124), dado que tienen patrones mucho más conservados entre individuos. De esta manera, existe un panel de 5 mononucleótidos (BAT25, BAT26; NR21, NR24 y NR27) para cuando solo hay disponibilidad de tumor. En función de las diferencias halladas clasifica los tumores en IMS alta, baja o estables. Se define IMS alta (IMS-H) cuando dos o más de los marcadores probados se encuentran inestables en el tumor, IMS baja (IMS-L) cuando hay inestabilidad en un solo marcador y estabilidad de microsatélites (MSS) cuando no está alterado ninguno (123,125). En algunos centros como el nuestro ha empleado también un panel de 8 marcadores de microsatélites (NR27, NR21, NR24, BAT26, BAT25, D5S346, D2S123 and D17S250) (fig. 9) (126). Así, se definen como casos IMS-Estable cuando ninguno de los marcadores presenta inestabilidad; IMS-Baja inestabilidad (IMS-L) cuando el número de los marcadores que presentan inestabilidad es $<30\%$ (1-2 de los 8 marcadores con inestabilidad); y IMS-Alta inestabilidad (IMS-H) cuando el número de marcadores con inestabilidad es $\geq 30\%$ de los analizados (≥ 3 de los 8 marcadores con inestabilidad).

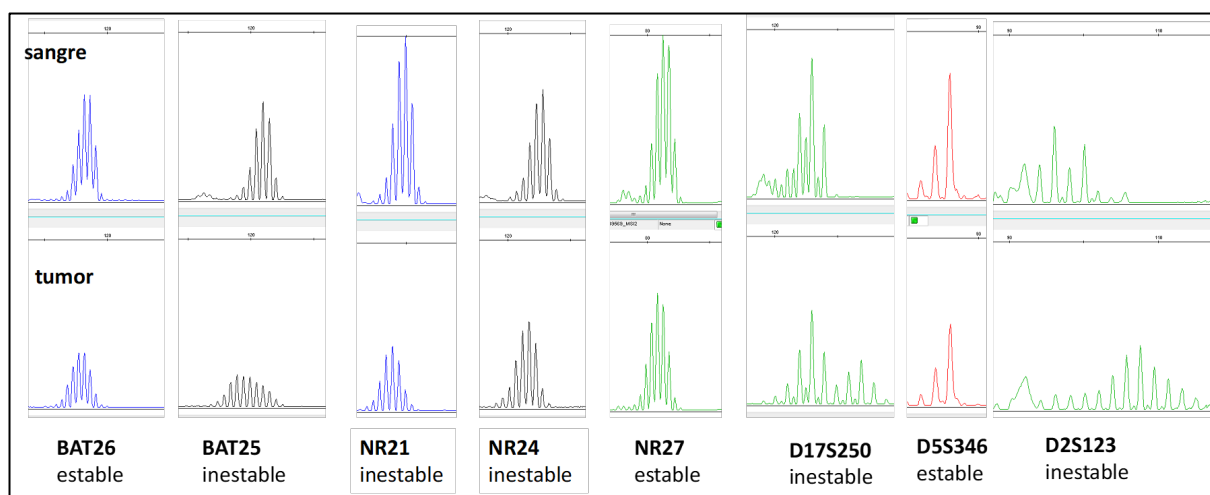


Figura 9. Panel de 8 marcadores de microsatélites (IMS alta en tumor)

El desarrollo de tecnologías de última generación como la secuenciación masiva (NGS), que ofrece la oportunidad de abordar de manera simultánea el estudio de mutaciones de varios genes en vez de un único gen como la PCR, será una alternativa futura para la determinación de la IMS (127).

1.3.2.3 Comparación de inmunohistoquímica y la inestabilidad de microsatélites

Una de las grandes ventajas de la IHQ de las proteínas producidas por los genes del sistema MMR es su alta sensibilidad y altísima especificidad para detectar los defectos en los genes alterados (119,128); al mismo tiempo, es una técnica coste-efectiva, sencilla, rápida, precisa muestras pequeñas para su determinación y está disponible en la mayoría de los centros hospitalarios con un protocolo estandarizado. Además, a diferencia de la PCR, puede ayudar a identificar el gen alterado y por tanto dirigir la estrategia hacia el análisis de la mutación germinal de ese gen, evitando el estudio del resto (128). Otro beneficio de la IHQ es que no requiere de tejido sano adicional ya que se extrae del adyacente al tumor; la PCR precisa la obtención de sangre.

A pesar de lo expuesto anteriormente, la IHQ no está exenta de limitaciones. Se han descrito defectos de tinción en MSH6 en pacientes con cáncer de recto que habían recibido neoadyuvancia con quimioradioterapia. Los autores recomiendan la realización de la IHQ en las biopsias endoscópicas previas al tratamiento para salvar este obstáculo (129,130).

Por otra parte, la fijación heterogénea del tejido, debida a la propia variabilidad intratumoral y a los diferentes métodos IHQ, da lugar a una disminución de la sensibilidad de la técnica. Por este motivo, se aconseja que la evaluación de la inmunohistoquímica se lleve a cabo por patólogos con experiencia y en centros en los que la PCR esté disponible para una mejor evaluación del procedimiento (131).

Los primeros estudios que analizaron la sensibilidad de la IHQ y la IMS para predecir una mutación germinal, mostraron menor sensibilidad en la primera cuando se estudiaban solo las proteínas MLH1 y MSH2 (85% IHQ, 93% IMS) (120). Series posteriores con elevado número de pacientes demostraron que la sensibilidad aumentaba (92-94%) cuando las 4 proteínas eran examinadas (119,128,132). Con la intención de ahorrar costes, algunos autores propusieron la determinación de solo dos proteínas para el screening del SL, pero un estudio reciente recomienda el análisis de las 4 proteínas para evitar fallos en la detección de pacientes (133).

La PCR tiene el inconveniente de presentar una baja sensibilidad en los casos de contaminación del DNA del tejido tumoral con DNA del tejido sano, pudiendo dar lugar a falsos negativos. Esto ocurre con mayor frecuencia en muestras pequeñas, en neoplasias mucinosas y en tumores que han recibido neoadyuvancia (123).

Podemos resumir diciendo que la IHQ de las proteínas MMR y la IMS determinada por PCR tienen una capacidad similar para detección de los tumores inestables en el SL y son igualmente válidas como test iniciales de screening. Se utilizará una u otra dependiendo de la disponibilidad y de la experiencia de los centros (134).

Uno de los problemas actuales es la falta de estudios sobre el uso de la IQH/IMS en pacientes con CCR metastásico (CCRm). Con la aparición de nuevas terapias inmunológicas la Agencia de Alimentos y Medicamentos estadounidense (FDA) recomienda investigar la inestabilidad de microsatélites para realizar un tratamiento personalizado. Para la inclusión en ECA en curso es suficiente con una de las dos técnicas. Un estudio reciente sugiere que una de las posibles causas de resistencia al tratamiento en los CCRm es el fallo en el diagnóstico del status MMR, por eso los autores recomiendan combinar los dos métodos en este grupo de pacientes para aumentar la sensibilidad y la especificidad (135).

1.3.3 Cribado universal. Algoritmo diagnóstico

En los últimos años, diferentes Sociedades científicas han propuesto el cribado universal del SL, mediante el estudio IHQ y/o de la IMS en todos los casos de CCR y cánceres de endometrio, con el objetivo de aumentar el diagnóstico en pacientes que no cumplen los criterios clínicos (18,25,27,136) (Fig. 10). Cuando se detecta la alteración del sistema MMR por una de estas técnicas se debe confirmar la enfermedad con el test genético que identifica la mutación en línea germinal.

La estrategia de cribado universal del SL está basada en numerosos estudios que han demostrado su eficacia y coste-efectividad a lo largo de años, pudiendo efectuarse en la práctica asistencial. A pesar de ello se ha implementado de manera irregular en los diferentes centros ya que existen dificultades como la falta de implicación de algunos profesionales, la ausencia de circuitos bien establecidos, y en algunos casos, la falta de recursos económicos y personales (33).

En contraposición al SL cuya mutación es a nivel germinal, los tumores esporádicos tienen una alteración epigenética solamente presente en las células tumorales. En estos casos, la causa de la IMS es la hipermetilación de la región promotora de algunos de los genes del sistema de reparación del ADN (fundamentalmente el gen *MLH1*), que tiene como consecuencia la pérdida de expresión proteica por la inactivación de la transcripción (10,72,73). Para diferenciar ambos escenarios se han establecido 2 tácticas: evaluar el grado de metilación del promotor *MLH1* en el tumor e investigar la presencia de la mutación somática V600E en el gen *BRAF*. La presencia de alguna de las dos interrumpe el estudio genético ya que significa que se trata de formas esporádicas (115).

Las técnicas de secuenciación masiva, que incluyen los genes MMR y *BRAF*, con herramientas para determinar la IMS, han demostrado una sensibilidad mayor para identificar el SL que el screening universal con IHQ y la determinación del *BRAF* (100% vs 89.7%) (137). Aunque las tecnologías NGS cada vez son más baratas no hay estudios de coste-efectividad para su uso en una estrategia de cribado del SL.

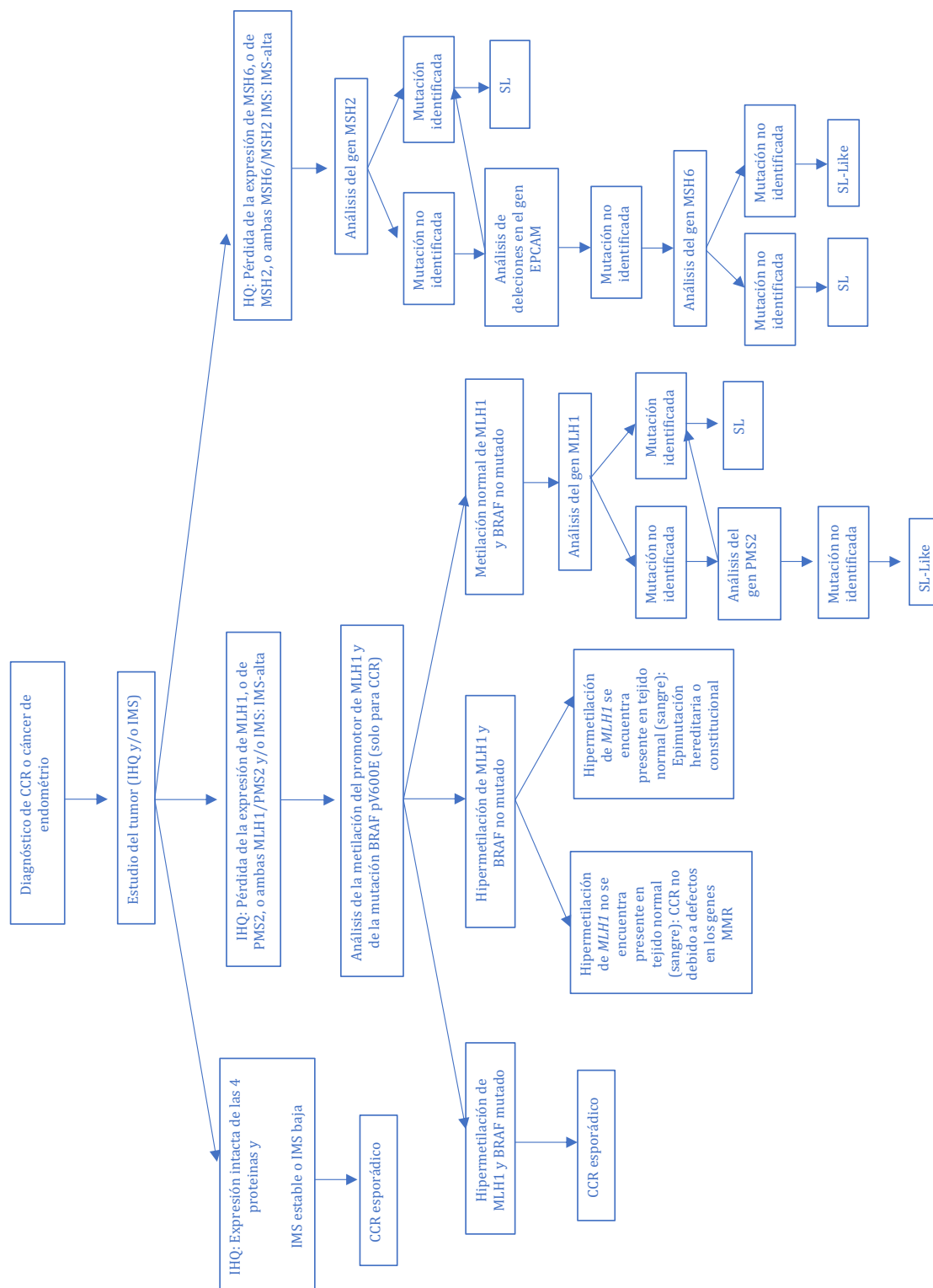


Figura 10. Algoritmo diagnóstico del Síndrome de Lynch. Modificado de Castro-Mujica et al, Rev Gastroenterol Peru 2018 (138)

1.3.4 Recomendaciones de manejo y seguimiento

Los pacientes diagnosticados de SL deben ser remitidos a una Unidad de consejo genético para poder realizar un árbol genealógico y llevar un manejo y seguimiento adecuados, tanto del caso índice como de los familiares afectos. Las recomendaciones de la American college of Gastroenterology del 2015 sobre el manejo de los pacientes con SL se recogen en la tabla 7.

Hay diversos estudios que han demostrado una disminución de la incidencia de CCR del 62% y de la disminución de la mortalidad global en un 65% cuando se llevan a cabo controles con colonoscopia (139–141). Debido a la alta incidencia de cáncer de endometrio y ovario, también se debe hacer vigilancia ginecológica y considerar la histerectomía con anexectomía bilateral profiláctica en mujeres que ya han cumplido su deseo gestacional (42,142,143). Otro tema ampliamente debatido es el de la cirugía colónica profiláctica. En pacientes con SL y CCR la colectomía subtotal incrementa la expectativa de vida en dos años frente a la resección segmentaria del tumor (71). Aun así, la guía clínica de la ACG la considera una recomendación condicional con moderada calidad de evidencia (25). Estudios posteriores demuestran que la colectomía en estos pacientes es coste-efectiva (144).

Tabla 7. Recomendaciones de manejo y seguimiento del SL. Guía ACG 2015

Recomendación	Nivel de recomendación y calidad de evidencia
Colonoscopia: Mutación MLH1 o MSH2: anual o bienal, empezando entre los 20 a 25 años Mutación MSH6 o PMS2: bienal empezando entre los 25 a 30 años	Recomendación fuerte. Moderada calidad de la evidencia para el cribado y muy baja calidad de la evidencia para la vigilancia anual y la edad de inicio.
La colectomía con anastomosis ileorrectal es el tratamiento de elección de pacientes con CCR y SL no controlable por endoscopia.	Recomendación condicional. Moderada calidad de la evidencia.
La histerectomía y salpingooforectomía bilateral deben ofrecerse a mujeres con SL portadoras que han cumplido su deseo gestacional, siendo la edad óptima entre los 40-45 años de edad.	Recomendación condicional. Baja calidad de la evidencia.
La detección del cáncer de endometrio y de ovario debe ofrecerse a mujeres en con SL mediante biopsia de endometrio y ecografía transvaginal anual, iniciando entre los 30-35 años de edad.	Recomendación condicional. Muy baja calidad de la evidencia.
La detección del cáncer gástrico y duodenal se puede considerar en pacientes con SL mediante una gastroscopia basal con biopsia gástrica a la edad de 30-35 años, y el tratamiento de la infección por H. pylori cuando se encuentre. Puede considerarse la vigilancia continua cada 3-5 años si hay antecedentes familiares de cáncer gástrico o duodenal.	Recomendación condicional. Muy baja calidad de la evidencia.
No se recomienda la detección más allá de las recomendaciones basadas en la población para el cáncer de vías urinarias, páncreas, próstata y mama, a menos que haya una historia familiar de estos tipos de tumores.	Recomendación condicional. Baja calidad de la evidencia.
No existe recomendación para el uso habitual de aspirina en pacientes con SL a pesar de que hay datos que sugieren que previene el CCR y los tumores extracolónicos	Recomendación condicional. Moderada calidad de la evidencia.

2. HIPÓTESIS

El análisis inmunohistoquímico de las proteínas relacionadas con los genes reparadores del ADN en las biopsias endoscópicas de los pacientes con cáncer colorrectal muestra unos resultados equiparables a los obtenidos en la pieza quirúrgica.

3. OBJETIVOS

Objetivo primario:

Correlacionar la expresión inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN en las biopsias endoscópicas y el espécimen quirúrgico correspondiente en el cáncer colorrectal.

Objetivos secundarios:

- Investigar la frecuencia de la falta de expresión inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN (dMMR) en nuestra población de estudio.
- Comparar la eficacia de la inmunohistoquímica y del análisis de la inestabilidad de microsatélites mediante PCR, en la detección de las alteraciones del mecanismo de reparación del ADN.
- Determinar si la neoadyuvancia en el cáncer colorrectal modifica el estatus MMR
- Determinar la relación entre la pérdida de expresión inmunohistoquímica y distintas variables anatomo-patológicas

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Población

4.1.1 Población diana

Pacientes intervenidos de CCR en el Instituto valenciano de oncología en los que se haya realizado la IHQ de las proteínas reparadoras del ADN en la pieza quirúrgica, y en los que se disponga de la biopsia endoscópica correspondiente.

4.1.2 Diseño del estudio

Se trata de un estudio retrospectivo, transversal y unicéntrico. A partir de una base de datos prospectiva de cirugía que incluye a todos los pacientes intervenidos de CCR en nuestro centro, se analizó de forma retrospectiva los datos correspondientes a todos los individuos en los que se había realizado la IHQ de las proteínas reparadoras del ADN en la pieza quirúrgica, en el periodo comprendido entre febrero de 2011 y enero de 2020.

Posteriormente, en aquellos pacientes en los que había disponibilidad de las biopsias endoscópicas respectivas previas a la cirugía, se llevó a cabo el estudio IHQ en las mismas.

4.1.3 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico de CCR en los que se haya realizado la IHQ de las proteínas reparadoras del ADN en la pieza quirúrgica. Para el objetivo primario además deberán contar con tejido tumoral viable para su análisis, obtenido a través de las biopsias endoscópicas respectivas. Presencia de datos clínicos para el estudio.

Criterios de exclusión

Pacientes con diagnóstico de CCR en los que no se haya realizado la IHQ de las proteínas reparadoras del ADN (IHQ-MMR) en la pieza quirúrgica.

Para el objetivo primario:

- Pacientes con diagnóstico de CCR e IHQ-MMR realizada en la pieza quirúrgica que no cuenten con tejido de la biopsia endoscópica correspondiente.
- Pacientes con diagnóstico de CCR e IHQ-MMR en la pieza quirúrgica que cuenten con tejido de la biopsia endoscópica, pero en los que no haya tumor suficiente para realizar la IHQ.
- Pacientes con diagnóstico de CCR e IHQ-MMR en la pieza quirúrgica que cuenten con tejido de la biopsia endoscópica, pero en los que haya defectos de fijación y procesamiento que no permitan realizar técnicas de IHQ o que tengan escaso material tumoral en la muestra en los nuevos cortes realizados para IHQ.
- Pacientes con diagnóstico de CCR e IHQ-MMR en la pieza quirúrgica que cuenten con tejido de la biopsia endoscópica, pero en los que tras realizar la IHQ no sea valorable porque el control interno (tejido normal) sea negativo.

4.2 Métodos

4.2.1 Algoritmo del estudio

- Se recopiló la información clínica de todos los pacientes integrantes del estudio y de los datos anatomopatológicos relativos al tumor revisando las historias clínicas. Cada individuo se identificó mediante un código de paciente. Los datos se almacenaron en una base de datos única tipo excel para su posterior análisis y procesamiento.
- Se identificaron los pacientes intervenidos de CCR con IHQ realizada en la pieza quirúrgica y posteriormente se seleccionaron aquellos de los que se disponía en nuestro centro de material suficiente en las biopsias endoscópicas correspondientes previas a la cirugía. En dichos casos se recuperó el bloque de tejido/laminillas.
- Se realizó la técnica IHQ de las proteínas reparadoras del ADN (MLH1, MSH2, PMS2 y MSH6) en las biopsias endoscópicas.

- Se interpretaron las tinciones IHQ por los patólogos que se dedican al diagnóstico anatomopatológico de patología gastrointestinal en nuestro Hospital. El estudio se hizo de forma ciega, sin conocer el resultado de la IHQ de las piezas quirúrgicas correspondientes. Los casos que mostraron una ausencia de tinción nuclear en presencia de tinción en tejidos no neoplásicos adyacentes, como el epitelio normal de colon o células del estroma, se consideraron como falta de expresión de la proteína.
- Se revisaron los resultados obtenidos por dos patólogos con 20 y 35 años de experiencia en patología gastrointestinal. En los casos en los que no hubo concordancia entre las biopsias endoscópicas y la pieza quirúrgica correspondiente, se repitió el estudio.
- Tras recopilar los datos sobre las variables de estudio se analizaron usando el software R V.3.4.0. Se realizaron comparaciones de frecuencias de la IHQ en la biopsia y en la pieza quirúrgica, así como entre la IHQ y la IMS. Para ver la distribución de la pérdida de expresión de las proteínas reparadoras del ADN con respecto a factores pronóstico se utilizaron modelos de regresión logística binaria.

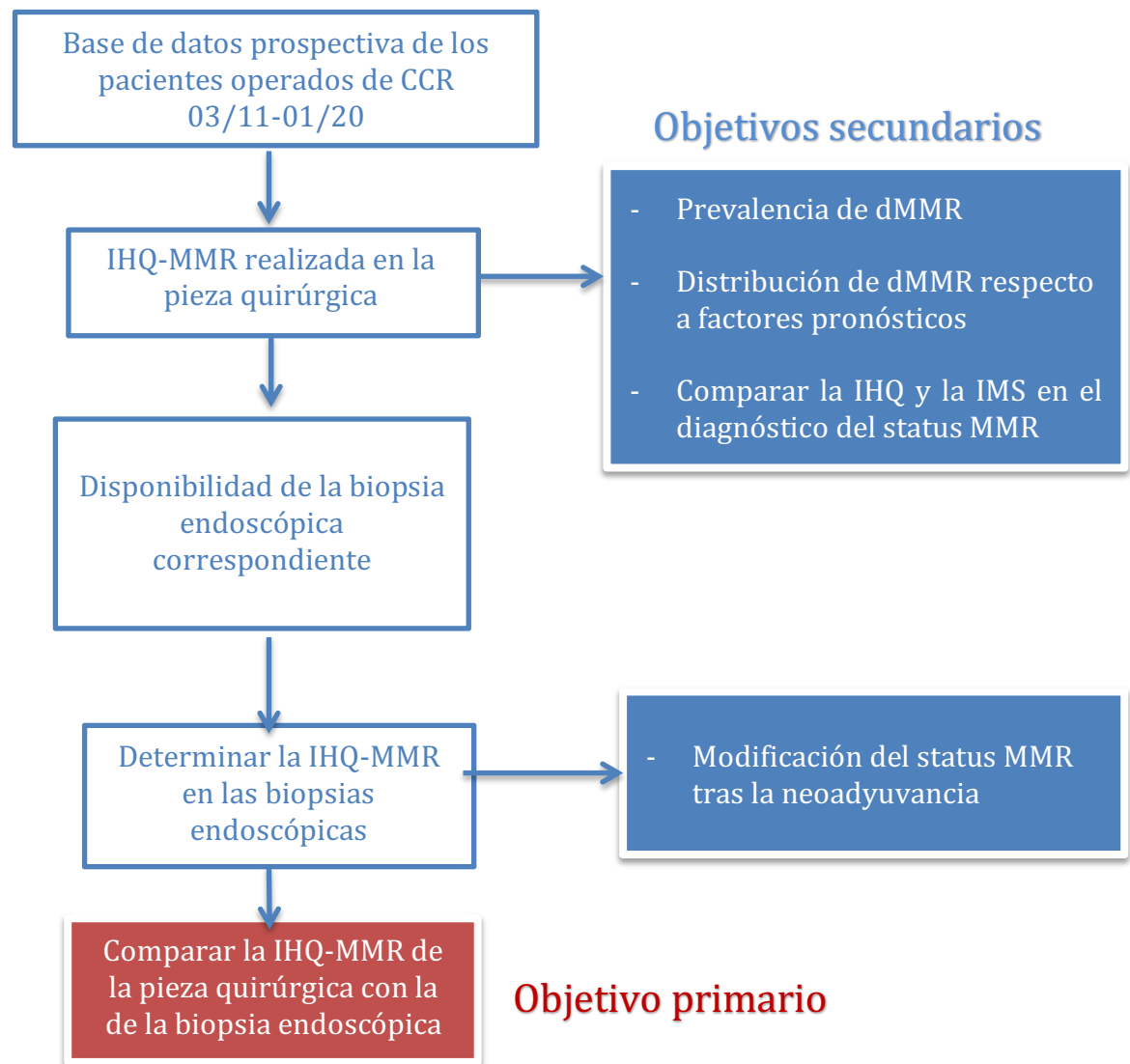


Figura 11. Algoritmo del estudio

4.2.2 Consideraciones éticas

La realización del estudio fue aprobada por el Comité ético de investigación de nuestro centro (Nº expediente CEIM: 2020-04) y se llevó a cabo en conformidad con el protocolo y con la Declaración de Helsinki sobre principios Éticos para la Investigación Médica incluyendo Humanos (Fortaleza, 2013). Conforme a las leyes españolas, este estudio se considera como incluido dentro del marco de la legislación de productos sanitarios, pero también dentro del marco de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica en el contexto de estudios con muestras biológicas.

Valoración de seguridad

El desarrollo del estudio no alteró el diagnóstico, terapia y seguimiento del paciente, ya que se realizó mediante la práctica clínica habitual. Al tratarse de un estudio sin medicamentos, observacional, no se recogieron los parámetros de seguridad.

Confidencialidad de los datos

La confidencialidad de los datos de cada paciente fue respetada en todo momento. Los datos originales serán conservados en el Servicio de Anatomía Patológica del IVO y sólo tendrán acceso a ellos los investigadores del estudio o en caso de inspección por parte de las Autoridades Sanitarias Españolas.

Los pacientes del estudio se identificaron mediante un código de paciente. El investigador clínico fue la única persona que pudo conocer los datos recogidos y asociarlos a cada caso. Se garantizó en todo momento lo dispuesto en el título 1 del Artículo 5 de la Ley 14/2017 de investigación biomédica referente a la protección de datos personales y garantías de confidencialidad.

Manejo de los datos y archivo de los registros

Los datos fueron recogidos por el investigador de forma retrospectiva y registrada en una base de datos con accesos restringidos según las funciones del investigador. Para garantizar el anonimato de la identidad de las pacientes, apareció un código en las bases de datos donde figuraba la información clínica referida y nunca su identidad. Cualquier información que se obtenga a partir del proyecto, será confidencial y quedará custodiada por el investigador principal. Es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero no los resultados individuales. Si este fuera el caso, la identidad de los casos permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de una publicación.

Consentimiento informado

Se obtuvo del CEIM la exención de la obtención del consentimiento informado porque consideró que se cumplían todos los requisitos contemplados en la legislación actual para que pueda emitirse la aprobación en ausencia del mismo.

4.2.3 Variables del estudio

Las principales variables del estudio están recogidas en las tablas 8 y 9:

Tabla 8. Variables clínicas de los pacientes

Variables clínicas	
Número de identificación	Número
Fecha de nacimiento	DD/MM/AAAA
Edad	Número
Sexo	Mujer/Hombre
Fecha de cirugía	DD/MM/AAAA
Inestabilidad de microsatélites	Alta/estable
Hipermetilación <i>MLH1</i>	Sí/no
<i>BRAF</i>	Mutado/no mutado
Localización del tumor	Recto, sigma, colon descendente, colon transversal, colon ascendente, ciego
Metástasis al diagnóstico	Sí/no
Tratamiento neoadyuvante	Sí/no
Tipo de tratamiento neoadyuvante	QT/RT/ QT-RT

QT: quimioterapia; RT: radioterapia

Tabla 9. Variables anatomopatológicas de los tumores

Variables anatomopatológicas	
<i>En la pieza quirúrgica</i>	
Tipo histológico	Adenocarcinoma NOS Adenocarcinoma mucinoso Adenocarcinoma de células en anillo de sello Adenocarcinoma medular
Grado de diferenciación	Bajo grado (G1 /G2) y alto grado (G3/G4)
Invasión linfocascular no extramural	Sí/no
Invasión perineural	Sí/no
Invasión vascular extramural (EMVI)	Sí/no
TNM 7ª y 8va edición	
Estadio	I, IIA, IIB, IIC, IIIA, IIIB, IIIC, IVA, IVB, IVC
Expresión MLH1	Pérdida de expresión/expresión conservada
Expresión MSH2	Pérdida de expresión/expresión conservada
Expresión MSH6	Pérdida de expresión/expresión conservada
Expresión PMS2	Pérdida de expresión/expresión conservada
<i>En la biopsia endoscópica</i>	
Expresión MLH1	Pérdida de expresión/expresión conservada
Expresión MSH2	Pérdida de expresión/expresión conservada
Expresión MSH6	Pérdida de expresión/expresión conservada
Expresión PMS2	Pérdida de expresión/expresión conservada

4.2.4 Estudio inmunohistoquímico MMR

La técnica de IHQ de las proteínas reparadoras del ADN en las biopsias endoscópicas se realizó en el Servicio de Anatomía patológica del Instituto valenciano de oncología.

Se recuperó el bloque de tejido fijado en formol e incluido en parafina y se cortó en secciones de 3 micras. Las muestras se desparafinaron durante 12 horas en estufa y se montaron en portaobjetos para microscopio.

Se llevó a cabo la tinción de 4 proteínas (MLH1, MSH6, MSH2, PMS2) de forma automatizada mediante el sistema de visualización EnVision FLEX (DAKO Omnis) junto con anticuerpos primarios de DAKO prediluidos. Cada sesión de tinción incluyó una muestra de control externo positivo para asegurar la calidad de los resultados. Los anticuerpos utilizados fueron: MLH1 clona ES05, MSH2 clona FE11, MSH6 clona EP49 y PMS2 clona EP51.

La interpretación de la tinción de las biopsias endoscópicas fue realizada por dos patólogos experimentados de forma ciega, es decir, que no conocían los resultados de la inmunohistoquímica de las piezas quirúrgicas correspondientes. Los controles internos fueron los tejidos no neoplásicos adyacentes (células del endotelio vascular e inflamatorias y tejido colónico normal). El resultado de la tinción se clasificó en: “expresión conservada” (positivo), “pérdida de expresión” (negativo) y “no concluyente”. Se consideró pérdida de expresión de las proteínas cuando hubo una ausencia de tinción nuclear en el tumor en presencia de tinción de tejidos no neoplásicos contiguos. Se consideró “expresión conservada” cuando se observó tinción nuclear tanto en el tejido tumoral como en los tejidos circundantes no tumorales. El resultado se asumió como “no concluyente” cuando hubo una falta de tinción del control interno o no se pudo interpretar debido a un patrón de tinción inusual.

Tabla 10. Panel de anticuerpos empleados

Anticuerpo	Clona	Fuente	Huesped	Dilución
MLH1	ES05	DAKO Agilent	Ratón	Prediluidos
MSH2	FE11	DAKO Agilent	Ratón	Prediluidos
MSH6	EP49	DAKO Agilent	Conejo	Prediluidos
PMS2	EP51	DAKO Agilent	Conejo	Prediluidos

4.2.5 Estudio de inestabilidad de microsatélites

Para el análisis de inestabilidad de microsatélites se analizaron los 5 marcadores propuestos en la conferencia del National Cancer Institute (BAT 25, BAT 26, D2S123, D5S346, D17S250) y se utilizó la misma clasificación de tumores:

- Estabilidad de microsatélites (MSS): si no se detecta inestabilidad en ninguno de los marcadores
- Baja inestabilidad (MSI-L): cuando se detecta inestabilidad en uno solo de los marcadores
- Alta inestabilidad (MSI-H): cuando 2 o más marcadores presentaban inestabilidad

La reacción de amplificación consiste en una PCR múltiple utilizando los cebadores y las condiciones descritas por Umetani et al (145). El cebador directo de cada pareja está marcado con un fluoróforo determinado para su posterior visualización en un análisis de fragmentos. Así, BAT25 está marcado con NED, BAT26 con 6-FAM, D2S123 y D17S250 con VIC, y D5S346 con PET.

La determinación de inestabilidad de microsatélites se realizó mediante análisis de fragmentos en un equipo 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) comparando los patrones de cada marcador a partir de una muestra de sangre periférica y de la muestra tumoral utilizando para ello el software Gene Mapper (Applied Biosystems).

4.2.6 Análisis de la hipermetilación del promotor del gen *MLH1*

El análisis de la hipermetilación del gen promotor de *MLH1* se ha realizado con la técnica MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) empleando el kit SALSA MLPA ME011 Mismatch Repair genes probemix (MRC HOLLAND) y la enzima de restricción HhaI con posterior electroforesis capilar en el Secuenciador ABI3130xl (Applied Biosystem.) Los resultados han sido evaluados con el software específico Coffalyser ®. En el caso de obtenerse un resultado positivo se realiza el análisis con ADN de Sangre periférica (si hay disponibilidad) para comprobar si la alteración se encuentra en línea germinal.

4.2.7. Análisis del gen *BRAF*

Tras la extracción de ADN se realiza el análisis del gen *BRAF* con el objeto de identificar la presencia de la mutación V600 en el exón 15 del gen mediante el kit comercial Cobas® *BRAF* Mutation Test CE-IVD (Roche Diagnostics, SL).

4.3 Análisis estadístico

Para valorar la correlación del resultado de la IHQ en la biopsia y en la pieza quirúrgica se usaron las pruebas diagnósticas de un test: sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo. También se utilizó el índice de correlación Kappa. Se realizaron comparaciones de frecuencias utilizando la prueba chi-cuadrado para las variables categóricas. Para las variables continuas, las diferencias entre las medias se compararon mediante la prueba t de Student. Cuando la normalidad no fue aceptada, las muestras se compararon utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Modelos de regresión logística binaria fueron planteados, valorando siempre sus condiciones de aplicabilidad. Se utilizaron pruebas de 2 caras con un nivel de significatividad del 5%. Los datos se analizaron usando el software R V.3.4.0.

Cálculo del tamaño muestral

El cálculo del tamaño muestral se basó en publicaciones anteriores (34–38). Se planteó un problema de diferencia respecto de una constante del porcentaje de pacientes correctamente clasificados. Suponíamos un problema de dos colas, con un α (Error tipo I) de 0.05, Potencia de 0.8, un tamaño del efecto de 0.05 y una constante de proporción del 0.93 %. Con estas suposiciones queríamos observar diferencias de al menos un 5% y necesitaríamos al menos 144 pacientes. Añadiendo una pérdida potencial de pacientes del 10%, al menos 160 pacientes serán necesarios. El cálculo del tamaño muestral se realizó mediante el software estadístico G*Power.

5. RESULTADOS

5.1 Descripción general de la muestra

Contábamos con una base de datos quirúrgica prospectiva de pacientes intervenidos de cáncer colorrectal en el Instituto valenciano de oncología. Seleccionamos para el estudio el periodo comprendido entre marzo del 2011 y enero del 2020 que incluía un total de 732 pacientes. En nuestro centro el screening universal del síndrome de Lynch en el espécimen quirúrgico comenzó a realizarse en el año 2014 y, con el paso de los años, se fue incorporando como una práctica clínica habitual. Por este motivo, la inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN en la pieza quirúrgica, solo estaba disponible en 366 de los casos recolectados, y valorable, al menos en alguna de las 4 proteínas, en 361 de ellos.

De los 361 individuos que finalmente fueron incluidos en el estudio, el 54.30% eran varones, mientras que el 45.70% restante eran mujeres. La edad media de los pacientes estudiados fue de 65.37 años (desviación estándar: 15.27).

En relación con la localización del tumor el 28.5% de los casos estaba localizado en el recto, el 36.6% en el colon izquierdo y el 34.9% en el colon derecho. De todos ellos, recibieron neoadyuvancia 102 pacientes, la mayoría neoplasias de recto, pero también neoplasias localmente avanzadas de colon. En cuanto al tipo histológico, el 90.3% fueron adenocarcinomas, siendo el 71% bien diferenciados, el 25% moderadamente diferenciados y el 3 % mal diferenciados. La segunda estirpe celular en frecuencia fue el carcinoma mucinoso (8.9%), seguido por el carcinoma en anillo de sello (0.60%) y el adenocarcinoma medular (0.30%).

Otras variables anatomopatológicas del tumor como la infiltración linfovascular, la infiltración perineural, el tumor budding, la invasión vascular extramural (EMVI) y los grupos pobremente diferenciados (gemaciones tumorales), fueron recogidas, pero se excluyeron del análisis posterior dado que no estaban disponibles en un elevado número de individuos.

Las características clínicas de la población global del estudio y de los tumores se recogen en la tabla 11 y en la figura 12.

Tabla 11. Características demográficas y clínicas de la población de estudio

Características	Total
	361 (100%)
Edad del diagnóstico	
Media (desviación estándar)	65.37 (15.27)
Mediana (IQR)	66.96 (57.31-74.97)
Sexo	
Femenino	165 (45.70%)
Masculino	196 (54.30%)
Tipo histológico	
Adenocarcinoma NOS	325 (90.30%)
Adenocarcinoma mucinoso	32 (8.90%)
Carcinoma de células en anillo sello	2 (0.60%)
Adenocarcinoma medular	1 (0.30%)
No disponible	1
Grado	
Bien diferenciado (1)	240 (71.20%)
Moderadamente diferenciado (2)	87 (25.80%)
Pobrememente diferenciado (3)	10 (3.00%)
No disponible	24
Localización	
Recto	103 (28.50%)
Colon izquierdo	132 (36.60%)
Colon derecho	126 (34.90%)
Tratamiento neoadyuvante	
No	259 (71.70%)
Sí	102 (28.30%)
Estadio	
I	88 (24.80%)
II	85 (23.90%)
III	126 (35.50%)
IV	56 (15.80%)
No disponible	6

Infiltración linfovascular	
No	151 (44.00%)
Sí	192 (56.00%)
No disponible	18
Infiltración perineural	
No	165 (48.70%)
Sí	174 (51.30%)
No disponible	22
Tumor Budding	
No	138 (50.20%)
Sí	137 (49.80%)
No disponible	86
Invasión vascular extramural (EMVI)	
No	210 (70.20%)
Sí	89 (29.80%)
No disponible	62
Grupos pobremente diferenciados (gemaciones tumorales)	
No	142 (55.00%)
Sí	116 (45.00%)
No disponible	103
IHQ (expresión proteínas MMR)	
Conservada	320 (88.64%)
Pérdida	41 (11.35%)
Inestabilidad de microsatélites	
Alta	38 (11.40%)
Estable	294 (88.60%)
No disponible	29

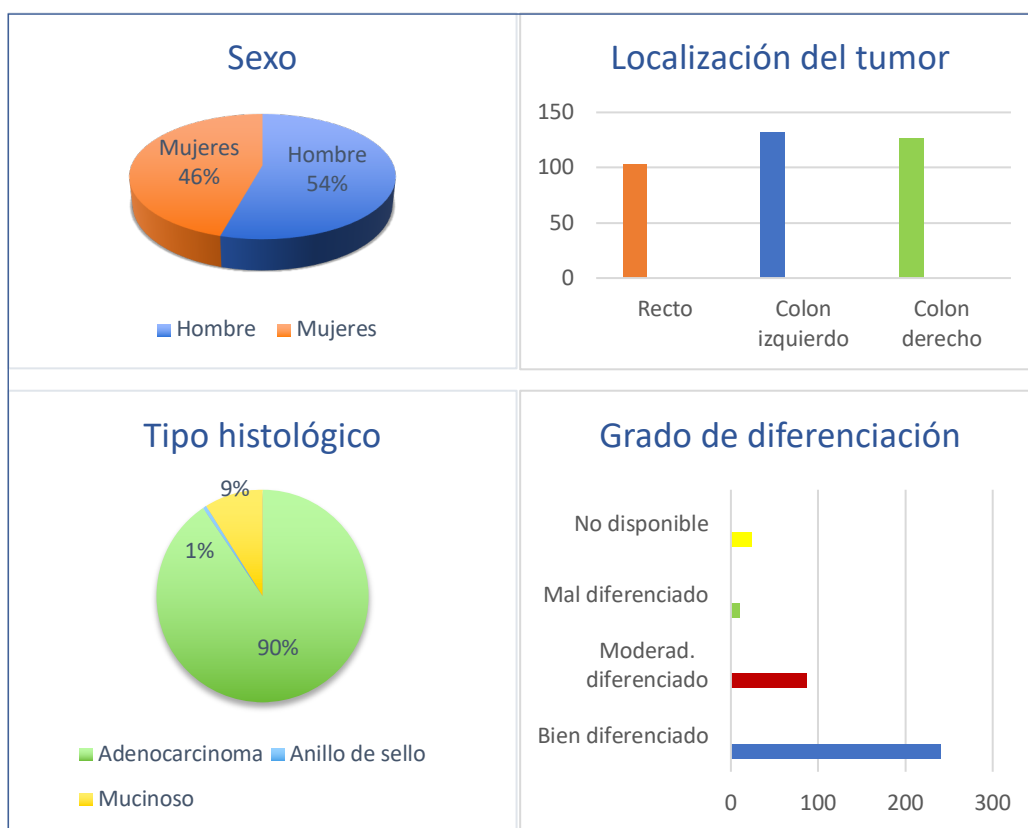


Figura 12. Características de la población de estudio

5.2 Resultados de la inmunohistoquímica en la población de estudio

En el 11.35% de los casos (41 pacientes) hubo una expresión inmunohistoquímica nuclear patológica (pérdida de expresión). Las alteraciones proteicas más frecuentes fueron en MLH1 y PMS2, presentes en 37 (10.2%) de los 361 pacientes. En 4 casos (1.10%) coexistía la pérdida de expresión de MSH2 y MSH6. El 88.64% (320 pacientes) tuvieron una inmunohistoquímica normal (expresión conservada). (Figura 13 y tabla 12).

En nuestra serie hay una coincidencia del 100% en la ausencia de expresión nuclear de ambos heterodímeros: MLH1 con PMS2 y MSH2 con MSH6.

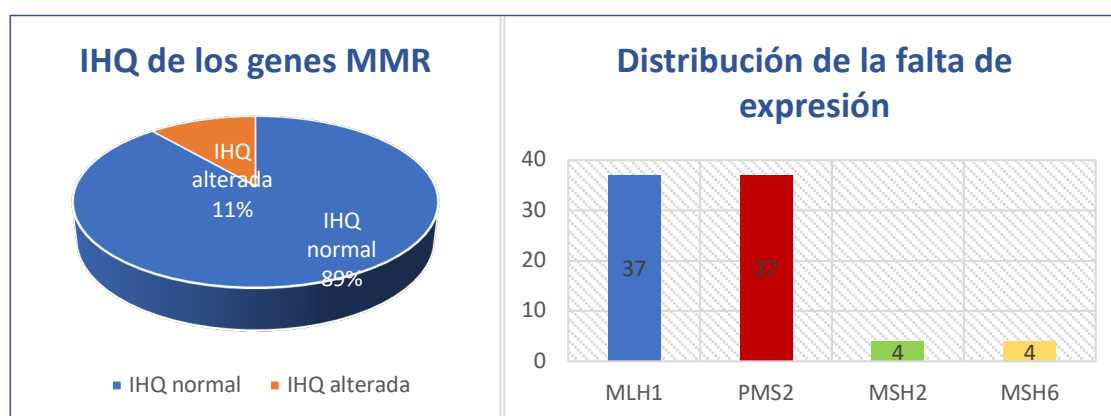


Figura 13. Expresión IHQ de los genes MMR

De los pacientes con la IHQ realizada en la pieza quirúrgica, se excluyeron del estudio 5 individuos en los que ninguna de las 4 proteínas MMR fue valorable y, por consiguiente, no cumplían los criterios de inclusión. De los 361 individuos restantes, se hallaron 4 casos en los que la técnica se consideró “no valorable” en alguna de las 4 proteínas MMR, pero concluyente en las demás. La distribución de los “no valorables” en la pieza fue: 2 de ellos por una expresión no válida en la proteína MLH1, 2 de ellos en la proteína MSH2 y los 4 en PMS2. De los 4 pacientes citados, disponíamos de la biopsia endoscópica correspondiente en 3 de ellos. Tras realizar el análisis IHQ en la biopsia de dichos casos, pudieron incluirse en la evaluación comparativa posterior, al menos las proteínas concluyentes.

Tabla 12. Distribución de la ausencia de expresión de las proteínas reparadoras del ADN

Expresión proteínas reparadoras de ADN	Total
	361 (100%)
MLH1	
Conservada	322 (89.19%)
Pérdida	37 (10.20%)
No valorable	2
PMS2	
Conservada	321 (88.91%)
Pérdida	37 (10.30%)
No valorable	3
MSH2	
Conservada	355 (98.33%)
Pérdida	4 (1.10%)
No valorable	2
MSH6	
Conservada	357 (98.90%)
Pérdida	4 (1.10%)

Las características generales de los 41 pacientes con la ausencia de expresión de las proteínas reparadoras de ADN se recogen en la tabla 13. La IHQ en la pieza quirúrgica estaba disponible en todos los pacientes y en 16 de ellos estaba también en la biopsia endoscópica. La IMS estaba presente en 38 pacientes, de los cuales fue alta en 36 casos y en dos fue estable. De los 36 pacientes con inestabilidad alta existía una hipermetilación del promotor del gen *MLH1* y/o una mutación del *BRAF* en 19 casos, por tanto, eran CCR esporádicos. De los 17 restantes, 5 no acudieron a la Unidad de consejo genético; en 12 pacientes se llevó a cabo el estudio de la mutación germinal, resultando no informativo en 8 de ellos y detectando una mutación en 4 individuos (2 del gen *MLH1*, 2 del gen *MSH2*) (Fig. 14).

Tabla 13. Características de los pacientes con pérdida de expresión MMR

Caso	Edad	Sexo	Localización	Tto neoady	Proteína alterada	IMS	Hipermet MLH1	BRAF	Estudio Gen
1	67	FE	Colon derecho	NO	MLH1 bx- MLH1 pz- PMS2 bx- PMS2 pz	ND	ND	ND	ND
2	82	MA	Colon derecho	NO	MLH1 bx- MLH1 pz- PMS2 bx- PMS2 pz	ND	ND	ND	ND
3	73	FE	Colon derecho	NO	MLH1 bx- MLH1 pz- PMS2 bx- PMS2 pz	ND	ND	ND	ND
4	77	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz- PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	MUTADO	NO INDICADO
5	72	FE	Colon derecho	NO	MLH1 bx- MLH1 pz- PMS2 bx- PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	MUTADO	NO INDICADO
6	79	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz- PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	MUTADO	NO INDICADO
7	77	FE	Colon derecho	NO	MLH1 bx- MLH1 pz- PMS2 bx- PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	MUTADO	NO INDICADO
8	65	FE	Colon derecho	NO	MLH1 bx- MLH1 pz- PMS2 bx- PMS2 pz	ALTA	ND	WT	NO UCG
9	80	MA	Colon derecho	NO	MLH1 pz- PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	MUTADO	NO INDICADO
10	60	MA	Colon derecho	NO	MSH2 bx- MSH2 pz- MSH6 bx- MSH6 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	Mutación MSH2
11	75	MA	Colon izquierdo	NO	MLH1 pz- PMS2 pz	ESTABLE	ND	ND	ND
12	86	FE	Recto	NO	MSH2 bx- MSH2 pz- MSH6 bx- MSH6 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	Mutación MSH2
13	75	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz- PMS2 pz	ESTABLE	ND	ND	ND
14	41	MA	Colon derecho	NO	MLH1 pz- PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	Mutación MLH1
15	74	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz- PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	MUTADO	NO INDICADO
16	68	MA	Colon derecho	NO	MLH1 pz- PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	MUTADO	NO INDICADO
17	71	MA	Colon derecho	SI	MSH2 pz- MSH6 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	ND	NO INFORM
18	80	MA	Colon derecho	SI	MLH1 pz- PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	MUTADO	NO INDICADO
19	56	FE	Colon derecho	NO	MLH1 bx- MLH1 pz- PMS2 bx- PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	NO INFORM
20	80	FE	Colon izquierdo	NO	MLH1 bx- MLH1 pz- PMS2 bx- PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	NO INFORM
21	78	MA	Recto	NO	MSH2 pz- MSH6 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	NO INFORM

Caso	Edad	Sexo	Localización	Tto neoady	Proteína alterada	IMS	Hipermet MLH1	BRAF	Estudio Gen
22	67	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	ND	MUTADO	NO INDICADO
23	60	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	NO INFORM
24	62	FE	Colon derecho	NO	MLH1 bx-MLH1 pz-PMS2 bx-PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	NO INFORM
25	38	FE	Colon izquierdo	NO	MLH1 bx-MLH1 pz-PMS2 bx-PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	Mutación MLH1
26	80	MA	Colon derecho	NO	MLH1 bx-MLH1 pz-PMS2 bx-PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	WT	NO INDICADO
27	91	MA	Colon derecho	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	WT	NO INDICADO
28	86	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	NO INFORM
29	84	FE	Colon derecho	NO	MLH1 bx-MLH1 pz-PMS2 bx-PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	MUTADO	NO INDICADO
30	84	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	MUTADO	NO INDICADO
31	67	FE	Colon izquierdo	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	ND	MUTADO	NO INDICADO
32	72	FE	Colon derecho	NO	MLH1 bx-MLH1 pz-PMS2 bx-PMS2 pz	ALTA	ND	MUTADO	NO INDICADO
33	82	MA	Recto	SI	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	MUTADO	NO INDICADO
34	41	MA	Recto	SI	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	ND	WT	NO INFORM
35	62	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	NO UCG
36	68	FE	Colon derecho	NO	MLH1 bx-MLH1 pz-PMS2 bx-PMS2 pz	ALTA	NV	MUTADO	NO INDICADO
37	69	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	MUTADO	NO INDICADO
38	76	MA	Colon derecho	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	NO UCG
39	56	MA	Colon izquierdo	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	NO HIPERMETIL	WT	NO UCG
40	75	FE	Colon derecho	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	HIPERMETILADA	MUTADO	NO INDICADO
41	80	MA	Colon derecho	NO	MLH1 pz-PMS2 pz	ALTA	ND	WT	NO UCG

Bx: biopsia; Hipermet: hipermetilación; IMS: inestabilidad de microsatélites; ND: no disponible; No inform: no informativo; NV: no valorable; Pz: pieza; Tto neoady: tratamiento neoadyuvante; UCG: unidad de consejo genético; WT: wild type

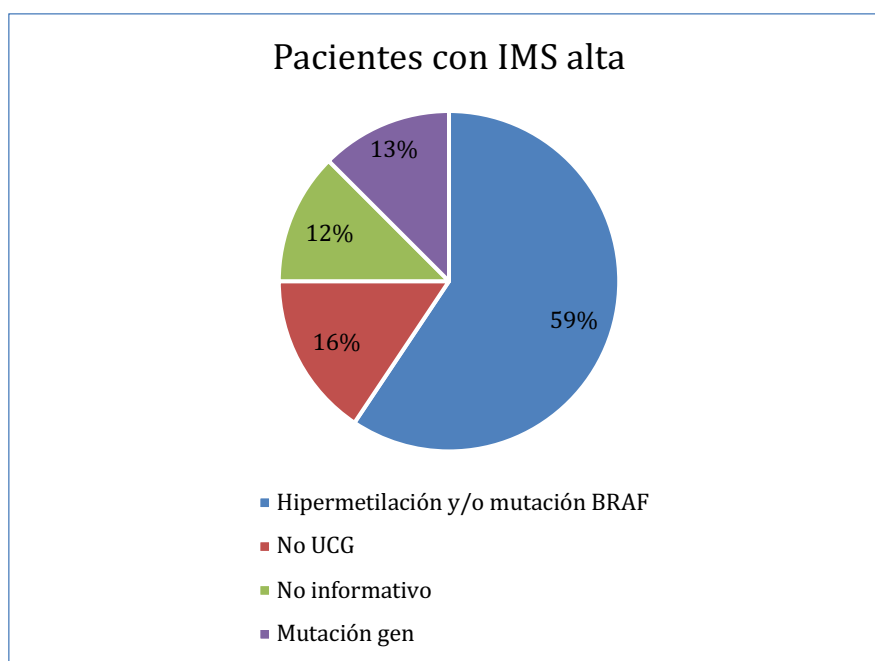


Figura 14. Estudios realizados en pacientes con IMS alta

5.3 Estudio inmunohistoquímico comparativo entre la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica

De los 361 individuos intervenidos de CCR, con la inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN realizada en la pieza quirúrgica, se recopilaban los datos de 154 pacientes en los que, además, había disponibilidad de la biopsia endoscópica correspondiente en nuestro centro y en la que el material era suficiente para el diagnóstico. Las características clínicas y demográficas de estos pacientes se muestran en la tabla 14.

De los casos incluidos 70 fueron mujeres (45,5%) y 84 fueron hombres (54,50%) y la edad mediana del diagnóstico fue de 67,75 años. Con referencia al tipo histológico, el adenocarcinoma era el más frecuente con un 93,5 % de los individuos (70% bien diferenciados, 26% moderadamente diferenciados y 2,6% mal diferenciados); en segundo lugar, estaban los tumores mucinosos. En cuanto a la localización tumoral la distribución era: el recto en un 22%, el colon izquierdo en un 40% y el colon derecho en un 38%. En la tabla 14 se recogen las variables mencionadas de los pacientes y otras relacionadas con

el tumor como el estadio, la infiltración linfovascular, la infiltración perineural, el tumor budding, la invasión vascular extramural (EMVI) y los grupos pobremente diferenciados (gemaciones tumorales).

Tabla 14. Características demográficas y clínicas del subgrupo de estudio

Variable	Total
	154 (100%)
Edad del diagnóstico	
Media (desviación estándar)	66.35 (14.65)
Mediana (IQR)	67.75 (60.05-75.18)
Sexo	
Femenino	70 (45.50%)
Masculino	84 (54.50%)
Tipo histológico	
Adenocarcinoma	144 (93.50%)
Mucinoso	10 (6.50%)
Grado	
Bien diferenciado (1)	107 (70.90%)
Moderadamente diferenciado (2)	40 (26.50%)
Mal diferenciado (3)	4 (2.60%)
No disponible	3
Localización	
Recto	34 (22.10%)
Colon izquierdo	62 (40.30%)
Colon derecho	58 (37.70%)
Tratamiento neoadyuvante	
No	116 (75.30%)
Sí	38 (24.70%)
Estadio	
I	44 (28.60%)
II	37 (24.00%)
III	53 (34.40%)
IV	20 (13.00%)
Infiltración linfovascular	
No	62 (40.50%)
Sí	91 (59.50%)
No disponible	1
Infiltración perineural	
No	73 (48.00%)

Sí	79 (52.00%)
No disponible	2
Tumor Budding	
No	65 (51.60%)
Sí	61 (48.40%)
No disponible	28
Invasión vascular extramural (EMVI)	
No	81 (64.30%)
Sí	45 (35.70%)
No disponible	28
Grupos pobremente diferenciados (gemaciones tumorales)	
No	56 (47.90%)
Sí	61 (52.10%)
No disponible	37

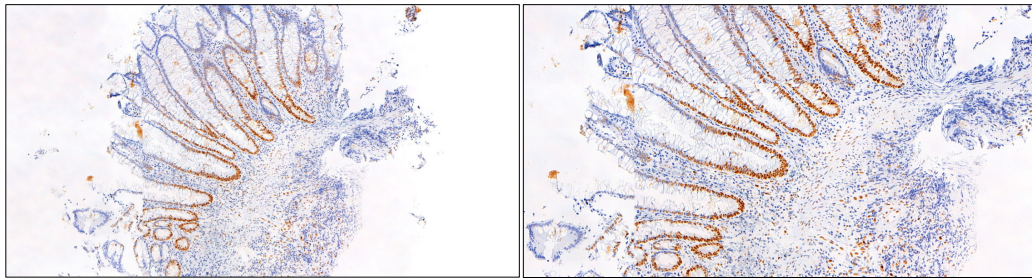
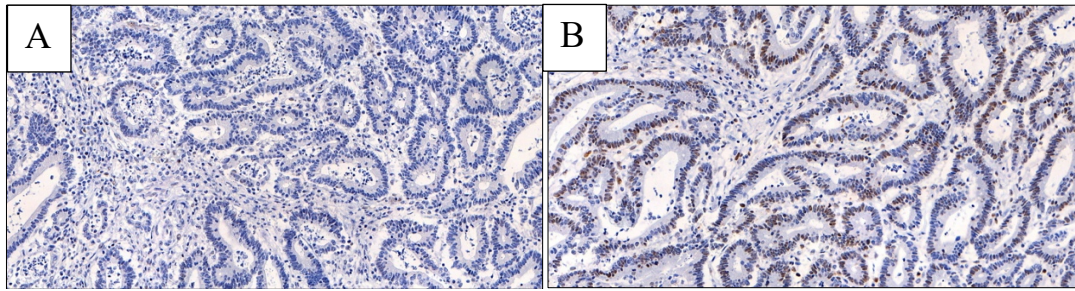
En el grupo de los 154 pacientes con CCR, e IHQ hecha en la pieza quirúrgica y en la biopsia endoscópica, la técnica IHQ fue no valorable para las siguientes proteínas: 8 en MLH1 (2 pacientes en la pieza, 6 pacientes en la biopsia), 9 en PMS2 (3 pacientes en la pieza, 6 pacientes en la biopsia), 8 en MSH2 (2 en la pieza, 6 en la biopsia) y 6 en MSH6 (biopsia) (tablas 15 y 16). Todos los casos de tinción no válida en la pieza se debían a un fallo en el control interno (ausencia de tinción nuclear en las células del estroma adyacentes al tumor) (Ilustración 7) mientras que las no valorables de las biopsias endoscópicas se produjeron por ausencia de tejido tumoral en las muestras disponibles (Ilustración 8). Cada uno de ellos se eliminaron posteriormente del análisis comparativo.

Tablas 15 y 16. Inmunohistoquímica no valorable en la biopsia endoscópica o en la pieza quirúrgica

Caso	Edad	Sexo	Localización	Biopsia endoscópica				Pieza quirúrgica			
				MLH1	PMS2	MSH2	MSH6	MLH1	PMS2	MSH2	MSH6
1	77	FE	Colon derecho	NV	NV	NV	NV	Pérdida	Pérdida	CSV	CSV
2	57	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	NV	NV	NV	CSV
3	68	MA	Recto	NV	NV	NV	NV	CSV	CSV	CSV	CSV
4	83	MA	Recto	NV	NV	NV	NV	CSV	CSV	CSV	CSV
5	48	MA	Colon derecho	NV	NV	NV	NV	CSV	CSV	CSV	CSV
6	81	MA	Colon derecho	NV	NV	NV	NV	CSV	CSV	CSV	CSV
7	81	MA	Colon derecho	NV	NV	NV	NV	CSV	CSV	CSV	CSV
8	75	FE	Colon derecho	Pérdida	Pérdida	CSV	CSV	NV	NV	NV	CSV
9	62	FE	Colon derecho	CSV	CSV	CSV	CSV	CSV	NV	CSV	CSV

CSV: conservada; FE: femenino; MA: masculino; NV: no valorable; ND: no disponible

	TOTAL	IHQ NO VALORABLE		IHQ VALORABLE
		Biopsia endoscópica	Pieza quirúrgica	Total
MLH1	154	6	2	146
PMS2	154	6	3	145
MSH2	154	6	2	146
MSH6	154	6	-	148



En la tabla 17 vemos los resultados de la expresión de la proteína reparadora del ADN MLH1 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica correspondiente de los pacientes con CCR. De los 154 se excluyeron 8 con MLH1 no valorable (2 pacientes en la pieza y 6 pacientes en la biopsia). De los 146 pacientes estudiados hubo concordancia entre biopsia-pieza en 144 casos (98,63%), presentando una expresión conservada en 130 individuos y una pérdida de expresión en 14 individuos. En los dos casos restantes no hubo coincidencia. En uno de ellos hubo una expresión conservada en la biopsia endoscópica mientras había pérdida en la pieza respectiva (ilustración 7) y en el otro a la inversa, la expresión estaba conservada en la pieza y había pérdida en la biopsia (ilustración 8). Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad de la biopsia endoscópica para la detección de pérdida de expresión de MLH1 de 93.33% y 99.24% respectivamente. El coeficiente Kappa de Cohen fue de 0.93.

Tabla 17. MLH1 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica

	MLH1 pieza			
MLH1 biopsia	CONSERVADA	PERDIDA	Total	p-value
CONSERVADA	130 (99.24%)	1 (0.76%)	131 (89.73%)	<0.001
PERDIDA	1 (6.67%)	14 (93.33%)	15 (10.27%)	
Total	131 (89.73%)	15 (10.27%)	146 (100.00%)	

Indicador	Estimación	IC95%
Prevalencia	10.27	5.87-16.38
Pacientes correctamente clasificados	98.63	95.14-99.83
Sensibilidad	93.33	68.05-99.83
Especificidad	99.24	95.82-99.98
Valor predictivo positivo	93.33	68.05-99.83
Valor predictivo negativo	99.24	95.82-99.98
Razón de probabilidad positiva	122.27	17.27-865.54
Razón de probabilidad negativa	0.07	0.01-0.45
Coeficiente Kappa de Cohen	0.93	0.82-1.00

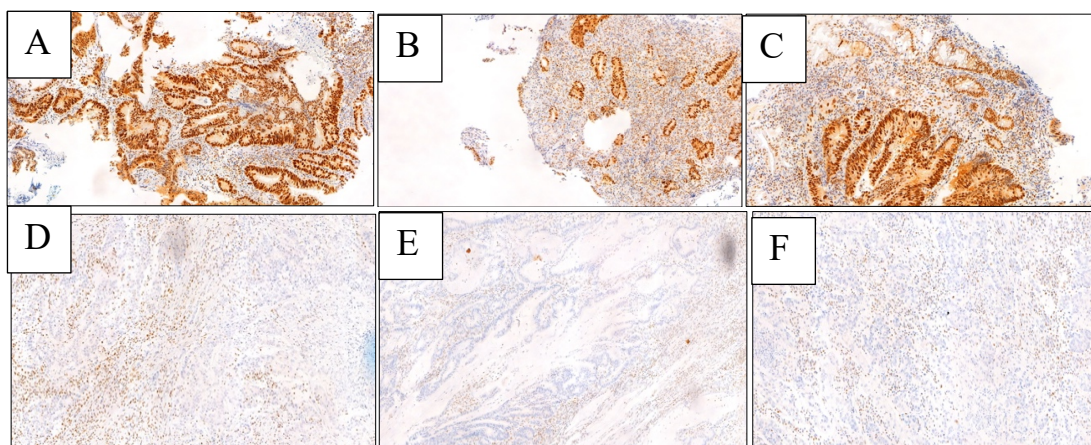


Ilustración 9. Tinción inmunohistoquímica de MLH1 y PMS2 en la biopsia endoscópica (expresión conservada) y la pieza quirúrgica (pérdida de expresión) correspondiente.

A: MLH1 biopsia; B: PMS2 biopsia; C: PMS2 biopsia; D: MLH1 pieza; E: PMS2 pieza; F: PMS2 pieza

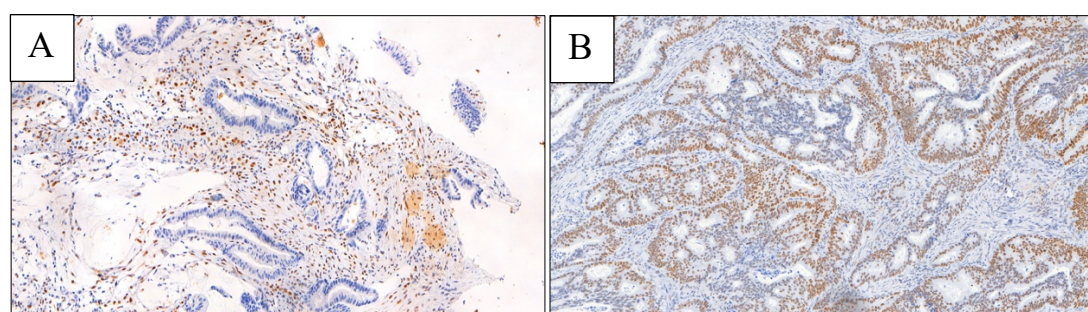


Ilustración 10. Tinción inmunohistoquímica de MLH1 en la biopsia endoscópica (A: pérdida de expresión) y la pieza quirúrgica (B: expresión conservada) correspondiente.

En la tabla 18 vemos los resultados de la expresión de la proteína reparadora del ADN PMS2 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica correspondiente de los pacientes con CCR. De los 154 se excluyeron 9 con PMS2 no valorable (3 pacientes en la pieza y 6 pacientes en la biopsia). De los 145 pacientes estudiados hubo concordancia entre biopsia-pieza en 143 casos (98,62%), presentando una expresión conservada en 129 individuos y una pérdida de expresión en 14 individuos. En los dos casos restantes no hubo coincidencia. En uno de ellos hubo una expresión conservada en la biopsia endoscópica mientras había pérdida en la pieza respectiva (ilustración 7) y en el otro a la inversa, la expresión estaba conservada en la pieza y había pérdida en la biopsia. Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad de la biopsia endoscópica para la detección de pérdida de expresión de PMS2 de 93.33% y 99.24% respectivamente. El coeficiente Kappa de Cohen fue de 0.93.

Tabla 18. PMS2 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica

	PMS2 pieza			
PMS2 biopsia	CONSERVADA	PERDIDA	Total	p-value
CONSERVADA	129 (99.23%)	1 (0.77%)	130 (89.66%)	<0.001
PERDIDA	1 (6.67%)	14 (93.33%)	15 (10.34%)	
Total	130 (89.66%)	15 (10.34%)	145 (100.00%)	

Indicador	Estimación	IC95%
Prevalencia	10.34	5.91-16.49
Pacientes correctamente clasificados	98.62	95.11-99.83
Sensibilidad	93.33	68.05-99.83
Especificidad	99.23	95.79-99.98
Valor predictivo positivo	93.33	68.05-99.83
Valor predictivo negativo	99.23	95.79-99.98
Razón de probabilidad positiva	121.33	17.14-858.88
Razón de probabilidad negativa	0.07	0.01-0.45
Coeficiente Kappa de Cohen	0.93	0.82-1.00

En la tabla 19 vemos los resultados de la expresión de la proteína reparadora del ADN MSH2 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica correspondiente de los pacientes con CCR. De los 154 se excluyeron 8 con MSH2 no valorable (2 pacientes en la pieza y 6 pacientes en la biopsia). De los 146 pacientes estudiados hubo concordancia entre biopsia-pieza en 100% de los casos, presentando una expresión conservada en 144 individuos y una pérdida de expresión en 2 individuos. Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad de la biopsia endoscópica para la detección de pérdida de expresión de MSH2 del 100% en ambas. El coeficiente Kappa de Cohen fue de 1.

Tabla 19. MSH2 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica

	MSH2 pieza			
MSH2 biopsia	CONSERVADA	PERDIDA	Total	p-value
CONSERVADA	144 (100.00%)	0 (0.00%)	144 (98.63%)	<0.001
PERDIDA	0 (0.00%)	2 (100.00%)	2 (1.37%)	
Total	144 (98.63%)	2 (1.37%)	146 (100.00%)	

Indicador	Estimación	IC95%
Prevalencia	1.37	0.17-4.86
Pacientes correctamente clasificados	100.0	97.51-100.0
Sensibilidad	100.0	15.81-100.0
Especificidad	100.0	97.47-100.0
Valor predictivo positivo	100.0	15.81-100.0
Valor predictivo negativo	100.0	97.47-100.0
Razón de probabilidad positiva	ND	ND
Razón de probabilidad negativa	0.0	ND
Coeficiente Kappa de Cohen	1.0	1.0-1.0

ND: no disponible

En la tabla 20 vemos los resultados de la expresión de la proteína reparadora del ADN MSH6 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica correspondiente de los pacientes con CCR. De los 154 se excluyeron 6 con MSH6 no valorable (6 pacientes en la biopsia). De los 148 pacientes estudiados hubo concordancia entre biopsia-pieza en 100% de los casos, presentando una expresión conservada en 146 individuos y una pérdida de expresión en 2 individuos. Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad de la biopsia endoscópica para la detección de pérdida de expresión de MSH6 del 100% en ambas. El coeficiente Kappa de Cohen fue de 1.

Tabla 20. MSH6 en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica

	MSH6 pieza			
MSH6 biopsia	CONSERVADA	PERDIDA	Total	p-value
CONSERVADA	146 (100.00%)	0 (0.00%)	146 (98.65%)	<0.001
PERDIDA	0 (0.00%)	2 (100.00%)	2 (1.35%)	
Total	146 (98.65%)	2 (1.35%)	148 (100.00%)	

Indicador	Estimación	IC95%
Prevalencia	1.35	0.16-4.8
Pacientes correctamente clasificados	100.0	97.54-100.0
Sensibilidad	100.0	15.81-100.0
Especificidad	100.0	97.51-100.0
Valor predictivo positivo	100.0	15.81-100.0
Valor predictivo negativo	100.0	97.51-100.0
Razón de probabilidad positiva	ND	ND
Razón de probabilidad negativa	0.0	ND
Coeficiente Kappa de Cohen	1.0	1.0-1.0

ND: no disponible

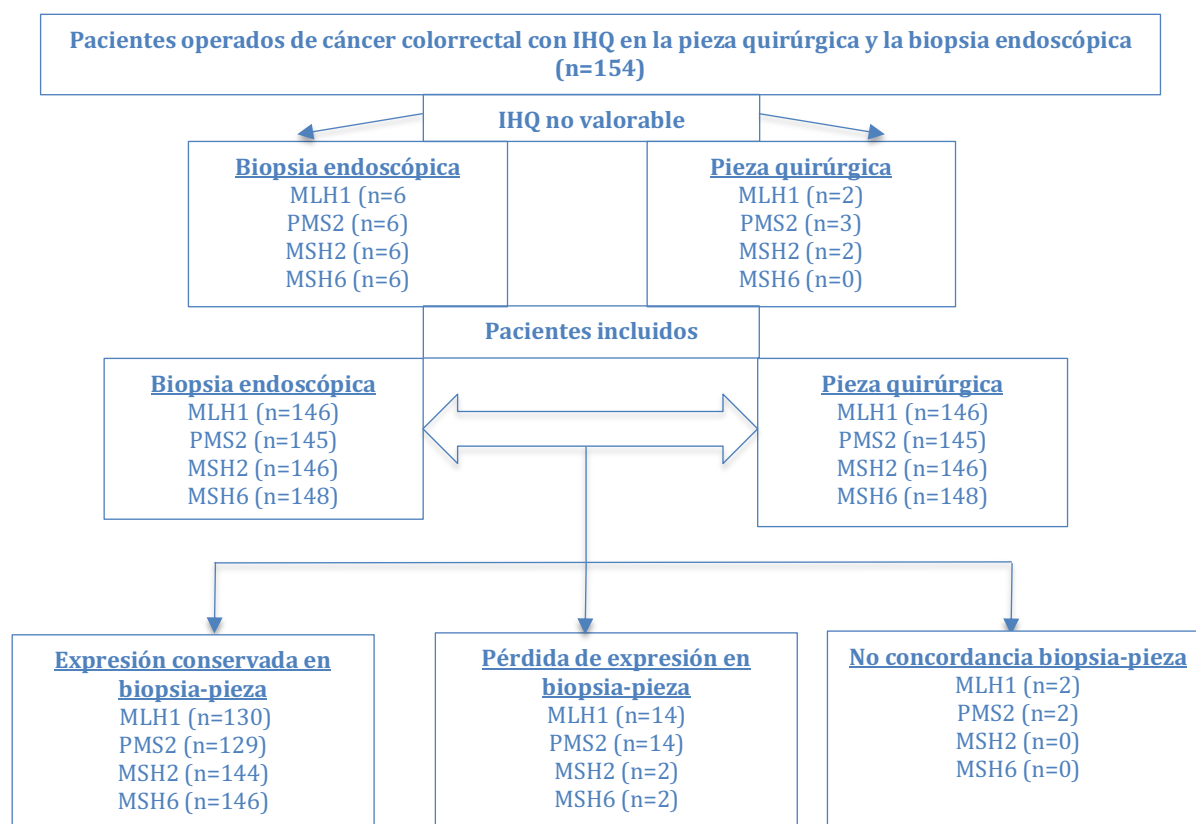


Figura 15. Análisis comparativo de la IHQ de las proteínas MMR en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica

5.4 Respuestas patológicas completas tras la neoadyuvancia

De los 732 individuos del grupo general recibieron tratamiento con quimioterapia, radioterapia o ambas previo a la cirugía del cáncer colorrectal 102 pacientes (fig.16).

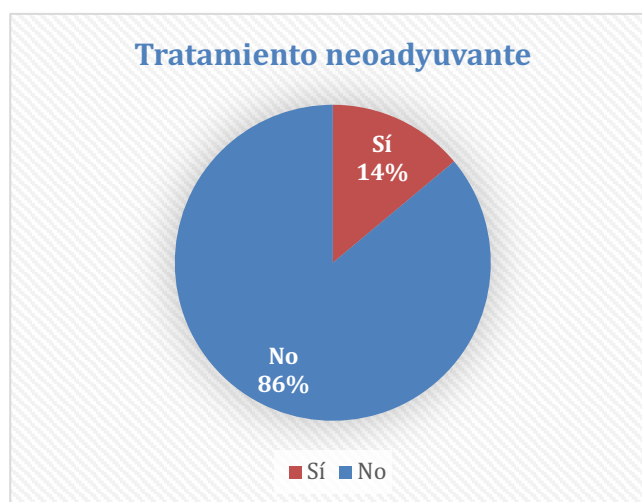


Figura 16. Pacientes con tratamiento neoadyuvante

La localización tumoral más frecuente de los pacientes que llevaron neoadyuvancia fue el recto (72 casos), ya que es el tratamiento estándar, pero también hubo 22 cánceres en el colon izquierdo y 8 en el colon derecho. Los tumores de colon localmente avanzados se benefician igualmente del tratamiento neoadyuvante. Los diferentes esquemas terapéuticos se describen en la tabla 21.

Tabla 21. Neoadyuvancia. Localización del tumor y tipo de tratamiento

Pacientes con tratamiento neoadyuvante	
	102 (100%)
Localización	
Recto	72 (70.60%)
Colon izquierdo	22 (21.60%)
Colon derecho	8 (7.80%)
Tipo de tratamiento	
QT	46 (45.10%)
QT+ RT	36 (35.30%)
QT-QT+RT	19 (18.60%)
RT	1 (1.00%)

QT: quimioterapia; QT+RT: quimioradioterapia;
 QT-QT+RT: quimioterapia seguida de quimioradioterapia;
 RT: radioterapia

En 6 (5,88%) de los 102 pacientes no se encontró tumor en la pieza quirúrgica tras el tratamiento neoadyuvante; todos ellos pertenecían al grupo de cáncer de recto (tabla 22).

Tabla 22. Respuestas patológicas completas tras neoadyuvancia

Respuestas patológicas completas		
	N	%
ypT0N0	6	5.88
Resto	96	94.12
Total	102	100.00

5.5 Inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN tras la neoadyuvancia

De la serie de 154 pacientes, con la inmunohistoquímica realizada en la pieza quirúrgica y la biopsia endoscópica, 38 (24.68%) habían recibido tratamiento con quimioterapia o quimio-radioterapia previo a la cirugía. En este subgrupo de pacientes no era aplicable la búsqueda de una respuesta patológica completa debido a que la presencia de tumor en la pieza quirúrgica era una condición sine qua non para poder llevar a cabo el estudio IHQ y compararlo posteriormente con el de la biopsia endoscópica.

La expresión de las proteínas reparadoras del ADN estaba conservada en la biopsia endoscópica en los 38 sujetos y tras la neoadyuvancia el estatus MMR se modificó en un solo paciente para las proteínas MLH1, PMS2 y MSH2. En este caso la expresión estaba conservada en la biopsia endoscópica mientras que en la pieza quirúrgica resultó no valorable. En la tabla 23 vemos las características de los pacientes descritos.

Tabla 23. Inmunohistoquímica de las proteínas MMR en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica tras la neoadyuvancia

Caso	Edad	Sexo	Localización	Biopsia endoscópica				Tipo de neoadyuvancia	Pieza quirúrgica			
				MLH1	PMS2	MSH2	MSH6		MLH1	PMS2	MSH2	MSH6
1	79	FE	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
2	49	MA	Colon derecho	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
3	60	MA	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
4	66	FE	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
5	63	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
6	73	FE	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
7	72	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT-QT+RT	CSV	CSV	CSV	CSV
8	64	MA	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
9	67	FE	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
10	63	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
11	57	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT-QT+RT	CSV	CSV	CSV	CSV
12	67	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT RT	CSV	CSV	CSV	CSV
13	55	MA	Colon derecho	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
14	43	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	RT	CSV	CSV	CSV	CSV
15	60	MA	Ciego	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
16	54	MA	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
17	43	FE	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
18	68	FE	Colon izquierdo	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
19	83	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
20	65	MA	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
21	72	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT RT	CSV	CSV	CSV	CSV
22	48	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT RT	CSV	CSV	CSV	CSV
23	68	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
24	51	FE	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
25	77	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT RT	NV	NV	NV	CSV
26	54	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT-QT+RT	CSV	CSV	CSV	CSV
27	50	FE	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT RT	CSV	CSV	CSV	CSV
28	77	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT-QT+RT	CSV	CSV	CSV	CSV
29	55	FE	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
30	44	FE	Sigma	CSV	CSV	CSV	CS	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
31	72	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
32	58	FE	Sigma	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
33	66	FE	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT-QT+RT	CSV	CSV	CSV	CSV
34	48	MA	Colon derecho	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
35	57	MA	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT-QT+RT	CSV	CSV	CSV	CSV
36	40	FE	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT-QT+RT	CSV	CSV	CSV	CSV
37	66	FE	Recto	CSV	CSV	CSV	CSV	QT	CSV	CSV	CSV	CSV
38	51	MA	Colon derecho	CSV	CSV	CSV	CSV	QT RT	CSV	CSV	CSV	CSV

CSV: conservada; FE: femenino; MA: masculino; NV: no valorable; QT: quimioterapia; QT+RT: quimioradioterapia; QT-QT+RT: quimioterapia seguida de quimioradioterapia;

5.6 Relación de la inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN con distintas variables clínico-patológicas

Se planteó un estudio para ver la asociación estadística entre la expresión tisular de las proteínas reparadoras del ADN y la edad del diagnóstico, el sexo, la localización tumoral, el tipo anatomopatológico, el grado de diferenciación celular y el estadio tumoral. El objetivo era establecer una relación pronóstica entre el estatus MMR y las distintas variables.

De los 361 pacientes incluidos el 11.35% de los casos (41 pacientes) tuvo una expresión inmunohistoquímica nuclear patológica (pérdida) mientras el 88.64% (320 pacientes) presentó una inmunohistoquímica normal. La pérdida de expresión fue la variable dependiente frente al resto de variables mencionadas que fueron las independientes.

La expresión conservada en las proteínas reparadoras del ADN aparecía en pacientes con una edad mediana de 66,28 años, predominantemente en el sexo masculino y con mayor frecuencia en tumores del colon izquierdo. Respecto al tipo histológico, más del 90 % correspondían a adenocarcinomas, en su mayor parte bien diferenciados.

En cuanto a los tumores con pérdida de expresión en las proteínas reparadoras del ADN, en nuestra serie se presentaron con una edad mediana de 74,27 años, eran más frecuentes en mujeres (61%) y los tumores localizados en el colon derecho (78%). El tipo anatomopatológico más frecuente seguía siendo el adenocarcinoma convencional (65,8%), sin embargo, el porcentaje de tumores mucinosos era muy alto (29,2%). En relación al grado de diferenciación, predominaban los tumores bien o moderadamente diferenciados (figura 17).

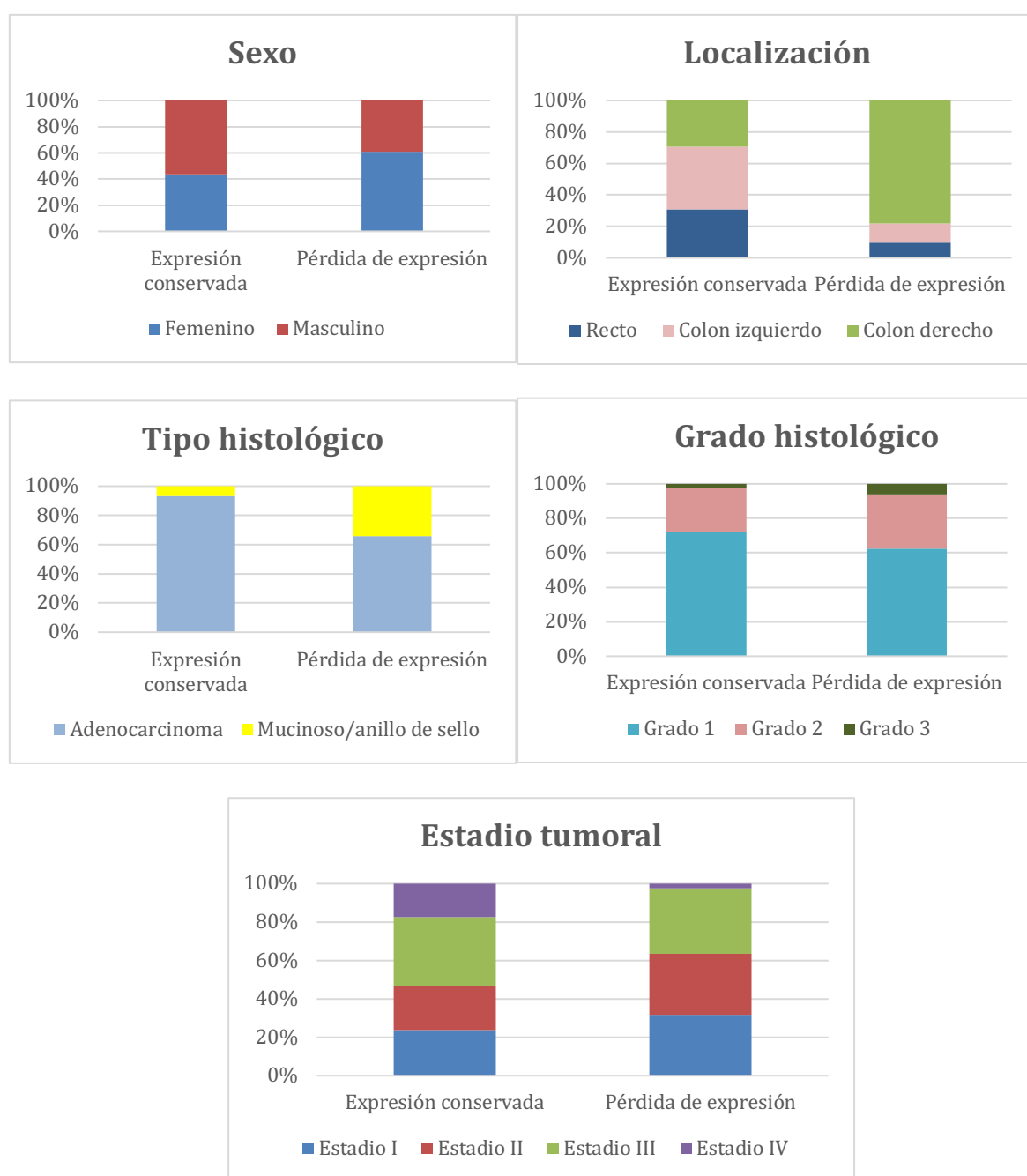


Figura 17. Variables clínico-patológicas en relación a la expresión IHQ-MMR

Al comparar ambos grupos usando un modelo de regresión logística binaria y análisis univariado pudimos concluir que había diferencias estadísticamente significativas en todas las variables estudiadas (tabla 24). Con respecto a la edad, como el OR es de 1.043, al aumentar en una unidad la edad aumenta un 4,3 % la probabilidad de sufrir pérdida; en cambio, el género masculino la disminuye en un 50 %. Otras categorías en las que se ha demostrado relación significativa con el evento pérdida son la localización del tumor en el colon derecho, los tipos histológicos de células en anillo de sello y mucinoso, el grado 3 de diferenciación y el estadio tumoral IV.

Tabla 24. Asociación de la expresión inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN y distintas variables

Pérdida de expresión MMR						
	Total	No	Sí	OR	IC:95%	Valor p
	361 (100%)	320 (88.64 %)	41 (11.36%)			
Edad del diagnóstico				1.043	1.014-1.076	0.006
Media (DE)	65.37 (15.27)	64.63 (15.48)	71.16 (12.21)			
Mediana (IQR)	66.96 (57.31-74.97)	66.28 (56.38-74.13)	74.27 (66.61-79.74)			
Sexo						
Femenino	165 (45.70%)	140 (84.85%)	25 (15.15%)	(línea base)		
Masculino	196 (54.30%)	180 (91.84%)	16 (8.16%)	0.50	0.25-0.96	0.040
Localización						
Recto	103 (28.50%)	99 (96.12%)	4 (3.88%)	(línea base)		
Colon izquierdo	132 (36.60%)	127 (96.21%)	5 (3.79%)	0.97	0.25- 4.03	0.970
Colon derecho	126 (34.90%)	94 (74.60%)	32 (25.40%)	8.43	3.19-29.09	0.000
Tipo AP						
Adenocarcinoma	325 (90.30%)	298 (91.69%)	27 (8.31%)	(línea base)		
Mucinoso/ anillo sello	35 (9.70%)	21 (60.00%)	14 (40.00%)	7.36	3.33-16.08	0.000
No disponible	1	1	0			
Grado						
1	240 (71.20%)	220 (91.67%)	20 (8.33%)	(línea base)		
2	87 (25.80%)	77 (88.51%)	10 (11.49%)	1.43	0.62- 3.12	0.384
3	10 (3.00%)	7 (70.00%)	3 (30.00%)	4.71	0.96-18.46	0.033
No disponible	24	16	8			
Estadio						
I	88 (24.80%)	75 (85.23%)	13 (14.77%)	(línea base)		
II	85 (23.90%)	72 (84.71%)	13 (15.29%)	1.04	0.45-2.42	0.924
III	126 (35.50%)	112 (88.89%)	14 (11.11%)	0.72	0.32-1.64	0.429
IV	56 (15.80%)	55 (98.21%)	1 (1.79%)	0.10	0.01-0.55	0.032
No disponible	6	6	0			

P<0.05 (significativa)

Todas las variables del análisis univariante resultaron estadísticamente significativas por lo que fueron incluidas en el estudio multivariado. En la tabla 25 vemos el resultado del mismo.

Tabla 25. Estudio multivariado

	OR	IC	95%	p.value
Edad	1.01965	0.99190	1.05896	0.248
Sexo (MA)	0.55598	0.23480	1.28759	0.173
Localización (Colon izquierdo)	0.64935	0.14235	2.96845	0.564
Localización (Colon derecho)	5.46359	1.86229	20.34150	0.004
Tipo AP (Mucinoso /Anillo Sello)	10.33757	2.28841	51.81158	0.003
Grado (2)	1.80222	0.65895	4.79843	0.24
Grado (3)	6.01515	0.91866	35.89224	0.05
Estadio (II)	0.56394	0.17563	1.68890	0.316
Estadio (III)	0.54421	0.18771	1.53022	0.251
Estadio (IV)	0.06227	0.00303	0.41319	0.016

El primer indicador con capacidad pronóstica fue el tipo histológico mucinoso/anillo de sello (OR>1). De esta manera, los pacientes con este tipo anatomopatológico tuvieron una mayor probabilidad de sufrir una pérdida de expresión de las proteínas reparadoras del ADN que los pacientes con adenocarcinomas convencionales.

En el caso de la localización solo es estadísticamente significativa la localización en el colon derecho (OR>1); entonces los pacientes con tumores en dicha ubicación tenían mayor probabilidad de sufrir el evento pérdida que los pacientes con neoplasias de colon izquierdo o recto.

Otro predictor de pérdida de expresión proteica fue el grado 3 de diferenciación tumoral. Así, los pacientes con tumores pobremente diferenciados tuvieron más riesgo de sufrir una pérdida de expresión de las proteínas reparadoras del ADN que los pacientes con neoplasias bien o moderadamente diferenciadas.

Por último, en relación al estadio tumoral, solo fue estadísticamente significativo el estadio IV; por tanto, estos pacientes tuvieron una mayor probabilidad de sufrir el evento pérdida que los pacientes con los demás estadios.

Las únicas variables que continuaron siendo estadísticamente significativas en el análisis multivariante son la localización, el tipo AP, el grado y el estadio.

5.7 Análisis comparativo entre la inmunohistoquímica y la inestabilidad de microsatélites

El análisis de marcadores de la inestabilidad de microsatélites mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estaba disponible en un total de 332 pacientes de todos los integrantes del estudio. En este grupo de pacientes se pudo comparar la IMS con la IHQ de las proteínas reparadoras del ADN (tabla 26).

En 38 de los 332 individuos estudiados hubo una IMS alta (dos o más de los marcadores se encontraban inestables en el tumor), mientras que 294 la tuvieron baja o estable (inestabilidad en un solo marcador o en ninguno). Del mismo modo, en este grupo presentaron una expresión conservada de las proteínas reparadoras del ADN el 88,55% (294 pacientes) y una pérdida en 11,45% (38 pacientes). Sin embargo, cuando comparamos ambas técnicas, no hubo coincidencia en 4 casos; en 2 de ellos existía una falta de expresión MMR con una IMS estable (Ilustración 9, figura 18) y en otros 2 una IHQ conservada con una IMS alta (Ilustración 10, figura 19). La concordancia entre la IHQ y la IMS fue del 98,8%. En estos 4 casos los resultados de la IHQ fueron similares en la biopsia y en la pieza quirúrgica y discrepantes con la IMS.

Tabla 26. Comparación entre los resultados de la IHQ y la inestabilidad de microsatélites

	Inmunohistoquímica			
IMS	Conservada	Perdida	Total	p-value
Estable	292 (99.32%)	2 (0.68%)	294 (88.55%)	<0.001
Alta	2 (5.26%)	36 (94.74%)	38 (11.45%)	
Total	294 (88.55%)	38 (11.45%)	332 (100.00%)	

Indicador	Estimación	IC95%
Prevalencia	11.45	8.23-15.37
Pacientes correctamente clasificados	98.8	96.94-99.67
Sensibilidad	94.74	82.25-99.36
Especificidad	99.32	97.56-99.92
Valor predictivo positivo	94.74	82.25-99.36
Valor predictivo negativo	99.32	97.56-99.92
Razón de probabilidad positiva	139.26	34.92-555.34
Razón de probabilidad negativa	0.05	0.01-0.2
Coeficiente Kappa de Cohen	0.94	0.88-1.00

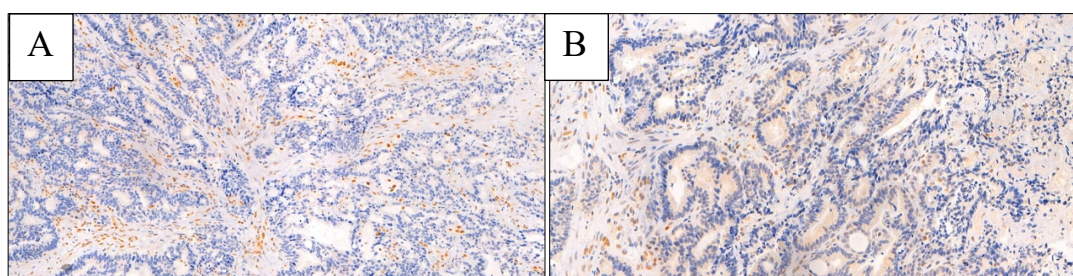


Ilustración 11. Tinción IHQ de las proteínas reparadoras del ADN en un cáncer colorrectal con pérdida de expresión MLH1 (A) y PMS2 (B) de un paciente con IMS estable (Fig. 17)

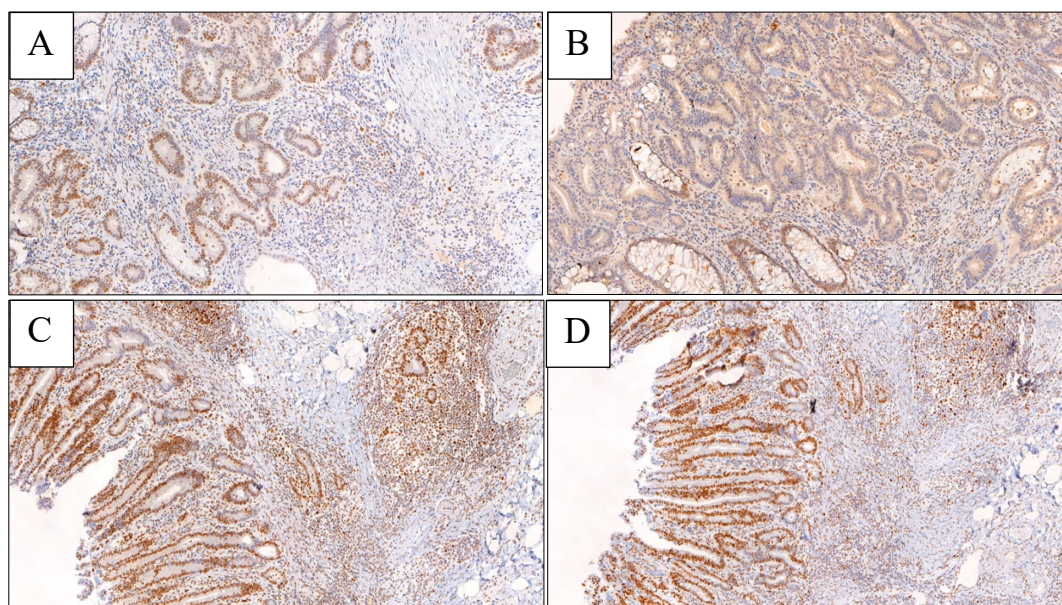


Ilustración 12. Tinción IHQ con expresión conservada de las 4 proteínas reparadoras del ADN en un cáncer colorrectal de un paciente con IMS alta (Fig. 18)

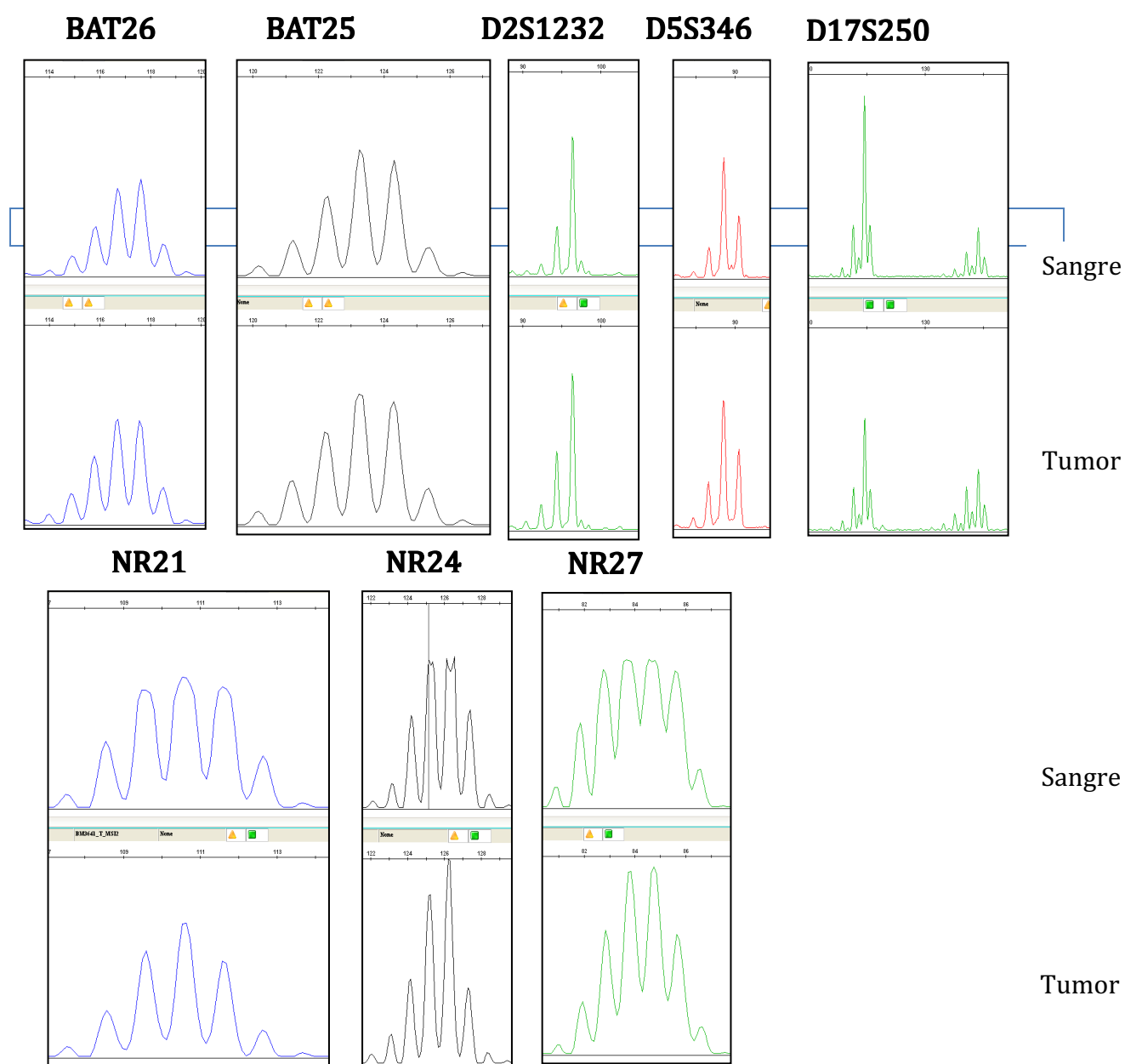


Figura 18. Panel de 8 marcadores de microsatélites. Tumor estable en un paciente con pérdida de expresión MLH1 y PMS2 (Ilustración 9)

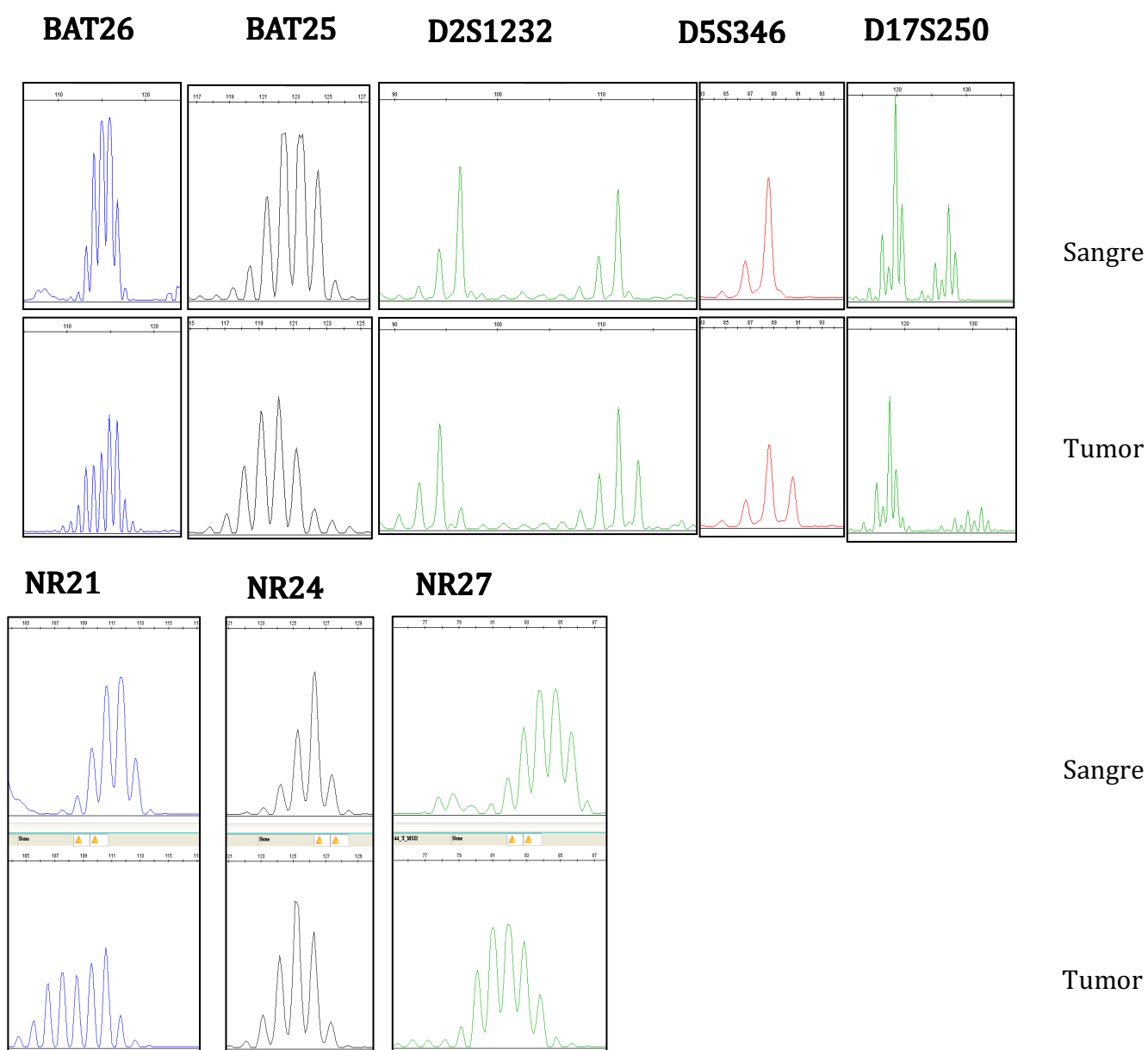


Figura 19. Panel de 8 marcadores de microsatélites. Tumor con inestabilidad alta en un paciente con expresión conservada de las 4 proteínas MMR (Ilustración 10)

6. DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) constituye un problema de salud mundial ya que es una de las neoplasias más frecuentes en los países desarrollados y la segunda causa de muerte por cáncer (39,40). Se trata de una enfermedad heterogénea que surge por la acumulación secuencial de procesos genéticos y epigenéticos (6–9). Uno de los mecanismos implicados en la carcinogénesis del CCR es la alteración del sistema de reparación de los errores producidos durante la replicación del ADN, que está controlada por los genes MMR (mismatch repair), fundamentalmente el *MHL1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Dichas alteraciones ocasionan los “tumores por inestabilidad de microsatélites” (IMS) que suponen el 95 % de los CCR hereditarios (síndrome de Lynch) y el 15 % de los CCR esporádicos; en estos últimos es debido al silenciamiento epigenético de *MLH1* mediante la hipermetilación del promotor de este (10–12).

La identificación de los tumores colorrectales con inestabilidad de microsatélites (dMMR) es importante por diferentes motivos, y especialmente, en el momento del diagnóstico, como ahora detallaremos.

Un aspecto esencial en la detección de los tumores dMMR es su valor pronóstico y predictivo. Diversos estudios han puesto de manifiesto que los tumores inestables tienen un pronóstico más favorable que los estables, con menor porcentaje de metástasis ganglionares y metástasis a órganos distantes (146,147). Por otro lado, la IMS es un factor predictivo de gran relevancia para decidir la terapia adyuvante con fluoropirimidinas en estadios II de CCR, ya que estos pacientes son resistentes al tratamiento y por consiguiente, no se benefician del mismo (29–31). Al mismo tiempo, se ha objetivado que los tumores colorrectales metastásicos con IMS tienen mejor respuesta y una supervivencia libre de progresión mayor cuando reciben inmunoterapia que cuando son tratados con quimioterapia convencional (30,93). La Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado el uso de nivolumab y pembrolizumab en estos pacientes.

Otro punto primordial en la búsqueda de los tumores dMMR es el despistaje del síndrome de Lynch (SL). En este sentido, las sociedades científicas recomiendan desde hace unos años el cribado universal de todos los CCR diagnosticados, ya que la identificación de estos casos es coste-efectiva porque incrementa la tasa de detección precoz de CCR y de tumores extracolónicos, mediante la adecuada vigilancia de los familiares portadores

(24–28). El diagnóstico de certeza del SL requiere la determinación de la mutación germinal en alguno de los genes reparadores del ADN. Dada la complejidad y el coste de dicho procedimiento se propone la realización previa de una técnica de selección sobre tejido tumoral: la expresión inmunohistoquímica de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 (IHQ-MMR) y/o el estudio molecular de inestabilidad de microsatélites (IMS) (20,21). La elección de uno u otro método debe basarse en la disponibilidad del centro ya que ambos han demostrado una eficacia equivalente (22). La IHQ posee, no obstante, la ventaja de dirigir el análisis genético al gen que codifica para la proteína no expresada.

A pesar de lo expuesto anteriormente, la estrategia de cribado universal del SL se ha implantado de forma heterogénea en los distintos centros y, en los casos en los que se ha puesto en práctica, el estudio inicial de inestabilidad de microsatélites en el tejido tumoral se lleva a cabo en la pieza quirúrgica (148–150).

La realización de la inmunohistoquímica de las proteínas de los genes reparadores del ADN en las biopsias endoscópicas de CCR previas a la cirugía aporta grandes ventajas. Uno de los beneficios es la detección preoperatoria del SL ya que ayuda a la toma de decisiones sobre el manejo terapéutico de estos pacientes. Cuando un individuo afecto de SL se diagnostica de un CCR se debe tratar con una colectomía subtotal y no con una resección segmentaria del colon (66,139). Asimismo, durante la cirugía se debería realizar una histerectomía profiláctica en aquellas mujeres que ya hayan satisfecho su deseo gestacional (136).

Otro motivo para efectuar la IHQ-MMR en las biopsias endoscópicas es, que en algunas ocasiones, no se encuentra tumor en el espécimen quirúrgico tras el tratamiento neoadyuvante (34–38). En el cáncer de recto localmente avanzado, el tratamiento estándar es la quimioterapia y radioterapia seguidos de cirugía, por lo que en muchos de los casos se observan respuestas patológicas completas (ausencia de tumor en la pieza quirúrgica). Además, hay estudios que sugieren que el tratamiento neoadyuvante podría alterar el estatus MMR, posiblemente debido a la hipoxia y al estrés oxidativo que producen los tratamientos (129,130,151).

Por otra parte, las tinciones inmunohistoquímicas se efectúan en cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. Por ello, otra posible ventaja de determinar la IHQ-MMR en las biopsias endoscópicas es su pequeño tamaño, de manera que permite un mayor grado de fijación, facilitando la técnica y aumentando la sensibilidad de la misma (35,152).

Por todo lo referido con anterioridad y dada la importancia de la identificación de los tumores con inestabilidad de microsatélites, particularmente en el momento del diagnóstico del CCR, hemos llevado a cabo este estudio en el que hemos comprobado la eficacia del análisis IHQ de las proteínas reparadoras del ADN en las biopsias endoscópicas del cáncer colorrectal, con unos resultados obtenidos equiparables a los de la pieza quirúrgica correspondiente. También evaluamos si en el grupo de pacientes que recibieron tratamiento neoadyuvante hubo modificaciones en el status MMR y, a diferencia de lo publicado en la literatura, no encontramos cambios en ningún individuo.

En la serie global, es decir todos los sujetos intervenidos de CCR en nuestro centro con la IHQ de las proteínas reparadoras del ADN realizada en la pieza quirúrgica, la frecuencia de tumores colorrectales con inestabilidad de microsatélites fue del 11.35%. La concordancia diagnóstica entre la IHQ-MMR y la IMS fue muy similar.

De modo adicional, identificamos las características clínico-patológicas y moleculares de los CCR con IMS; nuestros resultados indican que son diferentes a los tumores que surgen por otras vías de carcinomatosis.

Con el presente trabajo queremos contribuir a la detección temprana de tumores colorrectales inestables para mejorar el manejo terapéutico y aumentar la supervivencia en estos pacientes o en aquellos con una predisposición genética a desarrollarlo. Tras los resultados obtenidos hemos elaborado un algoritmo diagnóstico del SL en el que la determinación de la expresión IHQ-MMR en las biopsias endoscópicas sea el primer escalón en el diagnóstico.

Estudio inmunohistoquímico comparativo entre la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica

El objetivo principal de nuestro trabajo era comparar la IHQ-MMR de las muestras endoscópicas y la pieza quirúrgica respectiva de 154 pacientes sometidos a cirugía de cáncer colorrectal, comprobando que la concordancia entre ambas fue del 99,3%. Estos resultados están en consonancia con los publicados previamente en la literatura e indican que las biopsias endoscópicas son una fuente de tejido adecuada para el análisis inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras del ADN.

Nuestro hospital es un centro oncológico de referencia al que se remiten muchos pacientes ya diagnosticados de CCR para realizar el tratamiento. La población de nuestro estudio procedía de una base de datos de cirugía por lo que disponíamos de la pieza quirúrgica de todos ellos. Sin embargo, en muchos de los casos la colonoscopia diagnóstica se había llevado a cabo en otros centros, por tanto, no teníamos acceso a la biopsia endoscópica. Así, de los 361 pacientes con la inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN realizada en el espécimen quirúrgico, contábamos con la biopsia endoscópica correspondiente, y además había material suficiente para el diagnóstico, en 154 de ellos. Fue en este grupo en el que se pudo efectuar el estudio. Los casos con una IHQ no concluyente también se excluyeron del análisis.

Al igual que en publicaciones previas, en nuestro estudio, el análisis inmunohistoquímico incluía el panel de las 4 proteínas MMR (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) en el tejido tumoral. Al examinarlas por separado hallamos una concordancia entre biopsia-pieza del 98,63% en el caso MLH1, es decir, que solo hubo una discrepancia en los resultados en dos individuos. De manera similar, en la proteína PMS2, hubo una coincidencia biopsia-pieza en todos los casos, salvo en los dos mismos pacientes. En uno de ellos hubo una expresión conservada en la biopsia endoscópica mientras había pérdida en la pieza respectiva y en el otro a la inversa, la expresión estaba conservada en la pieza y había pérdida en la biopsia. Atribuimos esta discordancia a la heterogeneidad intratumoral presente en la misma masa tumoral. Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad de la biopsia endoscópica para la detección de pérdida de expresión de MLH1 de 93.33% y 99.24% respectivamente. Un inconveniente de nuestro estudio es que los datos de

sensibilidad y especificidad toman como “patrón oro” la pieza quirúrgica y no la mutación germinal de los genes MMR, no analizados en la mayoría de los casos, debido a que la población de estudio procedía del cribado poblacional del SL y no de individuos con alta sospecha clínica. Con respecto a las proteínas MSH2 y MSH6 no hubo discrepancia en los resultados. Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad de la biopsia endoscópica para la detección de pérdida de expresión de MSH2 del 100% en ambas. Otro hallazgo a destacar en nuestra serie fue la coincidencia del 100% en la ausencia de expresión nuclear de ambos heterodímeros: MLH1 con PMS2 y MSH2 con MSH6.

Los casos con una IHQ no concluyente se excluyeron del estudio comparativo. En nuestro grupo hubo mayor porcentaje de IHQ-MMR no valorables en la biopsia endoscópica que en la pieza quirúrgica. Para la proteína MLH1, 6 casos no valorables en la biopsia frente a 2 en la pieza; para la proteína PMS2, 6 pacientes en la biopsia frente a 3 en la pieza; para la proteína MSH2, 6 pacientes en la biopsia frente a 2 en la pieza; para la proteína MSH6, 6 pacientes en la biopsia frente a ninguno en la pieza. Una explicación a estos hallazgos podría deberse a que la técnica IHQ ya estaba realizada en el espécimen quirúrgico mientras que en la biopsia endoscópica se hizo con posterioridad con el material que había disponible. De este modo, al inicio del estudio, ya estaban excluidos todos aquellos individuos con las tinciones no válidas en las 4 proteínas MMR en la pieza quirúrgica y sólo se incluyeron los que tenían al menos una proteína valorable. Todos los casos de tinciones no válidas en la pieza obedecían a un fallo en el control interno (falta de tinción en el tejido sano adyacente). Sin embargo, en las biopsias el motivo principal de la IHQ no valorable fue la ausencia de tumor en el material disponible. Hay dos posibles justificaciones para estos resultados: que las muestras fueran escasas o que se hubieran “agotado” porque se hubieran utilizado para estudios moleculares.

Hasta la fecha, existen muy pocos trabajos (34–38), y con menor número de casos que el nuestro, que evalúan la fiabilidad de la IHQ-MMR en el tejido tumoral de las biopsias endoscópicas, pero todos ellos demuestran una excelente correlación de la IHQ con el espécimen quirúrgico. En la tabla 27 vemos la comparación de nuestro estudio con otros de similares características publicados en la literatura. O’Brien et al. (34) compararon la expresión de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 en el tejido tumoral de las biopsias endoscópicas y de la pieza quirúrgica correspondiente en 53 pacientes con diagnóstico de

CCR, hallando una pérdida de expresión de alguna de las proteínas en 10 pacientes (18.87%) y un grado de concordancia biopsia-pieza del 100%. Se trataba de un estudio retrospectivo en el que el análisis inmunohistoquímico tanto en la biopsia como en la pieza ya estaba realizado en el momento de inclusión de los pacientes, motivo por el cual no hubo casos no valorables. Al igual que en nuestro trabajo, la interpretación de los resultados de la tinción fue cualitativa, así, la existencia de tinción nuclear se consideró como presencia de expresión, y la negatividad de la misma como ausencia de expresión. Kumarashinge et al. (35) estudiaron la IHQ-MMR de las 4 proteínas en la biopsia y la pieza tumoral correspondiente de 112 pacientes intervenidos de CCR. La IHQ estaba disponible previamente en el espécimen quirúrgico de 21 pacientes, de modo que, tuvieron que llevarla a cabo en la pieza de los 91 pacientes restantes y en las 112 biopsias respectivas. Encontraron 10 tinciones no concluyentes (IHQ no interpretable debido a un patrón de tinción inusual o por ausencia de positividad del control interno) en el espécimen quirúrgico de 9 pacientes, mientras que todas las tinciones de las biopsias endoscópicas fueron valorables. En los casos en los que las tinciones de la pieza fueron adecuadas, el grado de concordancia con la biopsia fue del 100 %. De forma similar, Warriar et al. (36) en una cohorte de 33 pacientes con síndrome de Lynch (SL) y un grupo control emparejado por edad, que cumplía criterios de Bethesda, mostraron una coincidencia del 100%. Es interesante destacar que en 2 casos de dicho estudio hubo discrepancia entre la IHQ y la mutación germinal MMR, pero ambos presentaban una expresión proteica conservada en la biopsia endoscópica y en la pieza quirúrgica. Estos hallazgos indican una disminución de la sensibilidad para la detección del SL mediante la IHQ (94.9%). Shia et al. (37) realizaron la IHQ-MMR en 70 pacientes con cánceres gastrointestinales (67 CCR) tanto en la biopsia endoscópica como en la pieza quirúrgica, observando una discordancia en el 4% de los casos para MLH1 y en el 3% para MSH6. En los individuos con expresión conservada en la biopsia y pérdida en la pieza se asoció al volumen pequeño de las biopsias. En los casos con pérdida de expresión en la biopsia y conservada en la pieza se atribuyó a posibles errores en la toma de las muestras debido a la heterogeneidad intratumoral y, en un paciente, posiblemente relacionado con la neoadyuvancia. Vilkin et al (38) evitaron este problema incluyendo sólo 96 pacientes con cáncer de colon, y demostrando una concordancia del 93.2 %. En el resto de los casos (6.8%) las tinciones de las muestras endoscópicas fueron fuertemente positivas mientras que las de la pieza quirúrgica mostró una tinción débil focal.

Tabla 27. Comparación de nuestro estudio con otros similares publicados en la literatura.

	N	Secuencia IHQ	Concordancia biopsia-pieza	Estudio IHQ	dMMR	Nºpatólogos
Nuestro estudio	145	Pieza Biopsia 	98% MSH1/PMS2 100% MSH2/MSH6	Cualitativo (4 proteínas)	11.35%	2 patólogos
O'Brien 2018	53	Pieza Biopsia 	100%	Cualitativo (4 proteínas)	-	2 patólogos
Vilkin 2015	96	Pieza Biopsia 	93.2%	Cuantitativo (4 proteínas)	20.8%	2 patólogos
Warrier 2011	66	Pieza Biopsia 	100%	Cualitativo (4 proteínas)	-	1 patólogo
Shia 2011	70	Pieza Biopsia 	94% MLH1 96% MSH6 100% PMS2/MSH2	Cuantitativo (4 proteínas)	41.4%	1 patólogo
Kumarashinge 2010	112	Pieza Biopsia 	100%	Cuantitativo (4 proteínas)	13%	1 patólogo

 IHQ disponible previamente en la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica o realizada posteriormente en ambas
 IHQ disponible en la pieza quirúrgica y realizada posteriormente en la biopsia endoscópica

Uno de los problemas que plantea la interpretación de las tinciones inmunohistoquímicas es la heterogeneidad intratumoral que se define como la aparición de subclones tumorales con diferentes genotipos en la misma masa tumoral, y se estima que aparece en torno al 5% de los cánceres colorrectales (20,153,154). Este inconveniente es teóricamente mayor en las biopsias endoscópicas porque representan solo una pequeña parte del tumor y el status MMR está supeditado al lugar de donde se obtiene el muestreo, de manera que podría haber resultados falsos positivos y falsos negativos si éste es inadecuado. Otro asunto a tener en cuenta es el pequeño volumen de las biopsias, que puede limitar la realización de la IHQ si no hay suficiente material tumoral disponible. A día de hoy, no existen guías clínicas en las que se indique el número óptimo de biopsias que se deben tomar para diagnosticar un CCR y tampoco existen recomendaciones en cuanto al tejido necesario para llevar a cabo un estudio molecular adecuado (79). Una manera de evitar esta cuestión es obtener el mayor número de muestras posibles ante la presencia de una tumoración colorrectal; en nuestro centro obtenemos un mínimo de 10 biopsias endoscópicas y de diferentes áreas, intentando seleccionar las zonas con aspecto infiltrante.

La metodología utilizada para el análisis IHQ también puede suponer otra dificultad. Algunos de los estudios similares al nuestro emplearon un método cuantitativo para establecer el grado de pérdida de expresión de las proteínas MMR. Nosotros, al igual que O'Brien et al. y Warrier et al., utilizamos únicamente la presencia o la ausencia de tinción lo que implicaba menor subjetividad en la interpretación de los resultados y mayor concordancia entre la IHQ-MMR de la biopsia endoscópica y la pieza quirúrgica. La calidad de la tinción IHQ está determinada por varios factores como la preservación del antígeno, que depende de una adecuada fijación del tejido. Una de las ventajas que ofrecen las muestras de las biopsias endoscópicas es que tienen una mayor relación superficie/volumen por lo que se fijan fácil y rápidamente, produciendo así una tinción de mayor calidad (151). Aunque no existen guías clínicas para la manipulación y fijación de especímenes, la existencia de protocolos estandarizados en cada institución reduce el riesgo de variabilidad en las tinciones IHQ (79). En nuestro laboratorio de Anatomía patológica las piezas quirúrgicas de CCR se fijan con formol durante 24h antes procesarlas.

En nuestra opinión la interpretación de los resultados por dos patólogos no ofrece más ventajas que la valoración realizada por un solo patólogo con experiencia.

Algunas de las limitaciones de nuestro trabajo es que era un estudio retrospectivo, lo que influyó en la selección de pacientes y en la recopilación de los datos. También se trataba de un estudio unicéntrico, sin embargo, hay que remarcar que el número de casos incluido es superior a los publicados hasta ahora en la literatura.

Los resultados que hemos obtenido en el presente trabajo indican que los pacientes portadores de mutaciones en los genes reparadores del ADN incluidos en el estudio se hubieran beneficiado de la determinación de las proteínas reparadoras del ADN en las biopsias, previas a la cirugía. Así pues, en 4 individuos finalmente se detectó una mutación germinal, 2 en el gen MLH1 y 2 en el gen MSH2. Hubo 5 pacientes con pérdida de expresión de MMR, IMS alta, sin hipermetilación del promotor del gen MLH1 y sin mutación del BRAF, que no acudieron a la Unidad de consejo genético (a pesar de haber contactado con

ellos), y en los que quizá podría existir también una mutación germinal. En todos estos casos el síndrome de Lynch se detectó tras la cirugía. Si se hubiera identificado previamente, en las biopsias endoscópicas del cáncer colorrectal, el manejo terapéutico de estos pacientes hubiera sido distinto, puesto que se les habría tratado con una colectomía subtotal y no con una resección segmentaria del colon (66,139). De los 4 pacientes con mutación en los genes reparadores del ADN, 2 eran mujeres que ya habían cumplido su deseo gestacional y por ello se les debía haber ofrecido una histerectomía con anexectomía bilateral profiláctica aprovechando la cirugía colorrectal (42,142,143). A pesar de lo dicho, al ser la incidencia en la población general del SL tan baja, no podemos sacar conclusiones en nuestro trabajo con respecto al cambio de actitud terapéutica puesto que necesitaríamos un tamaño muestral mucho mayor.

Con las experiencias expuestas, parece evidente que el análisis inmunohistoquímico para detectar individuos con dMMR debería comenzar en las biopsias endoscópicas con la finalidad de modificar el manejo terapéutico de estos pacientes; no obstante, para ello, es necesario aunar esfuerzos y mejorar la comunicación entre las diferentes especialidades implicadas en el diagnóstico y tratamiento del CCR (digestólogos, patólogos, cirujanos, oncólogos y biólogos moleculares). Es importante establecer circuitos ágiles para que, una vez detectada la falta de expresión de las proteínas MMR en las biopsias de CCR, exista una adecuada coordinación entre los diferentes departamentos para investigar la presencia de una mutación germinal y, de ese modo, que el paciente se pueda tratar de forma óptima. A día de hoy, en la Comunidad valenciana, las pruebas genéticas de cáncer hereditario están sectorizadas por síndromes, repartidas en diferentes laboratorios de referencia. Muchos centros están solicitando el poder realizar el estudio en sus propios laboratorios de biología molecular ya que utilizan las mismas técnicas de secuenciación masiva que en los de referencia. Si fuera así, se podría facilitar el estudio de la mutación, pero a pesar de ello, estos objetivos se podrían cumplir en centros con comités multidisciplinarios, con personal motivado y con los medios instrumentales necesarios. Sabemos que en hospitales de primer y segundo nivel existen grandes obstáculos que impiden alcanzar estas metas; no obstante, podría aplicarse en pacientes seleccionados, en los que se pudiera demorar cierto tiempo la cirugía.

Inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN tras la neoadyuvancia

Otro de nuestros objetivos fue determinar si el tratamiento neoadyuvante del cáncer colorrectal podía afectar a la tinción IHQ y por tanto modificar el estatus MMR.

Hay estudios que ponen de manifiesto que la neoadyuvancia se asocia a una disminución en la intensidad de la tinción y a un aumento de tinciones focales o no concluyentes (38). Vilkin et al. (151) compararon la tinción IHQ (MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2) en 32 pacientes con cáncer de recto antes y después del tratamiento neoadyuvante, frente a un grupo control de 39 pacientes con cáncer de sigma que fueron sometidos a cirugía directamente. Se objetivó una mayor discordancia entre la IHQ de las biopsias endoscópicas y la pieza quirúrgica de aquellos pacientes que habían recibido neoadyuvancia (18,5%) frente a los que no (7,7%). Shia et al. hallaron una tinción leve en la pieza quirúrgica en 1 de los 7 pacientes que habían sido tratados antes de la cirugía y lo atribuyeron posiblemente a la hipoxia y al estrés oxidativo que producen los tratamientos (37). Por otra parte, se ha descrito la pérdida de expresión de MSH6 independientemente de la expresión de MSH2 en CCR con estabilidad de microsatélites (MSS) después de la terapia neoadyuvante (130).

En nuestro trabajo, de los 154 pacientes de los que disponíamos de la inmunohistoquímica en la pieza quirúrgica y la biopsia endoscópica, 38 de ellos (24.68%) habían recibido tratamiento previo a la cirugía. A diferencia de lo publicado en la literatura, en nuestra serie no hubo modificación en el status MMR en la mayoría de los pacientes. La expresión de las proteínas reparadoras del ADN estaba conservada en la biopsia endoscópica en los 38 sujetos y tras la neoadyuvancia el estatus MMR se modificó en un solo paciente para las proteínas MLH1, PMS2 y MSH2. En este caso la tinción IHQ en la pieza quirúrgica resultó no valorable.

Otro asunto relevante en pacientes con CCR que reciben neoadyuvancia es la ausencia de tumor en el espécimen quirúrgico, que ocurre en algunos casos como respuesta al

tratamiento y que apoya, por tanto, la determinación de la IHQ-MMR en las biopsias endoscópicas.

Uno de los criterios de inclusión en nuestro estudio era la presencia de IHQ-MMR en la pieza tumoral para poder efectuar el análisis comparativo con la biopsia endoscópica. Por lógica, no se pudo evaluar el porcentaje de respuestas patológicas completas en este grupo de pacientes con neoadyuvancia.

En nuestra serie global de 732 pacientes intervenidos de CCR a lo largo del periodo estudiado recibieron tratamiento neoadyuvante con quimioterapia, radioterapia o ambas un 14 % de ellos (102 pacientes). En 6 pacientes (5,88%) no se encontró tumor en la pieza quirúrgica; todos ellos pertenecían al grupo de cáncer de recto. Es importante mencionar que la biopsia endoscópica preoperatoria era la única muestra en la que se podía realizar la IHQ-MMR en estos casos. La introducción de la quimioterapia con o sin radioterapia previa a la cirugía como tratamiento estándar de los cánceres de recto avanzados, es la responsable de respuestas patológicas completas (34–38). Después de los resultados del ensayo FOxTROT, la neoadyuvancia en el cáncer de colon se ha establecido en pacientes con cáncer de colon T3 con más de 5mm de invasión de la muscular o T4 en el estudio de TAC (106). En nuestro centro, desde hace unos años, se realiza el estudio inmunohistoquímico y molecular previo al tratamiento en los tumores de recto, pero no en los tumores de colon.

Propuesta de algoritmo diagnóstico MMR

Con los resultados obtenidos hemos elaborado una nueva propuesta de algoritmo diagnóstico para la detección de los tumores con inestabilidad de microsatélites en todos los pacientes con nuevo diagnóstico de CCR (fig. 20). Sugerimos llevar a cabo el estudio IHQ-MMR en el tejido tumoral de las biopsias endoscópicas en el momento de realizar el diagnóstico histológico del cáncer. Si la expresión de las proteínas reparadoras del ADN está conservada se puede considerar un CCR esporádico y solo cuando exista una alta sospecha de SL, por criterios clínicos o anatomopatológicos, se haría la IMS en la biopsia endoscópica o la IHQ en la pieza quirúrgica. Cuando haya una pérdida de expresión de MLH1/PMS2 se recomendará un análisis mutacional de BRAF y/o de la metilación del

promotor de MLH1 previo al estudio del gen correspondiente. Si la pérdida de expresión en las biopsias afecta a las proteínas MSH2/MSH6 se hará directamente el análisis del gen. En los casos con la tinción IHQ no valorable proponemos efectuar la IMS en la biopsia endoscópica o la IHQ en la pieza quirúrgica.

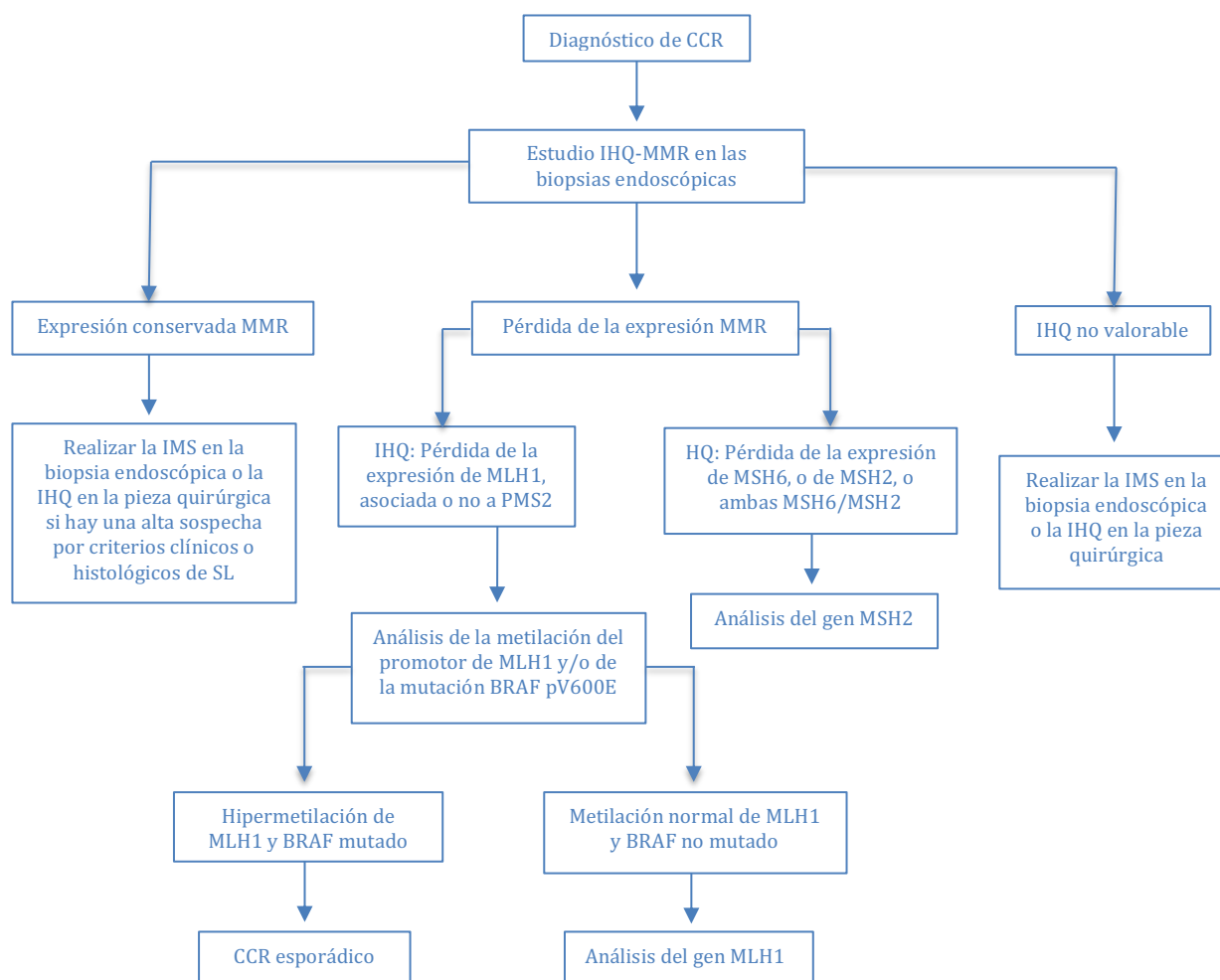


Figura 20. Algoritmo diagnóstico para la detección de CCR con inestabilidad de microsatélites

Cribado universal del síndrome de Lynch

Otro de nuestros objetivos fue investigar la frecuencia de la falta de expresión de las proteínas reparadoras del ADN (dMMR) en la población de estudio mediante técnicas de inmunohistoquímica.

En nuestra serie, hubo una expresión inmunohistoquímica nuclear patológica (pérdida de expresión) en 41 pacientes (11.35%). Los estudios publicados en la literatura muestran una frecuencia variable de tumores con pérdida de expresión de las proteínas reparadoras, del 5 al 25%. Los resultados son dispares porque dependen de la edad de corte, el área geográfica y los métodos utilizados para el cribado. Pearlman R et al. en Ohio encontraron una prevalencia de dMMR del 15.9% (n=3310) (155); Brennan B et al. del 16.9% (n=1612) en Australia (156); Li J et al. del 13.7% (n=2423) en China (157); Korphaisarn K et al. del 14.9% (n=208) en Tailandia (158); López-Correa E et al. del 21,3% (n=202) en Brasil (159); Marabelli M et al. del 10.6% (n=482) en Italia (160). En cuanto a las proteínas alteradas, MLH1 y PMS2 fueron las más frecuentes en nuestro estudio, presentes en el 90% de los casos con dMMR, al igual que en los trabajos mencionados; la pérdida de expresión de MSH2 y MSH6 se encontró en el 10% de los pacientes.

En nuestro centro, el Instituto valenciano de oncología, el cribado del síndrome de Lynch en el espécimen quirúrgico de individuos con cáncer colorrectal comenzó a realizarse en el año 2014. Con anterioridad a esa fecha los casos estudiados eran anecdóticos (en el contexto de ensayos clínicos). Nuestra serie incluía 732 pacientes operados de CCR en el periodo comprendido entre marzo del 2011 y enero del 2020 pero la inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN solo estaba disponible en 361 de los casos recolectados. La razón, como hemos mencionado, es el bajo porcentaje de investigación de dichas proteínas en la primera etapa del estudio. Así pues, del 2011 al 2013 se estudió la IHQ-MMR en el 7-11% de los pacientes, en el 2014 la tasa de determinación aumentó al 40% y en el 2016 al 80%. A partir del 2017, conociendo las implicaciones predictivas, pronósticas y coste-efectivas, comenzó a efectuarse el análisis en el 100% de los casos.

Hampel et al. fueron los primeros en proponer el análisis generalizado de las proteínas MMR en los nuevos casos de cáncer colorrectal en el año 2008 (161) pero no fue hasta el

2014 cuando se incorporó a las guías NCCN (25,162). Actualmente numerosas sociedades científicas recomiendan el cribado universal del SL, mediante el estudio IHQ y/o de la IMS en todos los pacientes con diagnóstico de novo de CCR. A pesar de ello, la adopción de esta medida en la práctica clínica habitual está siendo lenta con tasas de cribado bajas, del 21 al 28% según las series (148–150). Resultados extraídos de la base de datos nacional de cáncer de EEUU, muestran que entre 2010 y 2012 la IHQ-MMR se llevó a cabo solo en el 28,2% (43.143/152.993) y el 43,1% (7.422/17.218) de los casos nuevos de CCR menores de 70 y 50 años respectivamente (148). De manera similar, V. Kozak et al. evaluaron la detección del SL en los pacientes diagnosticados de CCR en un hospital público oncológico de Brasil a lo largo de 6 años (2012-2018), y vieron que de 1.234 casos, solo 257 (20.8%) tenía realizada la IHQ y/o la IMS (150). En la misma medida, un estudio estimó que el 30 % de los centros hospitalarios de Reino Unido no realizó cribado rutinario de SL en pacientes con CCR menores de 50 años en el año 2016 (163). Los motivos que dificultan la estrategia de cribado universal del SL son, entre otros, la ausencia de circuitos bien establecidos, la carencia de recursos económicos y personales, o la falta de implicación de algunos profesionales (32,33). Hay que resaltar que, a diferencia de los estudios referidos, nuestros datos muestran un análisis de la deficiencia en MMR en el 44.6% de los casos, pero si tenemos en cuenta el último periodo (a partir del 2017) la determinación fue a todos los pacientes con diagnóstico de CCR. Muchos hospitales españoles de tercer nivel, siguiendo las recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el carcinoma colorrectal de la Sociedad Española de Oncología Médica y de la Sociedad Española de Anatomía Patológica, realizan de forma universal el análisis de la deficiencia en MMR.

Relación de la inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN con distintas variables clínico-patológicas

Los cánceres colorrectales con inestabilidad de microsátélites presentan unas características clínico-patológicas que difieren de los tumores que aparecen como consecuencia de otras vías de carcinogénesis (10–12). Así lo indican los resultados que hemos obtenido.

En nuestro estudio, como hemos mencionado anteriormente, de los 361 pacientes con cáncer colorrectal el 88.64% (320 pacientes) presentó una expresión tisular conservada de las proteínas reparadoras del ADN y el 11.35% de los casos (41 pacientes) tuvo una expresión inmunohistoquímica nuclear patológica (pérdida). Cuando analizamos la relación entre el estatus MMR y diferentes variables clínico-patológicas vemos resultados bastante similares a los publicados. Observamos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con tumores dMMR y los pacientes con tumores estables en los siguientes parámetros: la edad del diagnóstico, la localización tumoral, el tipo anatomopatológico, el grado de diferenciación celular y el estadio tumoral. De este modo, los tumores con inestabilidad de microsatélites aparecían preferentemente en pacientes más jóvenes, localizados con mayor frecuencia en el colon derecho y con tipos histológicos de células en anillo de sello, mucinosos y con grado 3 de diferenciación celular (pobrementemente diferenciados). En nuestra serie también hallamos una relación con el estadio tumoral avanzado (estadios IV). Con respecto al sexo, aunque el porcentaje de mujeres con tumores inestables era mayor (15% vs 8%), al realizar el análisis multivariante no alcanzaban una significación estadística.

Hay numerosos trabajos que evalúan la asociación entre los tumores dMMR y factores clínico-patológicos. Bai et al. hallaron una pérdida de expresión de las proteínas reparadoras del ADN en 131 de 738 pacientes con CCR y, la edad de inicio más temprana, la localización en el colon derecho y el grado 3 de diferenciación celular fueron los factores asociados con este tipo de tumores (164). Li et al. estudiaron a 1394 pacientes con CCR, de los cuales un 7.6 % tenían dMMR. La delección de las proteínas MMR se correlacionó significativamente con la edad de los pacientes, la ubicación del tumor, el tipo histológico, el grado de diferenciación, el estado de los ganglios linfáticos y el estadio TNM ($P < 0,05$), pero no con el sexo ($P > 0,05$) (165). Chikatani et al. revisaron las historias clínicas de 1.147 pacientes sometidos a resección de CCR en los que se había realizado cribado universal de SL mediante inmunohistoquímica para proteínas MMR. La prevalencia de CCR dMMR fue del 5,2%. La edad (≥ 75 años), la ubicación del tumor (colon del lado derecho), las características histológicas principales (mala diferenciación), el tamaño máximo del tumor (≥ 65 mm) y el estadio (I/II) fueron variables independientes significativas relacionadas con la dMMR (166). Maraqa B et al. encontraron que los tumores dMMR

tendían a presentarse en una etapa más temprana, tendían a tener menos metástasis ganglionares que los pMMR y que tenían una tasa más baja de enfermedad en estadio III en comparación con los estadios I y II (167).

En nuestro estudio, al igual que en todos los trabajos citados, hay 3 características que coexisten en los tumores con inestabilidad de microsatélites: edad más temprana, localización en el colon derecho y tumores mal diferenciados. Sin embargo, también observamos relación significativa con los estadios tumorales avanzados, a diferencia de lo revisado en la literatura, que la encontraron en estadios I y II.

Análisis comparativo entre la inmunohistoquímica y la inestabilidad de microsatélites

Como hemos expuesto previamente, la detección del síndrome de Lynch comienza con la realización de dos pruebas que se han mostrado igualmente válidas como test iniciales para identificar tumores con alteración en el sistema de reparación de errores del ADN: el estudio de la inestabilidad de microsatélites (MSI) basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la inmunohistoquímica de las proteínas MMR (IHC)(134).

En nuestra serie, de los 361 pacientes con IHQ realizada en la pieza quirúrgica, un total de 332 pacientes tenían hecho el estudio molecular de la inestabilidad de microsatélites mediante PCR. En este grupo de 332 individuos pudimos hacer el estudio comparativo entre ambas técnicas. Aunque se halló una IMS y dMMR en el 11,45 % de los pacientes con CCR, la concordancia entre ellas fue del 98,8% ya que no hubo coincidencia en 4 casos; en 2 de ellos existía una falta de expresión MMR con una IMS estable y en otros 2 una IHQ conservada con una IMS alta. En estos 4 casos los resultados de la IHQ fueron similares en la biopsia y en la pieza quirúrgica y discrepantes con la IMS.

En la revisión bibliográfica efectuada, la mayoría de los trabajos registran resultados comparables a los nuestros. Loughrey M et al., objetivaron que de 593 casos de los que disponían de resultados MSI y MMR IHC, 136 (22,9 %) tuvieron un MSI-alto (MSI-H) y 135 (22,8 %) mostraron dMMR IHC. La concordancia fue alta, con el 97,1 % de los casos de

MSI-H que mostraban dMMR IHC y el 97,8 % de los casos con dMMR IHC que mostraban un estado de MSI-H (168). Hissong E et al. encuestaron a 96 instituciones académicas y no académicas para evaluar las prácticas de detección del síndrome de Lynch y evaluaron las tasas de discordancia entre la inmunohistoquímica y la PCR entre 809 cánceres colorrectales y solo encontraron 3 casos (0,4 %) con resultados discordantes. El 86% realizó el cribado universal y solo el 20% empleó PCR. En general, mostraron una discordancia extremadamente baja entre los métodos que evalúan el estado de reparación de los errores del ADN y sugerían que la inmunohistoquímica es el patrón de detección preferido (169). Chen M et al. también compararon la IHC con la PCR en la detección del estado de microsatélites en el carcinoma colorrectal y de un total de 569 muestras la tasa de coincidencia de los dos métodos fue del 91,92% (170). En el trabajo de Li et al. que incluía 1394 pacientes intervenidos de CCR la concordancia total de la inmunohistoquímica y la PCR fue del 98,7% (165).

Podemos resumir diciendo que la IHQ de las proteínas MMR y la IMS determinada por PCR tienen una capacidad similar para detección de los tumores inestables en el SL y que se utilizará una u otra dependiendo de la disponibilidad y de la experiencia de los centros.

7. CONCLUSIONES

De la revisión de los resultados obtenidos en nuestro estudio se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Las biopsias endoscópicas de los tumores colorrectales son una fuente de tejido adecuada para el análisis inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras del ADN.
2. La correlación entre la expresión inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN de las biopsias endoscópicas y la pieza quirúrgica respectiva de pacientes con cáncer colorrectal es excelente.
3. Los pocos casos en los que existe discrepancia entre el análisis inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras del ADN de las biopsias endoscópicas y el espécimen quirúrgico son atribuibles a la heterogeneidad intratumoral presente en un mismo tumor.
4. Las tinciones inmunohistoquímicas no valorables son más frecuentes en las biopsias endoscópicas y la causa principal es la ausencia de tumor debido a escasez de las muestras.
5. Los resultados que hemos obtenido indican que los pacientes de nuestro estudio que han sido diagnosticados de síndrome de Lynch (portadores de mutaciones en los genes reparadores del ADN) tras la cirugía se hubieran beneficiado de la determinación de las proteínas reparadoras del ADN en las biopsias endoscópicas en el momento del diagnóstico del CCR, ya que su manejo terapéutico hubiera sido distinto.
6. Proponemos un algoritmo diagnóstico para la detección temprana de tumores colorrectales inestables que comience por la determinación de la expresión IHQ-MMR en las biopsias endoscópicas.

7. Es importante establecer circuitos ágiles para que una vez detectada la falta de expresión de las proteínas MMR en las biopsias de CCR, exista una adecuada coordinación entre los diferentes departamentos para investigar la presencia de una mutación germinal y que se pueda tratar al paciente de forma óptima. Para ello, es necesario aunar esfuerzos y mejorar la comunicación entre las diferentes especialidades implicadas en el diagnóstico y tratamiento del CCR.
8. La prevalencia de la falta de expresión inmunohistoquímica de las proteínas reparadoras del ADN en nuestra población de estudio es del 11,35%.
9. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento neoadyuvante de los CCR con quimioterapia y/o radioterapia no modifica el estatus MMR.
10. La IHQ de las proteínas MMR y la IMS determinada por PCR tienen una capacidad similar para detección de los tumores inestables en el SL y que utilizará una u otra dependiendo de la disponibilidad y de la experiencia de los centros.
11. Las características clínico-patológicas y moleculares de los CCR con IMS son diferentes a los tumores que surgen por otras vías de carcinomatosis. Estas neoplasias aparecen a una edad más temprana, predominan en el colon derecho y son con mayor frecuencia tumores mal diferenciados y mucinosos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017 Jul 1;19(7):799–825.
2. Atkin WS, Valori R, Kuipers EJ, Hoff G, Senore C, Segnan N, et al. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis First Edition Colonoscopic surveillance following adenoma removal. *Endoscopy* [Internet]. 2012 Sep [cited 2020 Feb 1];44(SUPPL3):SE151-63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23012119>
3. Rossi S, Baili P, Capocaccia R, Caldora M, Carrani E, Minicozzi P, et al. The EUROCare-5 study on cancer survival in Europe 1999-2007: Database, quality checks and statistical analysis methods. *Eur J Cancer* [Internet]. 2015 Oct [cited 2020 Feb 1];51(15):2104–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26421815>
4. Geneve N, Kairys D, Bean B, Provost T, Mathew R, Taheri N. Colorectal Cancer Screening. Vol. 46, Primary Care - Clinics in Office Practice. W.B. Saunders; 2019. p. 135–48.
5. Issa IA, NouredDine M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. Vol. 23, World Journal of Gastroenterology. Baishideng Publishing Group Co., Limited; 2017. p. 5086–96.
6. Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential [Internet]. Vol. 17, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. Nat Rev Gastroenterol Hepatol; 2020 [cited 2022 Feb 12]. p. 111–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31900466/>
7. Singh MP, Rai S, Suyal S, Singh SK, Singh NK, Agarwal A, et al. Genetic and epigenetic markers in colorectal cancer screening: recent advances [Internet]. Vol. 17, Expert Review of Molecular Diagnostics. Expert Rev Mol Diagn; 2017 [cited 2022 Feb 12]. p. 665–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28562109/>
8. Del Carmen S, Sayagués JM, Abad M. Genetic alterations in colorectal cancer: Implications for the prognosis and treatment of the disease [Internet]. Vol. 12, Revista Espanola de Enfermedades Digestivas. ARAN Ediciones S.A.; 2020 [cited 2021 May 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32755147/>
9. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 May 11];149(5):1177–1190.e3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26216840/>
10. Jover, MD R, Alenda, MD C, Poveda, MD M, Peiró, MD G, Aranda, MD FI, Pérez-Mateo, MD M. Defective Mismatch-Repair Colorectal Cancer Clinicopathologic Characteristics and Usefulness of Immunohistochemical Analysis for Diagnosis. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2021 May 13];122(3):389–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15362369/>
11. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6).
12. Nakayama Y, Iijima T, Inokuchi T, Kojika E, Takao M, Takao A, et al. Clinicopathological features of sporadic MSI colorectal cancer and Lynch syndrome: a single-center retrospective cohort study. *Int J Clin Oncol* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2022 Feb 12];26(10):1881–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34148153/>
13. Wielandt AM, Villarroel C, Hurtado C, Simian D, Zamorano D, Martínez M, et al. Caracterización de pacientes con cancer colorrectal esporádico basado en la nueva

- subclasificación molecular de consenso. *Rev Med Chil*. 2017 Apr 1;145(4):419–30.
14. Menter DG, Davis JS, Broom BM, Overman MJ, Morris J, Kopetz S. Back to the Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtype Future. Vol. 21, *Current Gastroenterology Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2019.
 15. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. Vol. 469, *Virchows Archiv*. Springer Verlag; 2016. p. 125–34.
 16. Kastrinos F, Stoffel EM. History, genetics, and strategies for cancer prevention in lynch syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(5):715–27.
 17. Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* [Internet]. 2009 Jan [cited 2020 Feb 1];41(1):112–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098912>
 18. Vangala DB, Cauchin E, Balmaña J, Wyrwicz L, van Cutsem E, Güller U, et al. Screening and surveillance in hereditary gastrointestinal cancers: Recommendations from the European Society of Digestive Oncology (ESDO) expert discussion at the 20th European Society for Medical Oncology (ESMO)/World Congress on Gastrointestinal Cancer,. *Eur J Cancer*. 2018 Nov 1;104:91–103.
 19. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MWY, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement of familial risk-colorectal cancer: European Society for medical oncology clinical practice guidelines. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Oct 10 [cited 2020 Feb 15];33(2):209–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452455>
 20. Evrard C, Tachon G, Randrian V, Karayan-Tapon L, Tougeron D. Microsatellite instability: Diagnosis, heterogeneity, discordance, and clinical impact in colorectal cancer. Vol. 11, *Cancers*. MDPI AG; 2019.
 21. Svrcek M, Lascols O, Cohen R, Collura A, Jonchère V, Fléjou JF, et al. MSI/MMR-deficient tumor diagnosis: Which standard for screening and for diagnosis? Diagnostic modalities for the colon and other sites: Differences between tumors [Internet]. Vol. 106, *Bulletin du Cancer*. John Libbey Eurotext; 2019 [cited 2020 Feb 1]. p. 119–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30713006/>
 22. Piñol V, Castells A, Andreu M, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Am Med Assoc* [Internet]. 2005 Apr 27 [cited 2020 Feb 1];293(16):1986–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855432>
 23. Wheeler JMD, Bodmer WF, McC Mortensen NJ. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. Vol. 47, *Gut*. 2000. p. 148–53.
 24. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from the American society for clinical pathology, college of American pathologists, association for molecular pathology, and American society of clinical oncology. *Arch Pathol Lab Med*. 2017 May 1;141(5):625–57.
 25. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Feb 5 [cited 2020 Feb 1];110(2):223–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25645574>

26. Rubenstein JH, Enns R, Heidelbaugh J, Barkun A, Adams MA, Dorn SD, et al. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Gastroenterology*. 2015 Sep 1;149(3):777–82.
27. Balmaña J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D. Familial risk-colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2020 Feb 1];24(SUPPL.6):vi73-80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23813931>
28. Snowsill T, Coelho H, Huxley N, Jones-Hughes T, Briscoe S, Frayling IM, et al. Molecular testing for Lynch syndrome in people with colorectal cancer: Systematic reviews and economic evaluation. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2017 Sep 1;21(51).
29. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: A meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer* [Internet]. 2010 Oct [cited 2020 Feb 2];46(15):2788–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627535>
30. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science (80-)*. 2017 Jul 28;357(6349):409–13.
31. Sinicrope FA, Yang ZJ. Prognostic and predictive impact of DNA mismatch repair in the management of colorectal cancer [Internet]. Vol. 7, *Future Oncology*. 2011 [cited 2020 Feb 2]. p. 467–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21417908>
32. Jain A, Shafer L, Rothenmund H, Kim CA, Samadder J, Gupta S, et al. Suboptimal Adherence in Clinical Practice to Guidelines Recommendation to Screen for Lynch Syndrome. *Dig Dis Sci*. 2019 Dec 1;64(12):3489–501.
33. Noll A, J. Parekh P, Zhou M, Weber TK, Ahnen D, Wu XC, et al. Barriers to Lynch Syndrome Testing and Preoperative Result Availability in Early-onset Colorectal Cancer: A National Physician Survey Study. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018 Sep 1;9(9).
34. O'Brien O, Ryan É, Creavin B, Kelly ME, Mohan HM, Geraghty R, et al. Correlation of immunohistochemical mismatch repair protein status between colorectal carcinoma endoscopic biopsy and resection specimens. *J Clin Pathol* [Internet]. 2018 Jul [cited 2020 Feb 1];71(7):631–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29419411>
35. Kumarasinghe AP, De Boer B, Bateman AC, Kumarasinghe MP. DNA mismatch repair enzyme immunohistochemistry in colorectal cancer: A comparison of biopsy and resection material. *Pathology*. 2010;42(5):414–20.
36. Warrier SK, Trainer AH, Lynch AC, Mitchell C, Hiscock R, Sawyer S, et al. Preoperative diagnosis of lynch syndrome with DNA mismatch repair immunohistochemistry on a diagnostic biopsy. *Dis Colon Rectum*. 2011 Dec;54(12):1480–7.
37. Shia J, Stadler Z, Weiser MR, Rentz M, Gonen M, Tang LH, et al. Immunohistochemical staining for dna mismatch repair proteins in intestinal tract carcinoma: How reliable are biopsy samples? *Am J Surg Pathol*. 2011 Mar;35(3):447–54.
38. Vilkin A, Leibovici-Weissman Y, Halpern M, Morgenstern S, Brazovski E, Gingold-Belfer R, et al. Immunohistochemistry staining for mismatch repair proteins: The endoscopic biopsy material provides useful and coherent results. *Hum Pathol*. 2015 Nov 1;46(11):1705–11.

39. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 Feb 4;71(3):209–49.
40. Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdel-Rahman O, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-Adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 May 9];5(12):1749–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31560378/>
41. Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Mascort-Roca JJ, Amador-Romero FJ, Bellas-Beceiro B, Clofent-Vilaplana J, et al. Clinical practice guideline. Diagnosis and prevention of colorectal cancer. 2018 Update. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 [cited 2021 May 5];41(9):585–96. Available from: www.elsevier.es/gastroenterologia
42. Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer [Internet]. Vol. 31, *Gastroenterology Clinics of North America*. Gastroenterol Clin North Am; 2002 [cited 2021 May 6]. p. 925–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12489270/>
43. Von Karsa L, Patnick J, Segnan N, Atkin W, Halloran S, Lansdorp-Vogelaar I, et al. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: Overview and introduction to the full Supplement publication [Internet]. Vol. 45, *Endoscopy*. Endoscopy; 2013 [cited 2021 May 7]. p. 51–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23212726/>
44. Murphy CC, Lund JL, Sandler RS. Young-Onset Colorectal Cancer: Earlier Diagnoses or Increasing Disease Burden? [Internet]. Vol. 152, *Gastroenterology*. 2017 [cited 2021 May 6]. p. 1809-1812.e3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.030>.
45. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, Marsoni S, Bardelli A, Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals [Internet]. Vol. 13, *Molecular Oncology*. 2019 [cited 2021 May 6]. p. 109–31. Available from: <https://seer.cance>
46. Liu L, Zhuang W, Wang RQ, Mukherjee R, Xiao SM, Chen Z, et al. Is dietary fat associated with the risk of colorectal cancer? A meta-analysis of 13 prospective cohort studies. *Eur J Nutr* [Internet]. 2011 Apr [cited 2021 May 6];50(3):173–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20697723/>
47. Hull M, Lagergren J. Obesity and colorectal cancer [Internet]. Vol. 63, *Gut*. BMJ Publishing Group; 2014 [cited 2021 May 6]. p. 205. Available from: <https://gut.bmj.com/content/63/1/205.1>
48. Vieira AR, Abar L, Chan DSM, Vingeliene S, Polemiti E, Stevens C, et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project [Internet]. Vol. 28, *Annals of Oncology*. Oxford University Press; 2017 [cited 2021 May 6]. p. 1788–802. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28407090/>
49. Carr PR, Walter V, Brenner H, Hoffmeister M. Meat subtypes and their association with colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. Vol. 138, *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc.; 2016. p. 293–302.
50. Aune D, Chan DSM, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies [Internet]. Vol. 343, *BMJ (Online)*. 2011 [cited

- 2021 May 6]. p. 1082. Available from: www.wcrf.org/
51. Leenders M, Siersema PD, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Boutron-Ruault MC, et al. Subtypes of fruit and vegetables, variety in consumption and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2021 May 6];137(11):2705–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26077137/>
 52. Aune D, Lau R, Chan DSM, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dairy products and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies [Internet]. Vol. 23, *Annals of Oncology*. Oxford University Press; 2012 [cited 2021 May 6]. p. 37–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21617020/>
 53. Keum N, Aune D, Greenwood DC, Ju W, Giovannucci EL. Calcium intake and colorectal cancer risk: Dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Int J Cancer* [Internet]. 2014 Oct 15 [cited 2021 May 6];135(8):1940–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24623471/>
 54. Keum NN, Lee DH, Greenwood DC, Zhang X, Giovannucci EL. Calcium intake and colorectal adenoma risk: Dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2021 May 6];136(7):1680–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25156950/>
 55. Heine-Bröring RC, Winkels RM, Renkema JMS, Kragt L, Van Orten-Luiten ACB, Tigchelaar EF, et al. Dietary supplement use and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analyses of prospective cohort studies. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 May 15 [cited 2021 May 7];136(10):2388–401. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25335850/>
 56. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2021 May 7];148(6):1244–1260.e16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25575572/>
 57. Dong Y, Zhou J, Zhu Y, Luo L, He T, Hu H, et al. Abdominal obesity and colorectal cancer risk: Systematic review and meta-analysis of prospective studies [Internet]. Vol. 37, *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd; 2017 [cited 2021 May 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29026008/>
 58. Esposito K, Chiodini P, Colao A, Lenzi A, Giugliano D. Metabolic syndrome and risk of cancer: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* [Internet]. 2012 Nov [cited 2021 May 7];35(11):2402–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23093685/>
 59. Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: A systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 104, *Journal of the National Cancer Institute*. J Natl Cancer Inst; 2012 [cited 2021 May 7]. p. 1548–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22914790/>
 60. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: An overall and dose-Response meta-analysis of published studies [Internet]. Vol. 22, *Annals of Oncology*. Oxford University Press; 2011 [cited 2021 May 7]. p. 1958–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21307158/>
 61. Cheng J, Chen Y, Wang X, Wang J, Yan Z, Gong G, et al. Meta-analysis of prospective cohort studies of cigarette smoking and the incidence of colon and rectal cancers. *Eur J Cancer Prev* [Internet]. 2015 Jan 11 [cited 2021 May 7];24(1):6–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24722538/>

62. Fitzpatrick-Lewis D, Ali MU, Warren R, Kenny M, Sherifali D, Raina P. Screening for Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis [Internet]. Vol. 15, Clinical Colorectal Cancer. Elsevier Inc.; 2016 [cited 2021 May 8]. p. 298–313. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27133893/>
63. Lin JS, Piper MA, Perdue LA, Rutter CM, Webber EM, O'Connor E, et al. Screening for colorectal cancer: Updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force. JAMA - J Am Med Assoc [Internet]. 2016 Jun 21 [cited 2021 May 8];315(23):2576–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27305422/>
64. Quintero E, Castells A, Bujanda L, Cubiella J, Salas D, Lanás Á, et al. Colonoscopy versus Fecal Immunochemical Testing in Colorectal-Cancer Screening. N Engl J Med [Internet]. 2012 Feb 23 [cited 2021 May 8];366(8):697–706. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22356323/>
65. van Lanschot MCJ, Carvalho B, Rausch C, Snaebjornsson P, van Engeland M, Kuipers EJ, et al. Molecular profiling of longitudinally observed small colorectal polyps: A cohort study. EBioMedicine [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 May 10];39:292–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30555044/>
66. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis [Internet]. Vol. 61, Cell. Cell; 1990 [cited 2021 May 10]. p. 759–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2188735/>
67. IJspeert JEG, Medema JP, Dekker E. Colorectal neoplasia pathways: State of the art [Internet]. Vol. 25, Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America. W.B. Saunders; 2015 [cited 2021 May 11]. p. 169–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25839680/>
68. Ahnen DJ. The American College of gastroenterology emily couric lecture the adenoma-carcinoma sequence revisited: Has the era of genetic tailoring finally arrived. Vol. 106, American Journal of Gastroenterology. 2011. p. 190–8.
69. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science (80-) [Internet]. 1993 [cited 2021 May 13];260(5109):816–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8484122/>
70. Peltomäki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer [Internet]. Vol. 21, Journal of Clinical Oncology. J Clin Oncol; 2003 [cited 2021 May 13]. p. 1174–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12637487/>
71. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: History, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications [Internet]. Vol. 76, Clinical Genetics. Clin Genet; 2009 [cited 2021 May 20]. p. 1–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19659756/>
72. Pineda M, González S, Lázaro C, Blanco I, Capellá G. Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening. Vol. 693, Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2010. p. 19–31.
73. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. [Internet]. Vol. 14, International journal of molecular sciences. Int J Mol Sci; 2013 [cited 2021 May 13]. p. 16365–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23965959/>
74. East JE, Atkin WS, Bateman AC, Clark SK, Dolwani S, Ket SN, et al. British Society of Gastroenterology position statement on serrated polyps in the colon and rectum. Vol. 66, Gut. 2017. p. 1181–96.

75. Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* [Internet]. 2010 [cited 2021 May 13];138(6):2088–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20420948/>
76. Moreira L. Pólipos serrados: Detección, riesgo de cáncer colorrectal y estrategias de tratamiento y vigilancia. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2021 May 13];34(SUPPL. 2):73–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22330160/>
77. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, et al. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2021 May 13];30(12):1491–501. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17122504/>
78. Ijspeert JEG, Vermeulen L, Meijer GA, Dekker E. Serrated neoplasia-role in colorectal carcinogenesis and clinical implications [Internet]. Vol. 12, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2015 [cited 2021 May 13]. p. 401–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25963511/>
79. Hale MD, Gotoda T, Hayden JD, Grabsch HI. Endoscopic biopsies from gastrointestinal carcinomas and their suitability for molecular analysis: A review of the literature and recommendations for clinical practice and research. Vol. 67, *Histopathology*. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 147–57.
80. Marshall JB, Diaz-Arias AA, Barthel JS, King PD, Butt JH. Prospective Evaluation of Optimal Number of Biopsy Specimens and Brush Cytology in the Diagnosis of Cancer of the Colorectum. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 1993 [cited 2021 May 14];88(9):1352–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8362828/>
81. Colleypriest BJ, Marden PF, Linehan JD. What is the optimal number of biopsies to diagnose a tumor found during colonoscopy? [Internet]. Vol. 43, *Journal of Clinical Gastroenterology*. J Clin Gastroenterol; 2009 [cited 2021 May 14]. p. 1012–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19525860/>
82. Dabos KJ, Gousi T, Navrozoglou A, Kodogeorgou E, Papadopoulos M. Optimal number of biopsies to correctly identify colorectal cancer during colonoscopy [Internet]. Vol. 46, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Scand J Gastroenterol; 2011 [cited 2021 May 14]. p. 247–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20969488/>
83. Benavides M, Díaz-Rubio E, Carrato A, Abad A, Guillén C, Garcia-Alfonso P, et al. Tumour location and efficacy of first-line EGFR inhibitors in KRAS/RAS wild-type metastatic colorectal cancer: Retrospective analyses of two phase II randomised Spanish TTD trials. *ESMO Open*. 2019;4(6):599.
84. The International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours of the Digestive System (IARC WHO Classification of Tumours) [Internet]. WHO classification of tumours of the digestive system. World Health Organization; 2010 [cited 2021 May 8]. Available from: <https://www.amazon.com/exec/obidos/ASIN/9283224329/pathologyoutl-20>
85. Ahadi M, Sokolova A, Brown I, Chou A, Gill AJ. The 2019 World Health Organization Classification of appendiceal, colorectal and anal canal tumours: an update and critical assessment [Internet]. Vol. 53, *Pathology*. Pathology; 2021 [cited 2022 Feb 13]. p. 454–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33461799/>

86. The International Agency for Research on Cancer. Digestive System Tumours WHO Classification of Tumours, 5th. 2019. vol 1.
87. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer [Internet]. Vol. 25, Annals of Surgical Oncology. Springer New York LLC; 2018 [cited 2021 May 17]. p. 1454–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29616422/>
88. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, Schrock AB, Rankin A, Zhang BY, et al. Non-V600BRAF mutations define a clinically distinct molecular subtype of metastatic colorectal cancer. In: Journal of Clinical Oncology [Internet]. J Clin Oncol; 2017 [cited 2022 Feb 13]. p. 2624–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28486044/>
89. Barras D, Missiaglia E, Wirapati P, Sieber OM, Jorissen RN, Love C, et al. BRAF V600E mutant colorectal cancer subtypes based on gene expression. Clin Cancer Res [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 Feb 13];23(1):104–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27354468/>
90. Navarro S, Cuatrecasas M, Hernández-Losa J, Landolfi S, Musulén E, Ramón y Cajal S, et al. Update of the recommendations for the determination of biomarkers in colorectal carcinoma. National Consensus of the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. Vol. 54, Revista Espanola de Patologia. Ediciones Doyma, S.L.; 2021. p. 41–54.
91. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: Microsatellite instability in colorectal cancer: Prognostic, predictive, and therapeutic implications. Clin Cancer Res [Internet]. 2012 Mar 15 [cited 2021 May 17];18(6):1506–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22302899/>
92. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. Eur J Cancer [Internet]. 2009 Feb [cited 2021 May 17];45(3):365–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18722765/>
93. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol [Internet]. 2018 Mar 10 [cited 2022 Mar 13];36(8):773–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29355075/>
94. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK, et al. Colon cancer, Version 2.2021. JNCCN J Natl Compr Cancer Netw [Internet]. 2021 [cited 2022 Jan 18];19(3):329–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33724754/>
95. Heald RJ, Ryall RDH. RECURRENCE AND SURVIVAL AFTER TOTAL MESORECTAL EXCISION FOR RECTAL CANCER. Lancet [Internet]. 1986 Jun 28 [cited 2022 Jan 18];327(8496):1479–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2425199/>
96. Codina Cazador A, Biondo S, Espin Basany E, Enriquez-Navascues JM, Garcia-Granero E, Roig Vila JV, et al. Oncological results of the educational Rectal Cancer Project in Spain 10 years after its implementation. Cir Esp [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Jan 18];95(10):577–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29037748/>
97. Green BL, Marshall HC, Collinson F, Quirke P, Guillou P, Jayne DG, et al. Long-term follow-up of the Medical Research Council CLASICC trial of conventional versus laparoscopically assisted resection in colorectal cancer. Br J Surg [Internet]. 2013 Jan [cited 2022 Jan 20];100(1):75–82. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23132548/>
98. Jayne DG, Guillou PJ, Thorpe H, Quirke P, Copeland J, Smith AMH, et al. Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-Year results of the UK MRC CLASICC trial group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 Jul 20 [cited 2022 Jan 20];25(21):3061–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17634484/>
99. Deijen CL, Vasmel JE, de Lange-de Klerk ESM, Cuesta MA, Coene PPLO, Lange JF, et al. Ten-year outcomes of a randomised trial of laparoscopic versus open surgery for colon cancer. *Surg Endosc* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2022 Jan 20];31(6):2607–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27734203/>
100. van der Geest LGM, Lam-Boer J, Koopman M, Verhoef C, Elferink MAG, de Wilt JHW. Nationwide trends in incidence, treatment and survival of colorectal cancer patients with synchronous metastases. *Clin Exp Metastasis* [Internet]. 2015 Jun 10 [cited 2021 May 18];32(5):457–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25899064/>
101. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Jul 15 [cited 2021 May 18];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27416752/>
102. Selby P, Popescu R, Lawler M, Butcher H, Costa A. The Value and Future Developments of Multidisciplinary Team Cancer Care. *Am Soc Clin Oncol Educ B* [Internet]. 2019 May [cited 2021 May 18];39(39):332–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31099640/>
103. de Gramont A. Adjuvant chemotherapy with oxaliplatin, in combination with fluorouracil plus leucovorin prolongs disease-free survival, but causes more adverse events in people with stage II or III colon cancer [Internet]. Vol. 30, *Cancer Treatment Reviews*. Cancer Treat Rev; 2004 [cited 2022 Jan 20]. p. 711–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15541581/>
104. O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, Gangnon RE, Liou JI, Heise CP, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2021 May 18];29(25):3381–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21788561/>
105. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer [Internet]. Vol. 22, *Journal of Clinical Oncology*. J Clin Oncol; 2004 [cited 2021 May 18]. p. 3408–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15199089/>
106. Agbamu DA, Day N, Walsh CJ, Hendrickse CW, Langman G, Pallan A, et al. Feasibility of preoperative chemotherapy for locally advanced, operable colon cancer: The pilot phase of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2022 Jan 20];13(11):1152–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23017669/>
107. Carlos Fernandez-Martos, Alfonso Garcia Fadrique RG-J. Optimal Sequencing of Neoadjuvant Therapies (NAT) in Rectal Cancer: Upfront Chemotherapy vs. Upfront Chemoradiation. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2017;13(2):154–64.
108. Castells A. Hereditary forms of colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 May 19];39:62–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27888866/>
109. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, et al. Cancer susceptibility gene mutations in individuals with colorectal cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2021 May 19];35(10):1086–95. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28135145/>
110. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2015 Feb 24 [cited 2021 May 19];15(3):181–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25673086/>
 111. Watson P, Vasen HFA, Mecklin JP, Bernstein I, Aarnio M, Järvinen HJ, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2021 May 19];123(2):444–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18398828/>
 112. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in lynch syndrome. *JAMA - J Am Med Assoc* [Internet]. 2011 Jun 8 [cited 2021 May 19];305(22):2304–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21642682/>
 113. Gupta S, Weiss JM, Burke CA, Chen L-M, Chung DC, Clayback KM, et al. NCCN Guidelines Version 1.2020 Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal NCCN Guidelines Version 1.2020 Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal NCCN Guidelines Index Table of Contents Discussion NCCN Guidelines Panel Disclosures Continue [Internet]. 2020 [cited 2021 May 20]. Available from: <https://www.nccn.org/home/>
 114. Vasen HFA, Mecklin JP, Meera Khan P, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* [Internet]. 1991 May [cited 2021 May 20];34(5):424–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2022152/>
 115. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. In: *Gastroenterology* [Internet]. W.B. Saunders; 1999 [cited 2021 May 20]. p. 1453–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10348829/>
 116. Laghi L, Bianchi P, Roncalli M, Malesci A, Umar A. Re: Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (lynch syndrome) and microsatellite instability (multiple letters) [2] [Internet]. Vol. 96, *Journal of the National Cancer Institute. J Natl Cancer Inst*; 2004 [cited 2021 May 20]. p. 1402–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15367575/>
 117. Barnetson RA, Tenesa A, Farrington SM, Nicholl ID, Cetnarskyj R, Porteous ME, et al. Identification and Survival of Carriers of Mutations in DNA Mismatch-Repair Genes in Colon Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Jun 29 [cited 2021 May 20];354(26):2751–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16807412/>
 118. Wijnen JT, Vasen HFA, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, et al. Clinical Findings with Implications for Genetic Testing in Families with Clustering of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 1998 Aug 20 [cited 2021 May 20];339(8):511–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9709044/>
 119. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry Versus Microsatellite Instability Testing in Phenotyping Colorectal Tumors. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Feb 15 [cited 2021 May 21];20(4):1043–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11844828/>
 120. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagnostics* [Internet].

- 2008 Jul 1 [cited 2021 May 21];10(4):293–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18556767/>
121. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* [Internet]. 1993 Dec 3 [cited 2021 May 20];75(5):1027–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8252616/>
 122. Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch Syndrome: From bench to bedside. In: *Familial Cancer* [Internet]. *Fam Cancer*; 2008 [cited 2021 May 20]. p. 41–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17636426/>
 123. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. In: *Cancer Research* [Internet]. *Cancer Res*; 1998 [cited 2021 May 21]. p. 5248–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9823339/>
 124. Buhard O, Cattaneo F, Yick FW, So FY, Friedman E, Flejou JF, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* [Internet]. 2006 Jan 10 [cited 2022 Feb 22];24(2):241–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16330668/>
 125. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One* [Internet]. 2010 Feb 24 [cited 2021 May 21];5(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20195377/>
 126. López-Reig R, Fernández-Serra A, Romero I, Zorrero C, Illueca C, García-Casado Z, et al. Prognostic classification of endometrial cancer using a molecular approach based on a twelve-gene NGS panel. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Feb 22];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31792358/>
 127. Baudrin LG, Duval A, Daunay A, Buhard O, Bui H, Deleuze JF, et al. Improved microsatellite instability detection and identification by nuclease-assisted microsatellite instability enrichment using HSP110 T17 [Internet]. Vol. 64, *Clinical Chemistry*. American Association for Clinical Chemistry Inc.; 2018 [cited 2021 May 21]. p. 1252–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29903872/>
 128. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). *N Engl J Med* [Internet]. 2005 May 5 [cited 2021 May 21];352(18):1851–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15872200/>
 129. Bao F, Panarelli NC, Rennert H, Sherr DL, Yantiss RK. Neoadjuvant therapy induces loss of MSH6 expression in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2010 Dec;34(12):1798–804.
 130. Kuan SF, Ren B, Brand R, Dudley B, Pai RK. Neoadjuvant therapy in microsatellite-stable colorectal carcinoma induces concomitant loss of MSH6 and Ki-67 expression. *Hum Pathol*. 2017 May 1;63:33–9.
 131. Overbeek LIH, Ligtenberg MJL, Willems RW, Hermens RPMG, Blokx WAM, Dubois S V., et al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2008 Aug [cited 2021 May 21];32(8):1246–51. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18677806/>
132. Engel C, Forberg J, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Plaschke J, Kloor M, et al. Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2021 May 21];118(1):115–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16003745/>
 133. Pearlman R, Markow M, Knight D, Chen W, Arnold CA, Pritchard CC, et al. Two-stain immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer may fail to detect mismatch repair deficiency. *Mod Pathol* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 May 21];31(12):1891–900. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29967423/>
 134. Pai RK, Pai RK. A practical approach to the evaluation of gastrointestinal tract carcinomas for lynch syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(4):e17–34.
 135. Cohen R, Hain E, Buhard O, Guilloux A, Bardier A, Kaci R, et al. Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer with Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA Oncol* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 May 21];5(4):551–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30452494/>
 136. Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): Recommendations by a group of European experts [Internet]. Vol. 62, *Gut*. 2013 [cited 2020 Feb 2]. p. 812–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23408351>
 137. Hampel H, Pearlman R, Beightol M, Zhao W, Jones D, Frankel WL, et al. Assessment of tumor sequencing as a replacement for lynch syndrome screening and current molecular tests for patients with colorectal cancer. *JAMA Oncol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 May 22];4(6):806–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29596542/>
 138. Castro-Mujica MDC B-CC. [Lynch syndrome: genetic, clinical and diagnostic aspects]. *Rev Gastroenterol Peru*. 2018;3(38):265–79.
 139. Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, AktanCollan K, Aaltonen LA, Peltomäki P, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2000 [cited 2021 May 23];118(5):829–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10784581/>
 140. Järvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 1995 [cited 2021 May 23];108(5):1405–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7729632/>
 141. Mecklin JP, Aarnio M, Läärä E, Kairaluoma M V., Pylvänäinen K, Peltomäki P, et al. Development of Colorectal Tumors in Colonoscopic Surveillance in Lynch Syndrome. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1093–8.
 142. Schmeler KM, Lynch HT, Chen L, Munsell MF, Soliman PT, Clark MB, et al. Prophylactic Surgery to Reduce the Risk of Gynecologic Cancers in the Lynch Syndrome. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Jan 19 [cited 2021 May 23];354(3):261–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16421367/>
 143. Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW, Kinney AY, Miesfeldt S, Lu KH, et al. Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: A systematic review [Internet]. Vol. 296, *Journal of the American*

- Medical Association. JAMA; 2006 [cited 2021 May 23]. p. 1507–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17003399/>
144. Jiang B, Ofshteyn A, Idrees JJ, Giglia M, Gallego C, Stein SL, et al. Total abdominal colectomy is cost-effective in treating colorectal cancer in patients with genetically diagnosed Lynch Syndrome. *Am J Surg* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 May 24];218(5):928–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30904142/>
 145. Umetani N, Sasaki S, Watanabe T, Ishigami H, Ueda E, Nagawa H. Diagnostic primer sets for microsatellite instability optimized for a minimal amount of damaged DNA from colorectal tissue samples. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2000 [cited 2022 Feb 23];7(4):276–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10819367/>
 146. Nordholm-Carstensen A, Krarup PM, Morton D, Harling H. Mismatch repair status and synchronous metastases in colorectal cancer: A nationwide cohort study. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2022 Mar 15];137(9):2139–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25921209/>
 147. Mohan HM, Ryan E, Balasubramanian I, Kennelly R, Geraghty R, Sclafani F, et al. Microsatellite instability is associated with reduced disease specific survival in stage III colon cancer. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2022 Mar 15];42(11):1680–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27370895/>
 148. Shaikh T, Handorf EA, Meyer JE, Hall MJ, Esnaola NF. Mismatch repair deficiency testing in patients with colorectal cancer and nonadherence to testing guidelines in young adults. *JAMA Oncol* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 Mar 31];4(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29121143/>
 149. Karlitz JJ, Hsieh MC, Liu Y, Blanton C, Schmidt B, Jessup JM, et al. Population-based lynch syndrome screening by microsatellite instability in patients ≤50: Prevalence, testing determinants, and result availability prior to colon surgery. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Jul 8 [cited 2022 Mar 31];110(7):948–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25601013/>
 150. Kozak VN, de Souza Fonseca Ribeiro EM, Kozonoe MM, Ioshii SO, Casali da Rocha JC. When guidelines face reality — Lynch syndrome screening in the setting of public health system in a developing country. *J Community Genet* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2022 Mar 31];13(1):19–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34623598>
 151. Vilkin A, Halpern M, Morgenstern S, Brazovski E, Gingold-Belfer R, Boltin D, et al. How reliable is immunohistochemical staining for DNA mismatch repair proteins performed after neoadjuvant chemoradiation? *Hum Pathol*. 2014 Oct 1;45(10):2029–36.
 152. Fadhil W, Ilyas M. Immunostaining for mismatch repair (MMR) protein expression in colorectal cancer is better and easier to interpret when performed on diagnostic biopsies [Internet]. *Histopathology* [Internet]. Mar 1, 2012 p. 653–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22260350/>
 153. Joost P, Veurink N, Holck S, Klarskov L, Bojesen A, Harbo M, et al. Heterogenous mismatch-repair status in colorectal cancer. *Diagn Pathol* [Internet]. 2014 Jun 26 [cited 2022 Mar 22];9(1):126. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2474838/>
 154. McCarthy AJ, Capo-Chichi JM, Spence T, Grenier S, Stockley T, Kamel-Reid S, et al. Heterogenous loss of mismatch repair (MMR) protein expression: a challenge for immunohistochemical interpretation and microsatellite instability (MSI) evaluation. *J Pathol Clin Res* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2022 May 7];5(2):115–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30387329/>
 155. Pearlman R, Frankel WL, Swanson BJ, Jones D, Zhao W, Yilmaz A, et al. Prospective

- Statewide Study of Universal Screening for Hereditary Colorectal Cancer: The Ohio Colorectal Cancer Prevention Initiative. *JCO Precis Oncol* [Internet]. 2021 May [cited 2022 Apr 10];5(5):779–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34250417/>
156. Brennan B, Hemmings CT, Clark I, Yip D, Fadia M, Taupin DR. Universal molecular screening does not effectively detect Lynch syndrome in clinical practice. *Therap Adv Gastroenterol* [Internet]. 2017 [cited 2022 Apr 10];10(4):361–71. Available from: [/pmc/articles/PMC5405883/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/305405883/)
157. Li J, Xu Q, Luo C, Chen L, Ying J. Clinicopathologic characteristics of resectable colorectal cancer with mismatch repair protein defects in Chinese population: Retrospective case series and literature review. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2020 Jun 12 [cited 2022 Apr 10];99(24):e20554. Available from: [/pmc/articles/PMC7302659/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/327302659/)
158. Korphaisarn K, Pongpaibul A, Limwongse C, Roothumnong E, Klaisuban W, Nimmannit A, et al. Deficient DNA mismatch repair is associated with favorable prognosis in Thai patients with sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Jan 21 [cited 2022 Apr 10];21(3):926–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25624727/>
159. López-Correa PE, Lino-Silva LS, Gamboa-Domínguez A, Zepeda-Najar C, Salcedo-Hernández RA. Frequency of Defective Mismatch Repair System in a Series of Consecutive Cases of Colorectal Cancer in a National Cancer Center. *J Gastrointest Cancer* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Apr 10];49(3):379–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29974347/>
160. Marabelli M, Gandini S, Rafaniello PR, Calvello M, Tolva G, Feroce I, et al. Is tumor testing efficiency for Lynch syndrome different in rectal and colon cancer? *Dig Liver Dis* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Apr 10];52(12):1503–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32620519/>
161. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Dec 10 [cited 2022 Mar 31];26(35):5783–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18809606/>
162. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of lynch syndrome: A consensus statement by the US multi-society task force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Mar 31];109(8):1159–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25070057/>
163. The Royal Collage of Pathologists, Bowel Cancer UK. 2016 Data Briefing: Reflex testing for Lynch syndrome in people diagnosed with bowel cancer under the age of 50.
164. Bai H, Wang R, Cheng W, Shen Y, Li H, Xia W, et al. Evaluation of concordance between deficient mismatch repair and microsatellite instability testing and their association with clinicopathological features in colorectal cancer. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 5];12:2863–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32425600/>
165. Li X, Liu H, Liang M, Chen H, Liang L. Clinicopathological features and types of microsatellite instability in 1394 patients with colorectal cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2020 Nov 30;40(11):1645–50.
166. Chikatani K, Chika N, Suzuki O, Sakimoto T, Ishibashi K, Eguchi H, et al. A model for Predicting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancer. *Anticancer Res*

- [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Jun 2];40(8):4379–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32727766/>
167. Maraqa B, Al-Shbool G, Abu-Shawer O, Souleiman M, Alshakhatreh O, Al-Omari A, et al. Frequency of Mismatch Repair Protein (MMRP) Deficiency among Young Jordanians Diagnosed with Colorectal Carcinoma (CRC). *Gastroenterol Res Pract* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 5];2020. Available from: [/pmc/articles/PMC7195647/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32727766/)
 168. Loughrey MB, McGrath J, Coleman HG, Bankhead P, Maxwell P, McGready C, et al. Identifying mismatch repair-deficient colon cancer: near-perfect concordance between immunohistochemistry and microsatellite instability testing in a large, population-based series. *Histopathology* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Jun 5];78(3):401–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32791559/>
 169. Hissong E, Crowe EP, Yantiss RK, Chen YT. Assessing colorectal cancer mismatch repair status in the modern era: a survey of current practices and re-evaluation of the role of microsatellite instability testing. *Mod Pathol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Jun 5];31(11):1756–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29955148/>
 170. Chen M-L, Chen J-Y, Hu J, Chen Q, Yu L-X, Liu B-R, et al. Comparison of microsatellite status detection methods in colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jun 5];11(3):1431–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31938240/>