

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL
UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER COLORRECTAL
FAMILIAR NO POLIPÓSICO CON TUMORES ESTABLES
A MICROSATÉLITES (HNPCC-X)**

TESIS DOCTORAL

Pilar Garre Rubio
Madrid, 2011

Quiero agradecerle a la Dra. Trinidad Caldés, no solo su dirección, experiencia y enseñanzas, sino también el apoyo y la confianza que me ha brindado a lo largo de todos estos años. Y también al Dr. Eduardo Díaz-Rubio, por acogerme en el Servicio de Oncología del HCSC y por su codirección.

Muchas gracias al Dr. Miguel de la Hoya por escucharme, explicarme y aconsejarme desinteresadamente y también pacientemente.

A la Dra. Susan Farrington, del Western General Hospital, Edimburgo, deseo agradecerle el haberme acogido y supervisado en los estudios de inmunofluorescencia así como haberme cedido aquellas muestras de pacientes con mutación en el gen MUTYH.

Al Dr. Xavier Llor y a su equipo por su colaboración en el estudio del gen MUTYH.

Al Servicio de Anatomía Patológica del HCSC, especialmente al Dr. Julián Sanz y a Susana Hernández por su ayuda en la elaboración de los TMA e inmunohistoquímica de las proteínas de la vía Wnt. También a Javier Hernández, de la Fundación de Investigación en Oncología del Hospital Vall d'Hebron, por la valoración de FoxO3a.

A mi tutor el Dr. Agustín Roca, de la Universidad de Oviedo, por su disponibilidad y ayuda en todos los trámites burocráticos.

Muchas gracias a todas las familias que han participado haciendo posible este trabajo. Por todo su interés y empeño, pese a las circunstancias.

Y sobre todo gracias a todo el laboratorio de Oncología Molecular del HCSC por su ayuda, apoyo y participación activa en esta tesis: Alicia, Verónica, Inma, Lourdes, Alex, Beatriz, Atocha y el resto de gente que ha pasado por aquí a lo largo de estos años.

Finalmente quiero agradecer a toda mi familia, por animarme, soportarme y ayudarme en todo lo que han podido. Especialmente a mi madre por estar siempre ahí, y a mi añorado padre siempre presente en mí.

Fran, Virginia y María; no tengo palabras para agradeceros todo lo que día a día me dais.

“Nunca es tarde si la sopa es buena”

Ramón Gómez de la Serna

A mi pequeña gran familia...

ABREVIATURAS

8OHdG	8-hidroxi 2'-deoxiguanina
8OHdGTP	8-hidroxi 2'-deoxiguanosina trifosfato
A	Adenina
AFAP	poliposis adenomatosa familiar atenuada
APC	gen adenomatous polyposis coli (MIM611731)
AXINA1	gen axina 1 (MIM603816)
AXINA2	gen axina 2 (MIM604025)
BAX	gen BCL2-associated X protein (MIM600040)
BER	reparación por escisión de bases (base excision repair)
BMPRI1A	gen bone morphogenetic protein receptor, type IA (MIM601299)
BRAF	gen v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (MIM164757)
BSA	Bovine Serum Albumin
BsaWI	endonucleasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> W1718 (Z. Chen)
C	Citosina
CASP5	gen caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase (MIM602665)
CCND1	gen ciclina D1 (MIM168461)
CCR	cáncer colorrectal
cDNA	DNA complementario
CEU(CEPH)	residentes en Utah descendientes de individuos del Norte y Oeste de Europa
CIN	inestabilidad cromosómica (chromosomal instability)
CIMP	fenotipo metilador de islas CpG (CpG island methylator phenotype)
CTNNB1	gen β -catenina (cadherin-associated protein) (MIM116806)
DAB	3,3'diaminobencidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCC	gen deleted in colorectal carcinoma (MIM120470)
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
DNA	ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
EDTA K3	ácido etilendiaminotetraacético tripotásico
EGFR	gen epidermal growth factor receptor (MIM131550)
ENG	gen edoglina (MIM131195)
EPCAM(TACSTD1)	gen epithelial cell adhesion molecule (MIM185535)
FAM	Carboxifluoresceína
FAP	poliposis adenomatosa familiar

FEN1	gen flap structure-specific endonuclease 1 (MIM600393)
FOXO3	gen forkhead box O3 (MIM602681)
G	Guanina
GWAS	estudios pangenómicos de asociación
HCSC	Hospital Clínico San Carlos
HNPCC	cáncer colorrectal hereditario no polipósico
HSF	Human Splicing Finder
IC	intervalo de confianza
KRAS	gen v-Ki-ras2 oncogene homolog (MIM190070)
LIG1	gen ligase I, DNA, ATP-dependent (MIM126391)
LIG3	gen ligase III, DNA, ATP-dependent (MIM600940)
LOH	pérdida de heterocigosidad (loss of heterozygosity)
MAF	frecuencia del alelo minoritario
MAP	poliposis asociada al gen MUTYH
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MGMT	gen O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MIM156569)
MLH1	gen mutL homolog 1 (<i>E. coli</i>) (MIM120436)
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MMR	Mismatch Repair
MSH2	gen mutS homolog 2 (<i>E. coli</i>) (MIM609309)
MSH6	gen mutS homolog 6 (<i>E. coli</i>) (MIM600678)
MSI	inestabilidad de microsatélites
MSS	estabilidad de micosatélites
MTH1(NUDT1)	gen nudix - type motif 1 (MIM600312)
MUTYH	gen mutY homolog (<i>E. coli</i>) (MIM604933)
MYC	gen v-myc myelocytomatosis oncogene homolog (avian) (MIM190080)
NCBI	National Centre for Biotechnology Information (US)
NMD	Nonsense Mediated Decay
OGG1	gen 8-oxoguanine DNA glycosylase (MIM601982)
OR	Odd Ratio
PCNA	gen proliferating cell nuclear antigen (MIM176740)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PDB	Protein Data Bank
PI3K	gen phosphatidylinositol 3-kinase (MIM171834)
PMS2	gen postmeiotic segregation increased 2 (<i>S. cerevisiae</i>) (MIM600259)
POLB	gen polymerase (DNA directed), beta (MIM174760)
Polyphen	Polymorphism Phenotyping
PQS	Protein Quaternary Structure database

PTEN	gen phosphatase and tensin homolog (MIM601728)
RNA	ácido ribonucleico
ROS	especies reactivas de oxígeno
SIFT	Sorts Intolerant From Tolerant
SMAD2	gen SMAD family member 2 (MIM601366)
SMAD3	gen SMAD family member 3 (MIM603109)
SMAD4	gen SMAD family member 4 (MIM600993)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPJ	síndrome de Peutz-Jeghers
SJP	síndrome de poliposis juvenil
STK11 (LKB1)	gen serine/threonine kinase 11 (MIM602216)
T	Timina
TBS	Tris Buffer Salino
TCF4	gen transcription factor 4 (MIM602272)
TGF β	transforming growth factor beta
TGF β R2	gen transforming growth factor, beta receptor II (MIM190182)
TMA	tissue microArray
TP53	gen tumor protein p53 (MIM191170)
TSG	gen supresor de tumor
UniProt	Universal Protein resource
WGH	Western General Hospital
Wnt	wingless-type MMTV integration site family
χ^2	test de la chi cuadrado
XRCC1	gen X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (MIM194360)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN (pág5)

1. **CANCER COLORRECTAL** (pág07)
 - 1.1. Etiología y factores de riesgo (pág07)
 - 1.2. Carcinogénesis colorrectal (pág08)
 - 1.2.1. Mutaciones somáticas (pág10)
 - 1.2.1.1. Vía Wnt (pág11)
 - 1.2.2. Inestabilidad genómica (pág13)
 - 1.2.2.1. Inestabilidad cromosómica: CIN (pág13)
 - 1.2.2.2. Inestabilidad de secuencias microsatélites: MSI (pág13)
 - 1.2.2.3. Fenotipo metilador de las islas CpG: CIMP (pág15)
 - 1.2.2.4. Defectos en la vía VER (pág16)
 - 1.3. Susceptibilidad genética al CCR (pág17)
 - 1.4. Clasificación del CCR (pág20)
 - 1.4.1. Cáncer colorrectal hereditario (pág21)
 - 1.4.1.1. CCR hereditario polipósico (pág22)
 - 1.4.1.1.1. Poliposis adenomatosa familiar: FAP (pág22)
 - 1.4.1.1.2. Poliposis asociada a MUTYH: MAP (pág23)
 - 1.4.1.2. CCR hereditario no polipósico: HNPCC (pág24)
 - 1.4.1.2.1. Síndrome de Lynch (HNPCC-MSI) (pág24)
 - 1.4.1.2.2. Cáncer colorrectal familiar tipo X: HNPCC-X ó FCC-X (pág31)
 - 1.4.1.3. Poliposis hamartomosa (pág33)
 - 1.4.1.3.1. Síndrome de Peutz-Jeghers: SPJ (pág34)
 - 1.4.1.3.2. Síndrome de Poliposis Juvenil: SJP (pág34)
 - 1.4.1.3.3. Síndrome de Cowden (pág34)
2. **DAÑO OXIDATIVO** (pág35)
 - 2.1. Vías de reparación BER (pág36)
3. **HAPLOTIPO YIN-YANG** (pág38)

OBJETIVOS (pág41)

MATERIAL Y MÉTODOS (pág45)

1. **POBLACIONES Y CRITERIOS DE SELECCIÓN** (pág47)
 - 1.1. Población de estudio HNPCC-X (pág47)
 - 1.2. Población HNPCC-MSI (pág48)
 - 1.3. Población MUTYH (pág49)
 - 1.4. Población CCR esporádico: CCR-ESP (pág50)
 - 1.5. Población control (pág50)
 - 1.6. Análisis moleculares en familias HNPCC-X y HNPCC-MSI (pág50)
 - 1.6.1. Inestabilidad a microsatélites (pág50)

- 1.6.2. Estudio de expresión de las proteínas Mlh1, Msh2, Msh6 y Pms2 (pág51)
- 1.6.3. Búsqueda de mutaciones en los genes MMR (pág51)
- 2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS (pág51)
 - 2.1. Sangre (pág51)
 - 2.1.1. DNA (pág52)
 - 2.1.2. RNA/cDNA (pág52)
 - 2.2. Bloques de tumor parafinado (pág52)
 - 2.2.1. DNA de células tumorales (pág52)
 - 2.2.2. Tissue Microarray (pág53)
- 3. BÚSQUEDA DE MUTACIONES GERMINALES EN GENES REPARADORES DEL DAÑO OXIDATIVO (pág54)
 - 3.1. Amplificación y secuenciación de los genes *OGG1*, *MTH1* y *MUTYH* (pág54)
 - 3.2. Análisis de variantes encontradas (pág56)
 - 3.2.1. Análisis de segregación de variantes (pág57)
 - 3.2.2. Análisis de *splicing* en la variante *OGG1*-R46Q (pág57)
 - 3.2.2.1. Análisis de *splicing* por secuenciación (pág58)
 - 3.2.2.2. Análisis de *splicing* por enzimas de restricción (pág59)
 - 3.2.3. Estudios de asociación caso-control (pág61)
 - 3.2.3.1. Estudio estadístico (pág62)
- 4. BÚSQUEDA DE MUTACIONES SOMÁTICAS EN *KRAS* Y *BRAF* (pág62)
- 5. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LOS NIVELES DE 8OHdG EN TEJIDO TUMORAL (pág64)
 - 5.1. Protocolo de inmunofluorescencia para 8OHdG en tejido tumoral parafinado (pág64)
 - 5.2. Valoración de 8OHdG en núcleos de células tumorales (pág65)
 - 5.3. Estudio estadístico (pág65)
- 6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LA VIA WNT EN TEJIDO TUMORAL (pág66)
 - 6.1. Protocolo de inmunohistoquímica (pág67)
 - 6.2. Valoración de los anticuerpos (pág68)
 - 6.3. Estudio estadístico (pág69)
- 7. ESTUDIO DEL DIPLOTIPO YIN-YANG EN EL GEN *APC* (pág69)

RESULTADOS (pág71)

- 1. ESTUDIO DEL DAÑO OXIDATIVO EN FAMILIAS HNPCC-X (pág73)
 - 1.1. Búsqueda de mutaciones en genes reparadores del daño oxidativo (pág73)
 - 1.1.1. Análisis de variantes raras (pág73)

- 1.1.1.1. Análisis de transcritos en la variante *OGG1*-R46Q (c.137 G>A) (pág77)
 - 1.1.2. Análisis de variantes frecuentes (pág81)
 - 1.1.2.1. Estudios de asociación caso-control (pág81)
 - 1.1.2.2. Estudio de las variantes *MTH1*-D142D y *OGG1*-S326C (pág82)
 - 1.2. Análisis del daño oxidativo (pág84)
 - 1.2.1. Análisis del espectro de mutaciones en los genes *KRAS* y *BRAF* (pág84)
 - 1.2.2. Análisis de 8OHdG en tumores (pág87)
- 2. ESTUDIO DE LA VÍA WNT (pág93)
 - 3. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS YIN-YANG EN EL GEN *APC* (pág97)

DISCUSIÓN (pág99)

- 1. JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DEL ESTUDIO DE FAMILIAS HNPCC-X (pág101)
- 2. APROXIMACIÓN A LA BÚSQUEDA DE ALELOS DE SUSCEPTIBILIDAD EN FAMILIAS HNPCC-X (pág101)
- 3. BÚSQUEDA DE VARIANTES EN LOS GENES *OGG1*, *MUTYH* Y *MTH1* EN FAMILIAS HNPCC-X (pág102)
- 3.1. Variantes raras (pág103)
- 3.2. Variantes frecuentes (pág107)
- 4. ESTUDIO DEL DAÑO OXIDATIVO (pág110)
- 4.1. Análisis de mutaciones somáticas en el gen *KRAS* (pág110)
- 4.2. Niveles de 8OHdG en núcleos de células tumorales (pág113)
- 5. VÍA WNT (pág115)
- 6. DIPLOTIPO YIN-YANG EN EL GEN *APC* (pág118)

CONCLUSIONES (pág121)

BIBLIOGRAFÍA (pág125)

URLs (pág 139)

ANEXOS (pág143)

INTRODUCCIÓN

1. CANCER COLORRECTAL

El CCR es una de las enfermedades neoplásicas más preocupantes en todos los países desarrollados. En España, es el tercer tipo de neoplasia más frecuente en hombres (después de próstata y pulmón) y el segundo en mujeres (después de mama). En el año 2008 se diagnosticaron 28.551 nuevos casos y 14.303 personas murieron a causa del CCR [1]. Tanto la incidencia como la mortalidad han ido aumentando a lo largo de los últimos años y se estima que en el año 2020 el número de casos nuevos ascienda a 35.196 y 17.530 personas mueran de CCR [1].

Los nuevos avances tecnológicos y farmacéuticos han permitido mejorar la sensibilidad de los métodos de detección y la eficacia en los tratamientos del CCR conduciendo a una mejora en las tasas de supervivencia. Sin embargo, la incidencia del CCR ha ido aumentando progresivamente en los países desarrollados; probablemente debido a un aumento de la esperanza de vida y también a un cambio en los hábitos de vida y de alimentación que marca la sociedad actual [2]. Esto hace que el CCR se siga situando entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en nuestra sociedad. Por lo tanto, todo conocimiento que se pueda aportar sobre su etiología, bases moleculares, nuevas terapias y métodos de detección precoz cobra vital importancia para reducir el alcance de esta enfermedad.

1.1. Etiología y factores de riesgo

Se sabe que el CCR es un proceso secuencial de cambios genéticos que afectan al los patrones de proliferación y división celular, pero la etiología del cáncer, en la mayoría de los casos, permanece sin definir.

Existen numerosos factores de riesgo que se creen que puedan afectar al desarrollo de CCR y que pueden ser modificables como la dieta o el estilo de vida. Se cree que una dieta baja en carnes rojas y alcohol, y alta en frutas y verduras podría prevenir la aparición del CCR al igual que el aumento en la actividad física [3].

Otros factores como la presencia de pólipos en el intestino, diagnóstico de enfermedad inflamatoria intestinal, cirugía mayor, antecedentes personales de

CCR o haber recibido radiación previa podrían contribuir a aumentar el riesgo de padecer CCR [4].

Hay dos factores de riesgo establecidos, son la edad y la predisposición genética. La vasta mayoría de los CCR ocurren en individuos mayores de 50 años. Concretamente, en España, más de la mitad de los casos totales de CCR ocurren en individuos mayores de 70 años, y aproximadamente el 75% de los casos ocurren a una edad superior a los 65 años. Solamente el 5% de los casos ocurren por debajo de los 50 años [1].

Respecto a la predisposición genética, los familiares de primer grado de individuos que hayan padecido CCR tienen un riesgo del 15-20%, según aumenta el número de familiares afectados aumenta el riesgo, y si se detectan alteraciones genéticas en genes conocidos de susceptibilidad al CCR el riesgo de sufrir CCR se sitúa en torno al 70-95% [4].

1.2. Carcinogénesis colorrectal

La carcinogénesis es el proceso mediante el cual una célula normal se transforma en célula cancerosa. Se caracteriza por ser un proceso secuencial donde la célula va adquiriendo ciertas capacidades que le van a permitir, en última instancia, proliferar ilimitadamente y diseminarse.

Recientemente se ha propuesto que la inestabilidad genómica acompañada de inflamación continua serían procesos desencadenantes del proceso carcinogénico [5]. El microambiente que proporcionan las células del sistema inmune junto con alteraciones secuenciales en el genoma producidas por una inestabilidad genómica (bien debida a fallos endógenos o a agentes externos) van a permitir que la célula adquiera las características necesarias para malignificarse: activación sostenida de las señales proliferativas, evasión de los inhibidores de crecimiento, evasión de la muerte celular, inmortalidad, activación de la angiogénesis, capacidad de invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo energético y evasión del sistema inmunológico [5].

El modelo más completo de carcinogénesis donde se muestra la relación entre la progresión fenotípica del tumor y los cambios genéticos es precisamente el CCR. Esto es así porque el epitelio colónico es relativamente fácil de acceder a

través de colonoscopias y porque el CCR es muy frecuente en países desarrollados permitiendo el estudio de un gran número de tumores en distintos grados de progresión.

En 1990 Fearon y Vogelstein [6] presentaron un modelo genético de carcinogénesis colorrectal en el que proponían la participación de los siguientes procesos moleculares:

- Los tumores colorrectales surgen como resultado de la activación de oncogenes como *KRAS* e inactivación de genes supresores de tumor como *APC*, *TP53*, *DCC* y *SMAD4*.
- Para la formación de un tumor maligno se requieren mutaciones en al menos 4 o 5 genes.
- Aunque las alteraciones genéticas ocurren preferentemente en un orden secuencial, la acumulación de estas mutaciones, y no el orden en que sucedan, es la responsable de las propiedades biológicas del tumor.
- En algunos casos, los genes supresores de tumor pueden actuar de una manera “no recesiva” a nivel celular; parecen perder su función incluso en heterocigosis.

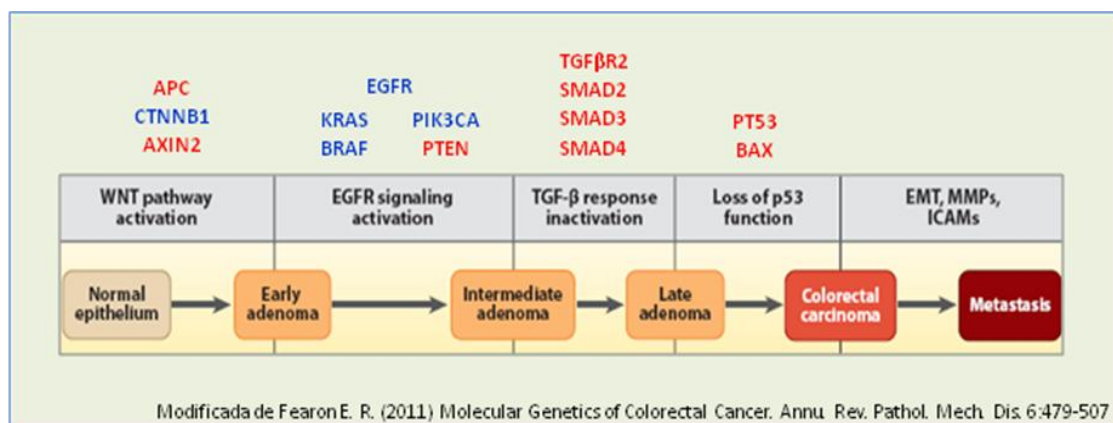


Figura 1: Modelo actual de carcinogénesis colorrectal [7]. Rutas implicadas en el proceso y principales oncogenes (azul) y genes supresores de tumor (rojo) alterados en CCR.

EMT: transición epitelio-mesénquima, MMPs: metaloproteinasas de matriz, ICAMs: moléculas de adhesión intercelular

Posteriormente se ha ido completando este modelo según se ha ido profundizando en las alteraciones somáticas dirigentes (necesarias para el progreso tumoral) y las causas de inestabilidad genómica que van a facilitar estas alteraciones. Se define así un modelo múltiple y secuencial de carcinogénesis colorrectal (figura 1).

1.2.1. Mutaciones somáticas:

En un tumor colorrectal se pueden encontrar más de 80 mutaciones somáticas en zonas codificantes, pero de ellas, tan solo 15 o menos se repiten en una proporción alta de tumores [8]. Son estas mutaciones las que realmente van a dirigir la iniciación, progresión o mantenimiento del tumor y se denominan “mutaciones dirigentes” para distinguirlas del resto de mutaciones “pasajeras” que no contribuyen al proceso carcinogénico [9].

En CCR se han ido definiendo estos genes y descifrando las distintas rutas de transducción de señales afectadas en cada paso de la progresión tumoral. Estas rutas afectadas son precisamente las que van a regular procesos de proliferación, diferenciación, apoptosis y metástasis. Al desregularse van a ir confiriendo al tumor todas las facultades necesarias para malignizarse (figura 2).

Hay 4 vías fundamentales que se han visto alteradas en la mayoría de los CCR esporádicos (o al menos en un porcentaje muy grande) que son la vía Wnt, vía MAPK, vía TGF β y p53 (producto del gen PT53). La vía Wnt define el paso de epitelio normal a displásico, alteraciones en la vía de las MAPK conducen a la formación del adenoma, y p53 es clave en el paso adenoma-carcinoma. Las mutaciones somáticas que afectan a estas vías y que se han encontrado con más frecuencia en CCR se señalan en la tabla 1.

A continuación se describe la vía Wnt ya que uno de los objetivos de esta tesis es precisamente el estudio de esta vía en tumores CCR.

Tabla 1: Mutaciones somáticas más frecuentes en la carcinogénesis colorrectal y rutas afectadas.

GEN	TIPO	FREC. (%)	TIPO DE MUTACIÓN	RUTA ALTERADA	EFEECTO EN LA RUTA
<i>APC</i>	GST	70-80	fs, pm, del, LOH	Wnt	↑ proliferación
<i>CTNNB1</i>	OG	<5	pm, del	Wnt	↑ proliferación
<i>AXIN2</i>	GST	<5	fs	Wnt	↑ proliferación
<i>KRAS</i>	OG	40	pm	MAPK	↑ proliferación
<i>BRAF</i>	OG	5-10	pm	MAPK	↑ proliferación
<i>PIK3CA</i>	OG	15-25	pm	PI3K	↑ supervivencia
<i>PTEN</i>	GST	10	pm, del	PI3K	↑ supervivencia
<i>EGFR</i>	OG	5-15	amp	PI3K, MAPK	↑ proliferación ↑ supervivencia
<i>PT53</i>	GST	60-70	pm, LOH	CICLO CELULAR	↓ apoptosis
<i>TGFβ2R</i>	GST	10-15	fs, pm	TGFβ	↓ apoptosis
<i>SMAD2</i>	GST	5-10	pm, del, LOH	TGFβ	↓ apoptosis
<i>SMAD3</i>	GST	5	pm, del	TGFβ	↓ apoptosis
<i>SMAD4</i>	GST	10-15	pm, LOH	TGFβ	↓ apoptosis
<i>PT53</i>	GST	60-70	pm, LOH	CICLO CELULAR	↓ apoptosis
<i>BAX</i>	GST	5	fs	CICLO CELULAR	↓ apoptosis
<i>CMYC</i>	OG	5-10	amp	CICLO CELULAR	↑ supervivencia
<i>CCNE1</i>	OG	15-25	amp	CICLO CELULAR	↓ apoptosis
<i>FBXW7</i>	GST	20	pm, del	CICLO CELULAR	↓ apoptosis ↑ supervivencia
<i>CDK8</i>	OG	10-15	amp	Wnt	↑ proliferación

GST: gen supresor de tumor, OG: oncogén, fs: mutación que implica un cambio en la pauta de lectura, pm: mutación puntual, del: delección, LOH: pérdida de heterocigosidad, amp: amplificación.

1.2.1.1. Vía wnt

Según los modelos actuales, basados en Fearon y Volgestein [6], la primera ruta implicada en el proceso de carcinogénesis colorrectal que es necesaria para que se produzca el paso de epitelio normal a adenoma, es la vía Wnt.

La vía Wnt regula funciones de crecimiento, apoptosis y diferenciación celular [10]. Es particularmente relevante en la embriogénesis y también en las células madre del epitelio colónico que se encuentran en la base de las criptas del colon [11]. El funcionamiento normal de la vía Wnt se explica en la figura 2.

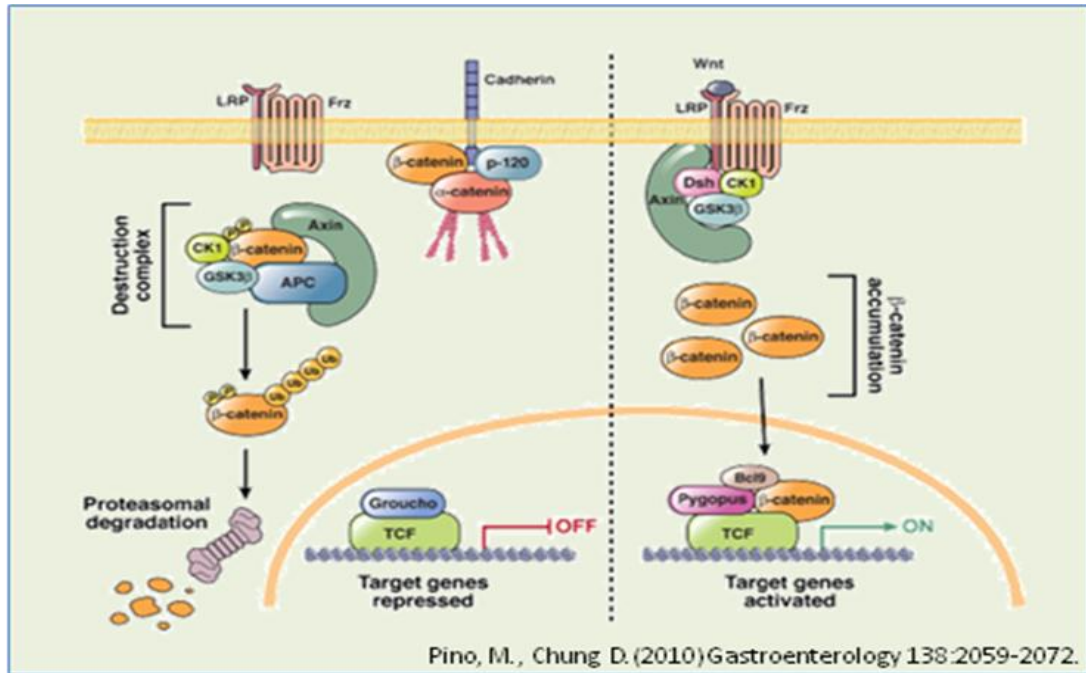


Figura 2: Vía Wnt [12]. En ausencia de señal Wnt, un complejo formado por *apc*, *gsk3 β* y *CK1* acoplado a la proteína adaptadora (*scaffold*) *axina*, permite la fosforilación de β -catenina por *GSK3*. β -catenina fosforilada se une a un complejo de ubiquitinación y es dirigida al proteosoma donde se degrada. En el núcleo, los genes diana de la ruta están reprimidos por *Groucho* que se une a *TCF*. En presencia de señal, se produce la fosforilación del extremo citoplásmico de *LRP* permitiendo la unión de *Dishevelled* (*Dsh*) con *axina* y previniendo así la fosforilación de β -catenina por *GSK3*. β -catenina escapa a la degradación y se acumula en la célula, entra en el núcleo donde desplaza a *Groucho* e interacciona con factores de transcripción de la familia *TCF/LEF* uniéndose al DNA y estimulando la expresión de genes diana.

La desregulación de esta vía conlleva a una activación constante de la β -catenina (producto del gen *CTNNB1*) y por tanto, a una estimulación constante de los factores de proliferación que esta vía regula produciéndose un foco displásico en las criptas del epitelio colónico.

La mutación más común en el CCR es la inactivación del gen supresor *APC*, de tal manera que la proteína que codifica (*apc*) no va a unirse a la β -catenina y ésta va a permanecer constitutivamente activada [13] (figura 2). Aproximadamente el 60-80% de los tumores colorrectales esporádicos presentan inactivación del gen *APC* [14, 15], bien por pérdida del fragmento cromosómico 5q (donde se localiza) o bien por una mutación que produzca una proteína truncada [15].

Dentro de los CCR que no presentan mutación en *APC*, el 48% presentan mutación en *CTNNB1* [16].

Con mucha menos frecuencia se han observado mutaciones en otros genes implicados en esta vía como la *AXINA1*, *AXINA2* o *TCF4*, y que también conllevan a la activación constitutiva de la vía [7].

1.2.2. Inestabilidad genómica:

En definitiva, la formación de un carcinoma viene condicionada por el acumulo al azar de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumor. Cuando un tumor sólido es diagnosticado se observan múltiples alteraciones genéticas en las células tumorales lo que sugiere que la tasa de mutaciones en estas células esté aumentada [17]. En el CCR se han descrito distintas formas de inestabilidad genómica que aumentan la tasa de mutación, y son estas formas de inestabilidad las que definen las principales rutas carcinogénicas en el CCR.

1.2.2.1. Inestabilidad cromosómica: CIN

CIN hace referencia a una tasa elevada de ganancias o pérdidas de grandes regiones cromosómicas resultando en un desequilibrio en el número de cromosomas (aneuploidía), amplificaciones de grandes zonas cromosómicas y LOH. Alteraciones en genes implicados en la segregación cromosómica, regulación telomérica y respuesta al daño en el DNA son responsables de CIN [12].

CIN se detecta en el 65-70% de los CCR [12] constituyendo la principal ruta de carcinogénesis colorrectal con mutaciones somáticas preferentes en el gen *APC* y pérdidas de los fragmentos 17p y 18q que contiene a los genes *TP53* y *SMAD2, 3 y 4* respectivamente.

1.2.2.2. Inestabilidad de secuencias microsatélites: MSI

La DNA polimerasa es especialmente susceptible a cometer errores en secuencias nucleotídicas repetitivas (microsatélites) durante la replicación. La vía MMR (figura 3) es la encargada de corregir los fallos por desapareamiento que pueda cometer la polimerasa. Fallos en este sistema de reparación conllevan sobre todo a una inestabilidad en el número de

repeticiones de microsatélites [18]. El genoma humano presenta un elevado número de secuencias microsatélites tanto en zonas génicas como en zonas intergénicas, por lo que un fallo en su reparación (fenotipo MSI) produciría un aumento en la tasa de mutaciones en aquellos genes diana que contengan secuencias microsatélites. Algunos oncogenes y genes supresores de tumor contienen microsatélites en su zona codificante y es frecuente su alteración en tumores MSI; sería el caso de los genes *TGF β R2*, *TCF4*, *BAX*, *MSH6*, *CASP5* entre otros [19].

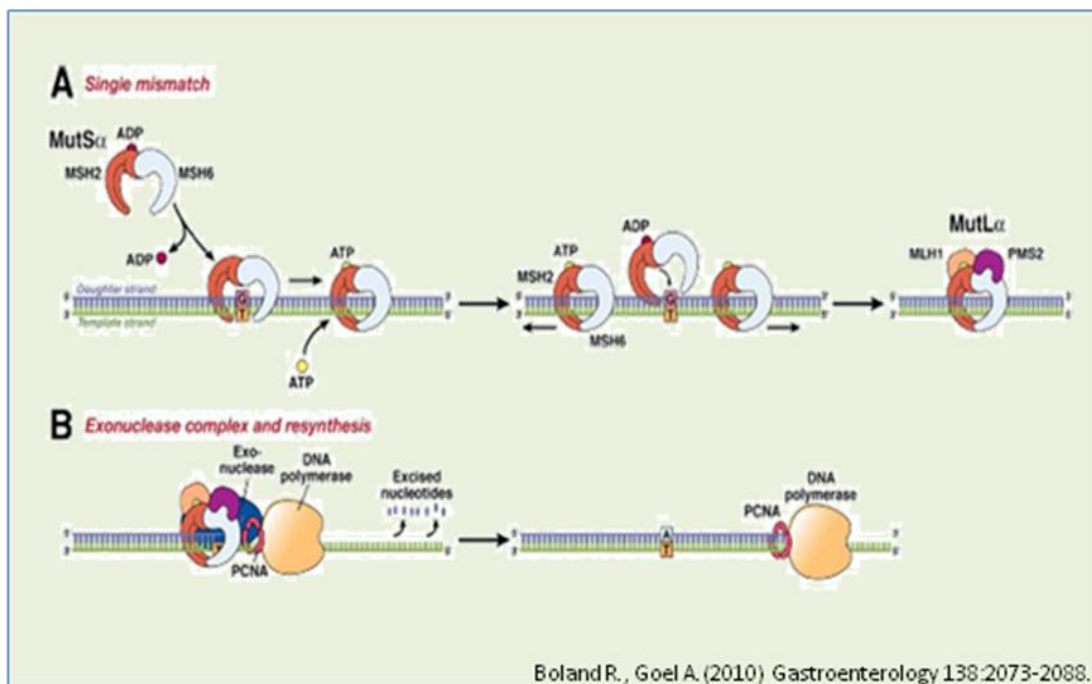


Figura 3: Sistema MMR de reparación de DNA [20]. A) El heterodímero formado por Msh2-Msh6 reconoce un despareamiento producido por un error de la DNA polimerasa y se ancla al DNA en ese punto (paso dependiente de una molécula de ATP). A este complejo anclado se le une un complejo formado por Mlh1-Pms2 con gasto de una molécula de ATP. El complejo resultante (complejo MMR) se mueve a lo largo de la cadena de DNA hasta encontrar al complejo de la DNA polimerasa. **B)** Se unen la exonucleasa 1 y PcnA. Todo este complejo elimina la hebra hija hasta el punto de despareamiento. Entonces el complejo se suelta y la polimerasa resintetiza la nueva hebra corrigiendo así el despareamiento.

Se piensa que las alteraciones del sistema MMR en los tumores MSI ocurren en una etapa temprana de la carcinogénesis, incluso antes que la alteración en la vía Wnt, de tal manera que mutaciones de la vía Wnt en este grupo de tumores serían debidas a la inestabilidad a microsatélites mostrando un patrón mutacional distinto a los tumores CIN [21].

El 15% de los CCR presentan MSI [20]. Estos tumores muestran un patrón distinto de carcinogénesis respecto a los tumores CIN observándose una mayor prevalencia de mutaciones somáticas en *TGFBR2* y *BAX*.

El 20% de los tumores MSI se deben a mutaciones germinales en los principales genes de la vía MMR como son *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* [20]. Un pequeño porcentaje de éstos se debe a epimutaciones constitucionales en los genes *MLH1* y *MSH2* [22]; lo que conduce a una hipermetilación del promotor en uno de los alelos de estos genes en tejido somático normal aumentando así la predisposición genética al cáncer. Se sabe que el silenciamiento de *MSH2* vía germinal se asocia a una deleción en el extremo 3' del gen *EPCAM (TACSTD1)* [23] pero no se conoce la causa del silenciamiento del gen *MLH1* en la línea germinal [22].

El resto de tumores MSI (80%) se deben al silenciamiento somático del gen *MLH1* por la hipermetilación del promotor debida a un fenotipo metilador [24].

1.2.2.3. Fenotipo metilador de las islas CpG: CIMP

En muchos CCR se ha observado un aumento en la metilación del genoma tumoral que se acompaña de un aumento de la metilación en tejido normal y que se asocia con la edad [24]. En este caso, la metilación en regiones promotoras provocaría el silenciamiento de los genes correspondientes pudiendo contribuir al proceso carcinogénico si se trata de oncogenes o genes supresores de tumor.

Pero en una minoría de los CCR esporádicos (aproximadamente el 25%) se observa una hipermetilación concomitante de ciertos promotores que contienen islas CpG y que no se acompaña de una mayor metilación en el tejido normal [24]. No se conocen los mecanismos que conllevan a esta hipermetilación pero se sabe que conlleva a otras formas de inestabilidad (CIMP) que pueden provocar el silenciamiento en algunos genes reparadores, como *MLH1* o *MGMT*, provocando así una inestabilidad genética.

Estos tumores siguen un patrón de carcinogénesis distinto viéndose afectados con frecuencia genes como *APC*, *MLH1*, *BRAF*, *KRAS* pero muy raramente el gen *TP53* [25].

1.2.2.4. Defectos en la vía BER

Una de las alteraciones más importantes causadas en el DNA por el daño oxidativo es la modificación de la G a 8OHdG. Esta base se aparea con la A con la misma afinidad que lo hace con la C provocando transversiones G>T [26].

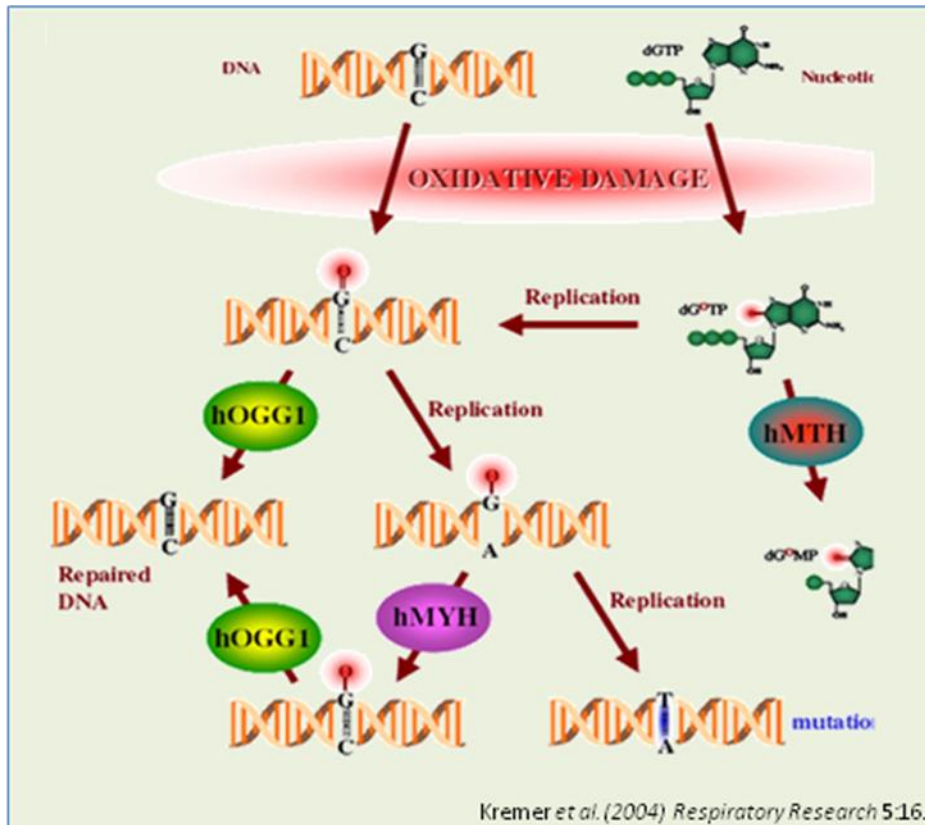


Figura 4: Sistema BER de reparación de DNA [27]. La enzima glicosilasa Ogg1 reconoce los apareamientos 8OHdG con citosina y elimina la 8OHdG. La glicosilasa Myh reconoce los apareamientos 8OHdG con adenina y elimina la adenina. La enzima reparadora hMth1 hidroliza los nucleótidos trifosfato oxidados como el 8OHdGTP eliminándolos así del pool de nucleótidos e impidiendo que se incorporen al DNA.

El sistema BER es el responsable de reconocer y reparar la 8OHdG (figura 4). Un déficit en esta vía provocaría el aumento de la tasa de mutaciones G>T y por tanto una inestabilidad genética.

Se ha visto que una pequeña proporción de tumores CCR presentan un aumento de transversiones G>T en genes implicados en la carcinogénesis

colorrectal como *APC* y *KRAS* debido a alteraciones germinales bialélicas en el gen *MUTYH* [28].

Todas estas formas de inestabilidad no son excluyentes, sino que una inestabilidad puede conducir a otra encontrándose con frecuencia tumores que presentan varias formas de inestabilidad genética (figura 5).

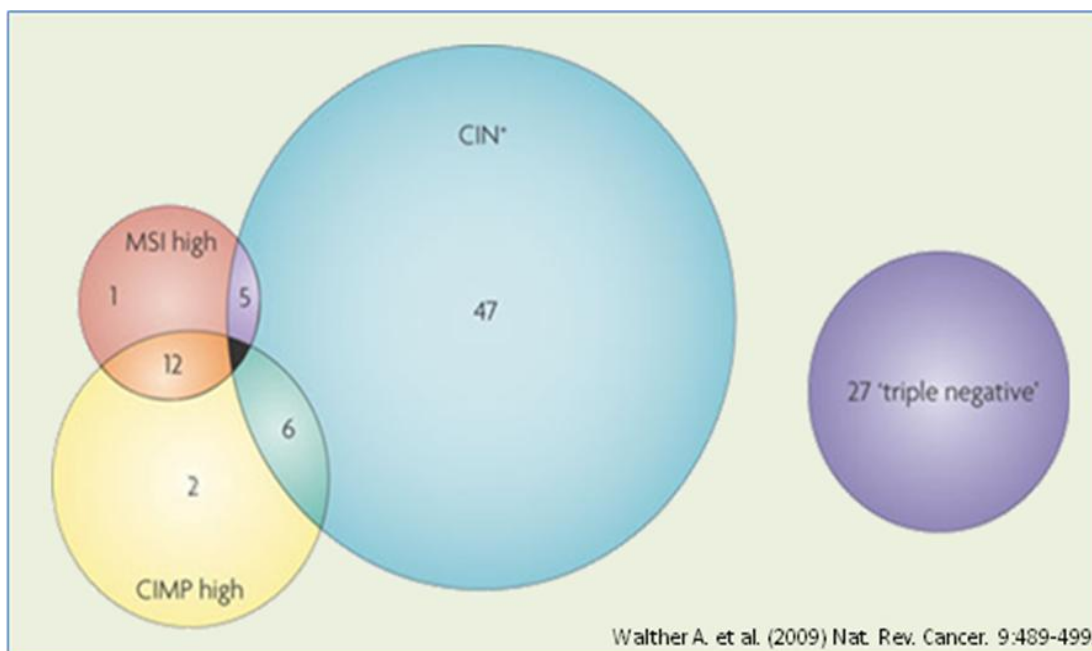


Figura 5: Diagrama de Venn para los tres principales tipos de inestabilidad genética en CCR [29]. Aproximadamente el 17% de los CCR son MSI, el 60% CIN y el 20% CIMP. Alrededor de un cuarto de los MSI son también CIN. La mayoría de los CCR CIMP son también MSI. Se han descrito casos que muestran los tres tipos de inestabilidad. El grupo de tumores que no presenta ninguno de estos tres tipos de inestabilidad estaría compuesto por CCR con inestabilidad en la vía BER (mutaciones bialélicas en *MUTYH*) y otras formas no detectadas de inestabilidad genética.

MSI: inestabilidad de microsatélites, CIMP: fenotipo metilador de islas CpG, CIN: inestabilidad cromosómica, “triple negative”: tumores en los que no se ha detectado ninguno de los tres tipos de inestabilidad anteriores. Todos los números indican porcentaje sobre el total de CCR.

1.3. Susceptibilidad genética al CCR

La penetrancia de un alelo se define como la frecuencia en la que los individuos portadores del alelo muestran el fenotipo asociado. Si la penetrancia de un alelo es completa, entonces todos los individuos portadores de ese alelo mostrarán el fenotipo. Se habla de penetrancia incompleta cuando no siempre

se expresa el fenotipo en individuos portadores, esto se puede deber bien a factores ambientales o a otros factores genéticos.

Los alelos de susceptibilidad al cáncer se pueden dividir en alelos de alta, moderada y baja penetrancia. Los alelos de alta penetrancia dan lugar a perfiles de herencia mendeliana dominantes o recesivos. Los alelos de penetrancia moderada confieren un riesgo algo menor presentando algunos portadores el fenotipo asociado y otros no, entonces nos encontraremos ante patrones de herencia no demasiado clara. Finalmente, pocos individuos portadores de alelos de baja penetrancia van a mostrar el fenotipo asociado.

Hasta ahora, los alelos de alta penetrancia identificados en CCR se han logrado detectar porque afectan a un número relativamente grande de familias que se han podido agrupar y así identificar al gen mediante estudios de ligamiento. No en todas las familias con patrón de herencia mendeliano se han identificado el/los alelos de riesgo a CCR. Posiblemente, distintos alelos raros (frecuencia alélica menor del 1%) de alta penetrancia que no se han podido identificar estén actuando en un número muy reducido de familias, de ahí su dificultad para detectarlos por estudios de ligamiento [30]. En estos casos, una aproximación mediante genes candidatos o secuenciación del exoma completo serían las estrategias más adecuadas para intentar identificar los alelos de susceptibilidad al CCR.

Familias que muestran agregación pero no de una forma mendeliana, podrían ser explicadas por alelos de moderada penetrancia y/o alelos de baja penetrancia que pueden ser identificados por estudios caso-control en alelos de genes candidatos, o bien por el análisis de muchas variantes mediante estudios pangenómicos (GWAS) [30].

Hay un modelo poligénico que explica la distribución normal de la susceptibilidad genética al cáncer en población control y población afectada mediante distintas combinaciones de alelos de alta y baja penetrancia en cada individuo [31, 32] (figura 6); dentro de la población control la mayoría de los individuos presentarían combinaciones en las que los alelos de baja penetrancia serían los mayoritarios mientras que en la población afectada la mayoría de los individuos serían portadores de combinaciones en las que los

alelos de alta penetrancia serían los mayoritarios. Los individuos con el menor riesgo serían portadores de alelos de baja penetrancia mientras que los individuos con mayor riesgo serían portadores de alelos de alta penetrancia.

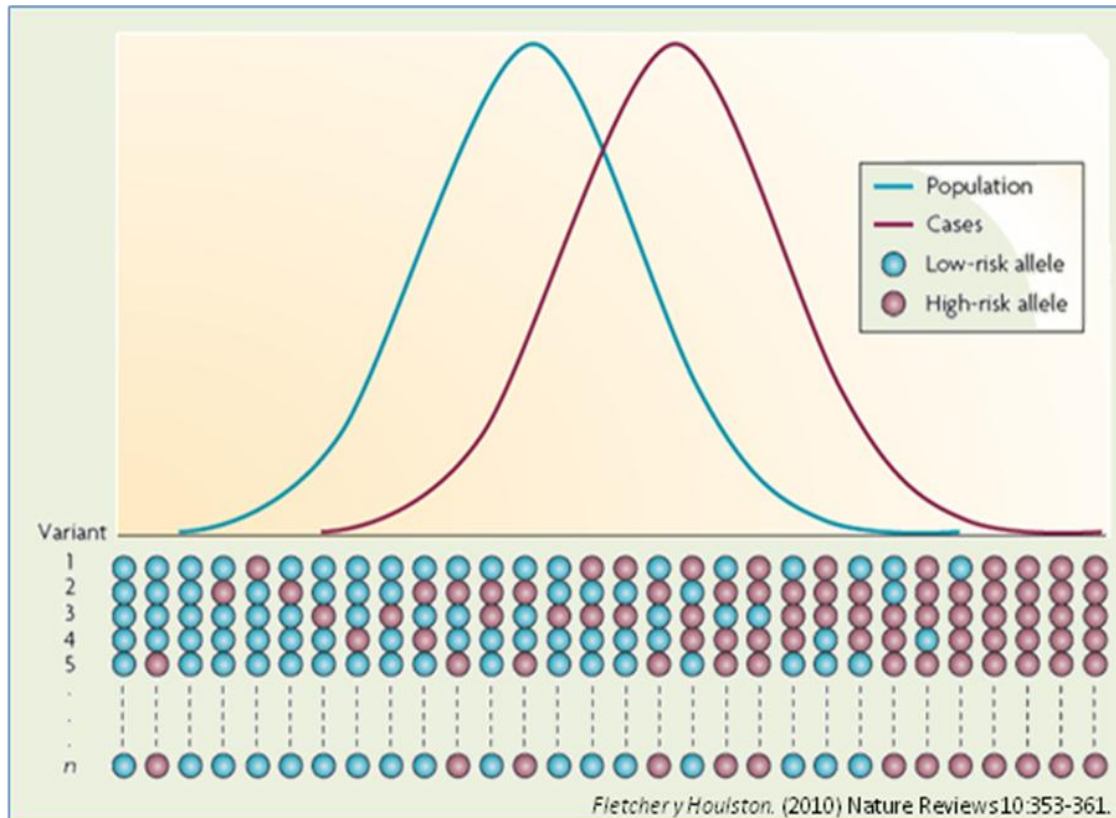


Figura 6: Modelo poligénico de susceptibilidad al cáncer [32]. La susceptibilidad genética al cáncer, tanto en población normal como en población afectada, sigue una distribución normal según la proporción de alelos de alta (morados) y baja (azules) penetrancia que presente cada individuo.

En la figura 7 se muestran los distintos alelos de alta y baja penetrancia descritos en CCR y como la interacción entre estos factores y factores ambientales da lugar a un modelo continuo de CCR.

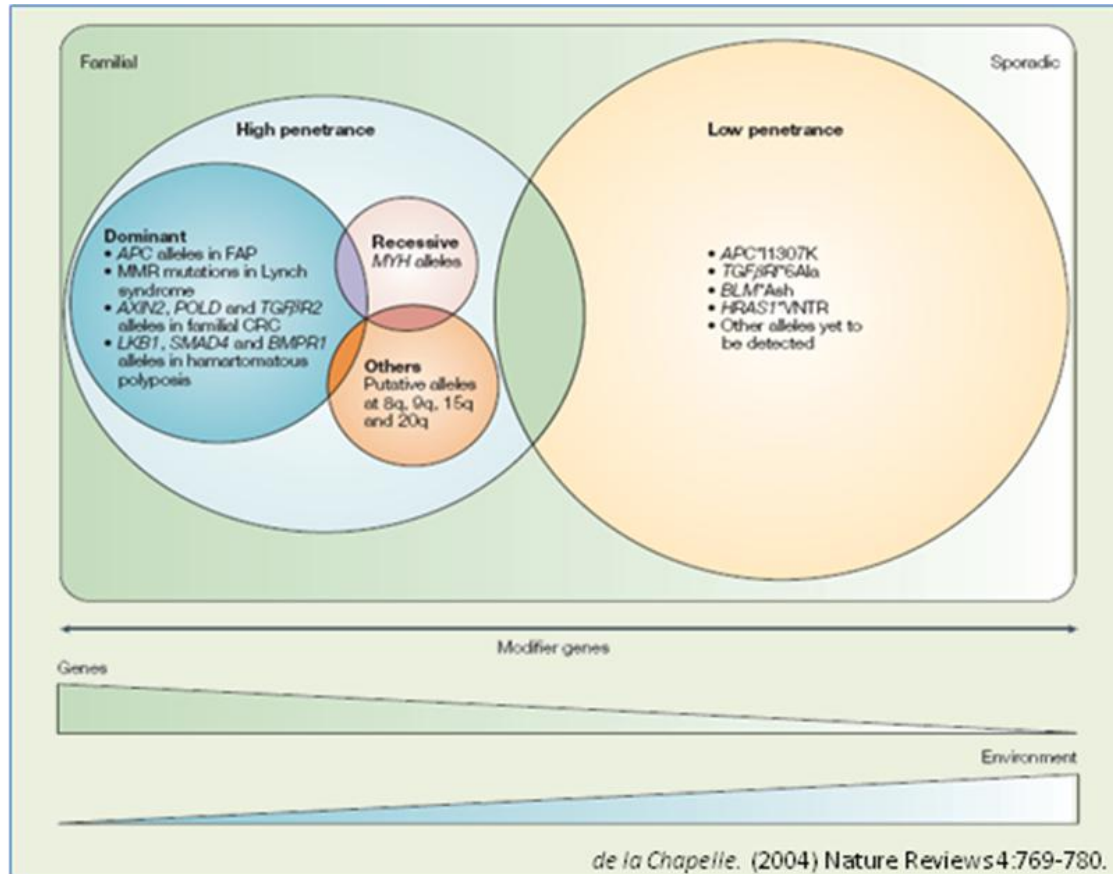


Figura 7: Contribución genética al CCR [33]. Alelos de alta penetrancia son los principales responsables de la susceptibilidad al CCR en síndromes hereditarios, en este caso los factores ambientales tienen una influencia pequeña sobre el riesgo a desarrollar CCR. Sin embargo, alelos de baja penetrancia contribuyen a la susceptibilidad al CCR de una manera aditiva interactuando con otros alelos y con factores ambientales en CCR esporádico.

1.4. Clasificación del CCR

Tradicionalmente el CCR se ha dividido en CCR esporádico y CCR familiar. Se considera cáncer esporádico cuando se presenta en pacientes sin ninguna historia familiar de CCR y seguramente sean los factores ambientales junto con alelos de baja penetrancia los que jueguen un papel fundamental. Tampoco se pueden descartar en este grupo casos hereditarios que no se detecten debido a una falta de información [33]. Dentro del CCR esporádico se engloban los dos grandes grupos de tumores que presentan CIN y tumores que presentan CIMP, representando estos últimos aproximadamente el 25% de los casos de CCR esporádicos [24].

El CCR familiar lo podemos subdividir en varios subgrupos. Primero estaría el cáncer familiar hereditario que implicaría mutaciones genéticas o epimutaciones de alta penetrancia y que engloba aproximadamente al 3-5% de los todos los casos de CCR [34]. El resto serían casos de agregación familiar que serían debidos bien a alelos de moderada-baja penetrancia y/o a factores ambientales comunes que estén actuando en la familia. Tampoco se pueden descartar casos de agregación familiar debidos al azar.

En la figura 8 se muestra la frecuencia relativa de los distintos tipos de CCR.

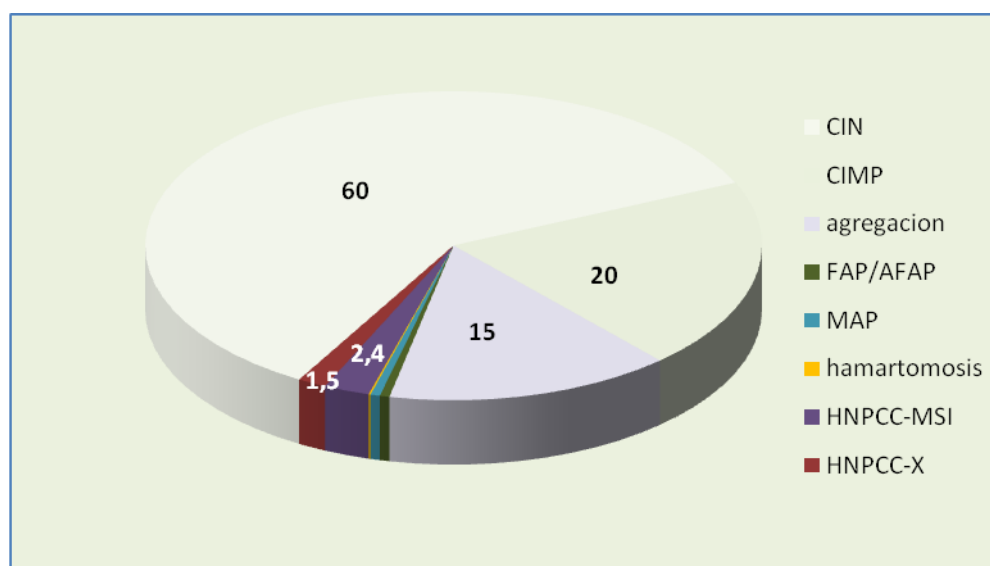


Figura 8: Tipos de CCR. Los números indican el porcentaje relativo a los casos totales de CCR.

1.4.1. Cáncer colorrectal hereditario

Se debe a mutaciones en genes que van a conferir un riesgo alto de padecer CCR en comparación con la población normal, es decir; muestran una alta penetrancia. Los genes afectados se comportan como genes supresores de tumor y la mutación se presenta en heterocigosis en vía germinal. El aumento del riesgo radica en que tan solo se necesita un evento mutacional en el alelo no portador para que se inactive el gen desencadenando el proceso carcinogénico según el modelo de Knudson [35] (figura 9).

Los alelos de alta penetrancia en CCR son muy poco frecuentes explicando tan solo el 5% o menos de todos los casos de CCR [7].

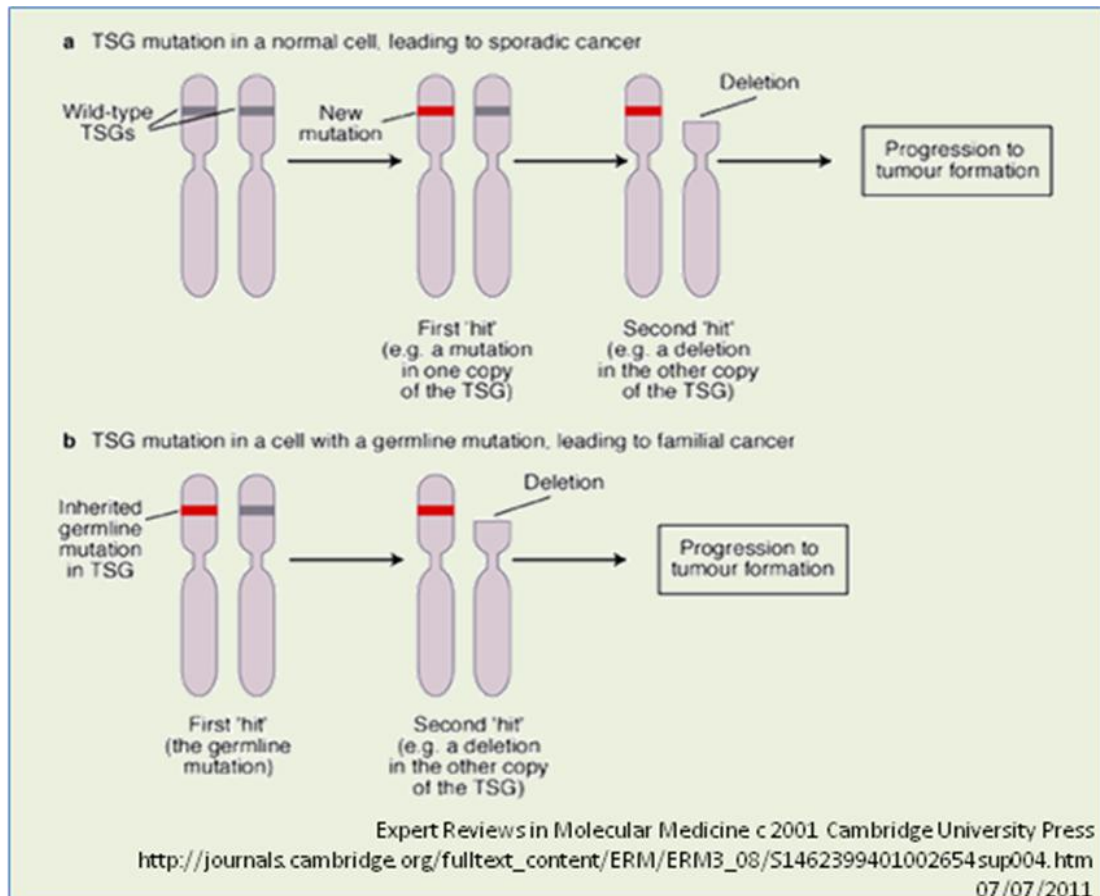


Figura 9: Hipotesis de Knudson [35]. Para que un TSG desencadene un proceso carcinogénico es necesario que se inactiven sus dos alelos a nivel somático mediante dos eventos independientes. Estos eventos pueden ser mutaciones genéticas, silenciamiento epigenético o LOH. **a)** Individuos con dos alelos normales para el gen supresor necesitan dos eventos independientes para inactivarse. **b)** Individuos con una mutación germinal en uno de los alelos solo necesitarán solo un evento para inactivarse.

Dentro del CCR hereditario podemos distinguir entre CCR hereditario polipósico, no polipósico (HNPCC) y poliposis hamartomosa según el cuadro clínico de poliposis intestinal que presenten los pacientes afectados.

1.4.1.1. CCR hereditario polipósico

1.4.1.1.1. Poliposis adenomatosa familiar: FAP

Síndrome autosómico dominante que engloba aproximadamente el 0,5% de todos los CCR [7].

La FAP es debida a mutaciones en vía germinal del gen *APC*. Como se explica en un capítulo anterior, *APC* es clave en la iniciación del proceso

carcinogénico y su inactivación conduce al desarrollo de adenomas tempranos [6].

En rasgos generales se caracteriza por presentar de cientos a miles de pólipos adenomatosos intestinales que aparecen a lo largo de la tercera o cuarta década de vida. El riesgo acumulado a desarrollar CCR a los 50 años es del 95% y presenta una penetrancia completa mostrando una edad media de diagnóstico de CCR de 39 años [36].

La gravedad de la poliposis se asocia a la localización de la mutación. Las mutaciones en el codón 1309 son las más agresivas desencadenándose una poliposis del orden de varios miles de pólipos durante la segunda década de vida y adelantándose la edad de aparición del CCR [37]. Mutaciones que se sitúan en el extremo 3' o 5' del gen producen un cuadro clínico mucho más atenuado con poliposis del orden de aproximadamente 100 pólipos y una edad de aparición del CCR retrasada 15 años respecto a la FAP clásica. A esta variante se la denomina Poliposis Familiar Atenuada (AFAP) [37].

Otras variantes clínicas que se pueden presentar son el Síndrome de Gardner en el que también se manifiestan osteomas, tumores de tiroides y de tejidos blandos y el Síndrome de Turcot que también se acompaña de tumores en el Sistema Nervioso Central [38].

1.4.1.1.2. Poliposis asociada a *MUTYH*: MAP

Síndrome autosómico recesivo que explica alrededor de 0,5% de los casos de CCR [39].

La MAP es debida a mutaciones bialélicas en línea germinal en el gen *MUTYH* implicado en la reparación de nucleósidos modificados por el daño oxidativo (8OHdG principalmente). Su déficit implicaría un aumento en la tasa de transversiones G>T pudiendo afectar a genes clave en el proceso de carcinogénesis como son *APC* y *KRAS* [28].

Dos mutaciones con cambio de sentido son las más prevalentes (G396C y Y179C) constituyendo más del 70% de todas las mutaciones descritas en *MUTYH* y asociadas a CCR [40]. Estas mutaciones provocan distintos efectos en la estabilización, localización y función de la proteína lo que aumenta la tasa de transversiones y por consiguiente la probabilidad de mutación en oncogenes o genes supresores de tumor (ver figura 4).

La manifestación clínica es muy parecida a la AFAP presentando, en la mayoría de los casos entre 10-100 pólipos adenomatosos y una penetrancia del 100%. Se ha visto que la edad de aparición de la poliposis es más tardía que en la AFAP (tercera o cuarta década) [40, 41].

1.4.1.2. CCR hereditario no polipósico: HNPCC

1.4.1.2.1. Síndrome de Lynch (HNPCC-MSI)

Es el síndrome más frecuente en CCR hereditario y representa aproximadamente el 3% de todos los CCR [42].

Características clínico-patológicas:

Las principales características clínico-patológicas del síndrome de Lynch son [42]:

- . Patrón de herencia autosómica dominante asociada a mutaciones en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2*.
- . Riesgo aumentado de CCR (riesgo acumulado del 80% a los 70 años) y edad media de diagnóstico de CCR adelantada con respecto a la población normal (45 años frente a 65 años en población normal).
- . Los tumores se localizan en el colon proximal (ascendente y transversal) en el 70% de los casos.
- . Hay un aumento de casos de tumores sincrónicos y metacrónicos con respecto a la población normal.
- . Aumento del riesgo de ciertos tumores extracolónicos. Principalmente cáncer de endometrio (60%) y en menor medida otros como cáncer de ovario (15%), estómago, intestino delgado, tracto hepatobiliar, páncreas, uréter, pelvis renal y Sistema Nervioso Central.
- . Mejor pronóstico que el CCR esporádico cuando se compara según edad y estadio del tumor.

- . Carcinogénesis acelerada con respecto al CCR esporádico. La transformación del adenoma a carcinoma ocurre en 2-3 años mientras que en CCR esporádico se necesitan 8-10 años.
- . Los tumores suelen presentar una histología poco diferenciada, con exceso de moco, células en anillo de sello, infiltración linfocítica, genomas diploides y MSI.

Alteraciones genéticas germinales:

Mutaciones en los genes implicados en la vía MMR (ver figura 4) son las causantes del Síndrome de Lynch. Aproximadamente el 90% de las mutaciones descritas se localizan en los genes *MLH1* y *MSH2* y el resto se sitúan mayoritariamente en *MSH6* [43].

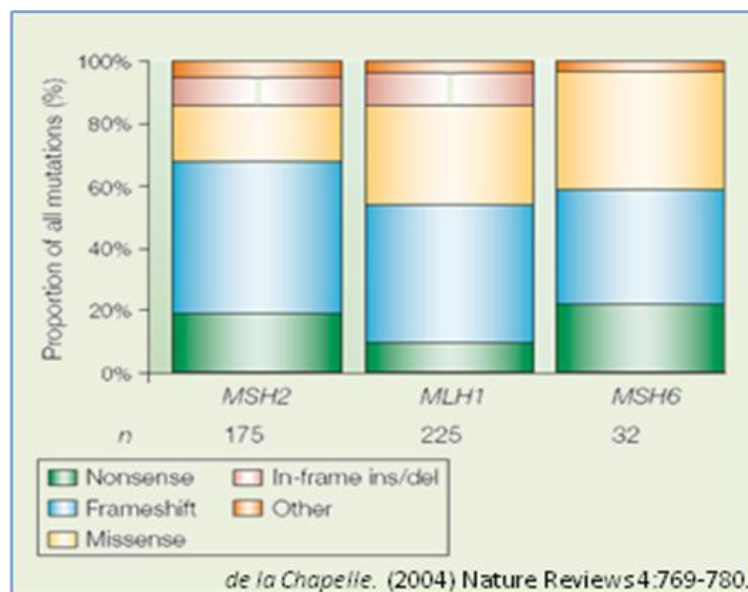


Figura 10: Distribución del tipo de mutaciones en los genes MMR en el Síndrome de Lynch [33].

La mayoría de las mutaciones encontradas en los genes MMR son mutaciones sin sentido (cambio de aminoácido) o que conllevan a un cambio en la pauta de lectura (pequeñas inserciones o deleciones) (figura 10). Los grandes reordenamientos son menos frecuentes representando el 10-20% de las mutaciones descritas en *MSH2* y mucho menos en *MLH1* [33].

Según sea el gen afectado se pueden apreciar ligeras diferencias respecto al fenotipo familiar [43]. En general, mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2* provocan el típico cuadro de Lynch con un riesgo acumulado en torno al 80% de padecer CCR a los 70 años y una edad media de diagnóstico de cáncer de aproximadamente 45 años [43]. Las mutaciones en *MLH1* se asocian más con CCR de tal manera que la mayoría de estas familias cumplen los criterios estrictos Amsterdam I (ver más adelante) y las familias con mutación en *MSH2* suelen presentar más variedad de tumores extracolónicos [44]. Familias con mutaciones en *MSH2* suelen presentar con mayor frecuencia el Síndrome de Muir-Torre [45]; variante que además de los tumores asociados al Síndrome de Lynch también presenta un riesgo aumentado a desarrollar tumores sebáceos y querocantomas.

Las mutaciones en *MSH6* suelen ser más benignas; presentando una edad media de diagnóstico de cáncer mayor que las familias con mutación en *MLH1* o *MSH2*. Una característica de estas familias es que las mujeres presentan un menor riesgo de CCR que las familias *MLH1* o *MSH2* pero un mayor riesgo de cáncer de endometrio (70% a los 70 años) con una edad media de diagnóstico disminuida [46].

Mutaciones en *PMS2* dan lugar a fenotipos atenuados con historias familiares menos marcadas y edades medias de diagnóstico algo más tardías [47].

Diagnóstico clínico-molecular:

Es beneficioso detectar familias con Síndrome de Lynch y encontrar las mutaciones que lo causan no solo para conocer mejor la enfermedad sino para detectar pacientes portadores y por lo tanto de alto riesgo y discriminar aquellos que no lo sean dentro de una familia. Esto va a permitir dirigir los programas de seguimiento y control de una manera individualizada y más eficiente.

El diagnóstico del Síndrome de Lynch lo determina el hallazgo de una mutación germinal en uno de los cuatro genes implicados.

Teniendo en cuenta que el Síndrome de Lynch explica tan solo el 3% de todos lo CCR, es necesario realizar una selección de familias candidatas al estudio genético de los genes MMR.

Hoy en día se realizan tres preselecciones con el fin de aumentar el valor predictivo positivo a la hora de realizar los estudios genéticos.

- 1.- Análisis de la historia familiar y criterios clínicos de selección de familias.
- 2.- Estudio de la inestabilidad de microsatélites.
- 3.- Análisis por inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas MMR.

- 1.- Análisis de la historia familias y Criterios clínico de selección de familias.

Para intentar consensuar criterios a la hora de seleccionar este tipo de familias y así poder realizar estudios comparativos entre centros distintos, en 1991 se crearon los criterios clínicos Amsterdam I [48] (tabla 2). Estos criterios fueron bien aceptados por la comunidad científica pero dejaban fuera muchas familias con Síndrome de Lynch por no incluir las manifestaciones extracolónicas. En 1999 se revisaron los criterios incluyendo los cánceres asociados y se denominaron criterios Amsterdam II [49] (tabla 2).

Por otro lado en 1997, con el objetivo de crear unos criterios que fuesen capaces de detectar todas las familias potencialmente portadoras de Lynch, y que por lo tanto fuesen candidatas al estudio de inestabilidad, se crearon unos criterios clínicamente menos estrictos que los criterios Amsterdam y que además incluyesen las características moleculares de este tipo de tumores. Estos son los criterios de Bethesda [50] que se revisaron en 2004 [51] (tabla 2).

Como métodos de selección para detectar posibles familias Lynch, los criterios de Bethesda tienen una sensibilidad mucho más elevada que los criterios Amsterdam II (90% frente al 40% en Amsterdam II) aunque sin embargo, estos últimos muestren un valor predictivo positivo mayor (50% frente al 10-20% en Bethesda) [52]. Esto hace que los criterios de Bethesda sean más adecuados como método de selección en consultas de consejo genético para un posterior análisis de inestabilidad a microsatélites. Y en cambio, los criterios Amsterdam II son más adecuados para realizar estudios comparativos.

Tabla 2: Criterios cénicos de selección de familias HNPCC.

CRITERIOS AMSTERDAM I [48]
✓ Al menos 3 familiares afectados de CCR
✓ Al menos dos generaciones consecutivas afectadas
✓ Uno de los familiares en primer grado de los otros dos
✓ Al menos uno de los CCR diagnosticado antes de los 50 años
✓ Poliposis adenomatosa familiar descartada
CRITERIOS AMSTERDAM II [49]
✓ Al menos 3 familiares afectados de CCR u otro tumor extracolónico asociado*
✓ Al menos dos generaciones consecutivas afectadas
✓ Uno de los familiares en primer grado de los otros dos
✓ Al menos uno de los tumores diagnosticado antes de los 50 años
✓ Poliposis adenomatosa familiar descartada
*tumor asociado=endometrio, intestino delgado, uréter y pelvis renal
CRITERIOS REVISADOS DE BETHESDA [51]
✓ Cumplir al menos uno de los siguientes criterios:
▪ CCR diagnosticado antes de los 50 años
▪ Presencia de tumores sincrónicos o metacrónicos, colorrectales o relacionados**, independientemente de la edad de diagnóstico
▪ CCR con histología MSI-H*** diagnosticado antes de los 60 años
▪ Paciente con CCR y un familiar en primer grado con CCR o tumor relacionado** con alguno de los dos tumores diagnosticado antes de los 50 años
▪ Paciente con CCR y dos o mas familiares en primer o segundo grado con CCR o tumores relacionados**, independientemente de la edad de diagnóstico
**tumor relacionado=endometrio, estómago, ovario, páncreas, uréter, pelvis renal, tracto biliar, cerebro, intestino delgado, glándulas sebáceas y querocantomas
***Histología poco diferenciada, con exceso de moco, células en anillo de sello, infiltración linfocitaria, patrón de crecimiento medular

En la consulta de Consejo Genético del Hospital Clínico San Carlos, se seleccionan las familias que cumplen criterios de Bethesda para llevar a cabo el estudio de inestabilidad e inmunohistoquímica. Según el resultado de estos dos estudios, se decide si llevar a cabo el estudio genético de los genes MMR y qué gen estudiar. Si se observa el número inicial de pacientes que acuden a la consulta y los que se les diagnostica finalmente de Síndrome de Lynch, vemos que cuanto más estricto sea el criterio de selección mayor va a ser el porcentaje de familias con síndrome de Lynch detectado aunque menor va a ser la sensibilidad (figura 11).

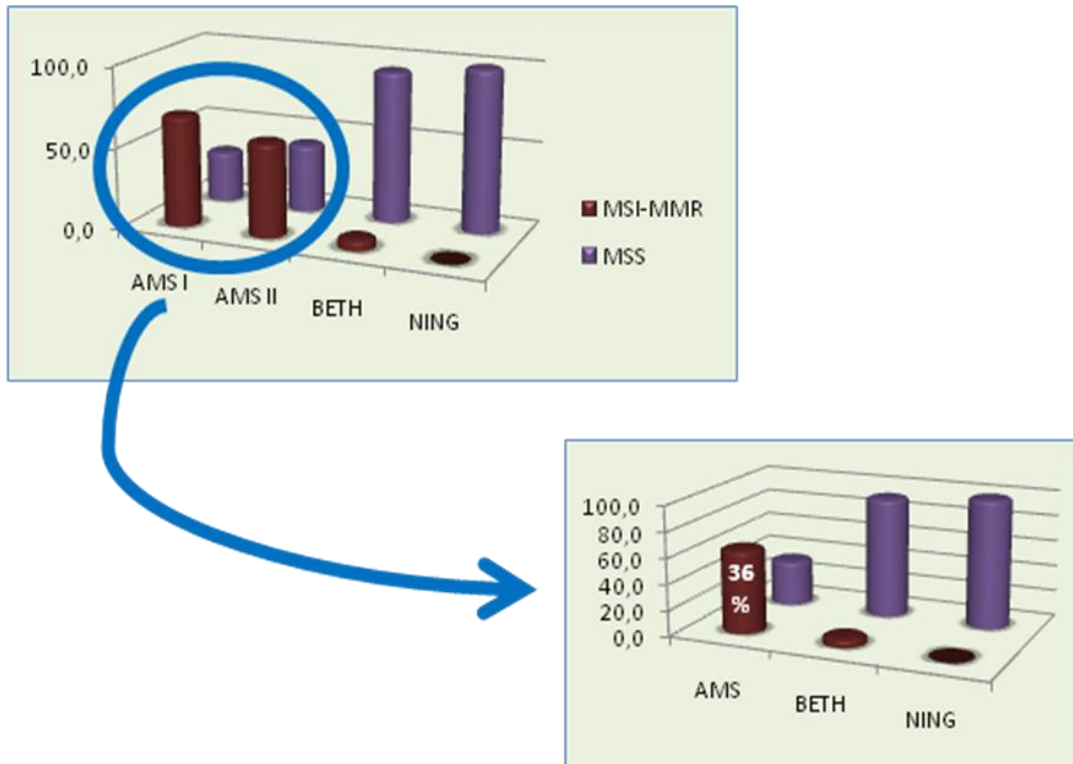


Figura 11: Valor predictivo positivo y sensibilidad de los distintos criterios de selección. Datos recogidos de la consulta de Consejo Genético del Servicio de Oncología del Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

2.- Estudio de inestabilidad a microsatélites.

El estudio de inestabilidad consiste en analizar la longitud de ciertos microsatélites, que sean dianas de inestabilidad conocidas, en DNA tumoral y DNA germinal para detectar la presencia de alelos alterados en el DNA tumoral con respecto al DNA germinal. Se ha establecido un panel de cinco microsatélites distintos (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 y D17S250) que es recomendable analizar para establecer si un tumor presenta o no inestabilidad a microsatélites [53]. Un tumor podrá presentar una inestabilidad alta a microsatélites (MSI-H), inestabilidad baja (MSI-L) o no presentará inestabilidad (MSS) dependiendo del número de microsatélites alterados que presente. Los tumores MSS no muestran ninguno alterado mientras que los MSI-H muestran al menos dos microsatélites alterados de los cinco microsatélites propuestos por Boland [53]. Los tumores MSI-H son los tumores asociados al Síndrome de Lynch y candidatos para su estudio genético.

3.- Análisis por inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas MMR.

Los criterios de Bethesda [51] son muy poco restrictivos, y el análisis de microsatélites, aunque tenga una elevada sensibilidad para detectar Síndrome de Lynch, no es muy específico ya que la inestabilidad a microsatélites también puede deberse a otras causas distintas como la metilación del promotor *MLH1* [54]. Además, se han visto que las familias con mutación en el gen *MSH6* presentan tumores MSI-L (solo un microsatélite alterado) en una proporción nada despreciable (25%) [46] lo que hace que en estos casos el análisis de inestabilidad pierda sensibilidad. Por estas razones, el análisis por inmunohistoquímica de la expresión de cada una de las proteínas codificadas por los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* en tejido tumoral es una prueba complementaria que aumenta mucho la especificidad en cuanto a la selección de familias candidatas a padecer Síndrome de Lynch [55, 56]. Una mutación en cualquiera de estos 4 genes provoca la inactivación del gen y la pérdida de expresión de la proteína correspondiente orientando de esta manera el estudio genético que determinará, en última instancia, el diagnóstico de Lynch.

Estas tres pruebas son complementarias y la realización de todas ellas contribuye a aumentar mucho el valor predictivo positivo del estudio genético.

Alteraciones genéticas somáticas:

A consecuencia de la disfunción en la vía de reparación MMR algunos genes que contienen secuencias microsatélites van estar alterados con más frecuencia en este tipo de tumores. Al final, las vías alteradas serían las mismas pero los genes alterados no.

En la vía Wnt, vía iniciadora del proceso carcinogénico, se observan mutaciones en *APC* en la mayoría de los tumores esporádicos estables, mientras que en los tumores MSI nos encontramos con el 20-50% de mutaciones en *APC* y no es raro observar mutaciones en los genes *CTNNB1*, *AXINA1* o *AXINA2* [57].

En la vía TGF β se observa una frecuente pérdida de *SMAD2*, *3* y *4* en CCR esporádico MSS mientras que en los tumores MSI se observa con frecuencia

alteraciones en el gen *TGF β 2R*. Como mecanismo de evasión de la apoptosis, en la gran mayoría de los tumores esporádicos MSS se observa una pérdida del gen *PT53* mientras que en los MSI se observan más alteraciones en el gen antiapoptótico *BAX* [19].

1.4.1.2.2. Cáncer colorrectal familiar tipo X: HNPCC-X ó FCC-X

El valor predictivo positivo de los criterios clínicos de selección Amsterdam I y II no es total y aproximadamente la mitad de las familias que cumplen estos criterios estrictos no presentan alteración en los genes de la vía MMR ni inestabilidad a microsatélites (HNPCC-X) [52].

Este grupo de familias es un problema importante en las consultas de consejo genético. Son familias con un riesgo aumentado de padecer CCR pero no se conocen los factores de riesgo, por lo que no se pueden discriminar entre individuos de alto y bajo riesgo.

En la consulta de consejo genético del Servicio de Oncología del Hospital Clínico San Carlos, el 35,5% de las familias que cumplen los criterios estrictos Amsterdam I/II no presentan inestabilidad de microsatélites ni alteraciones en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2* (ver figura 11). Es importante el estudio de estas familias para entender los mecanismos subyacentes de su carcinogénesis colorrectal y poder ofrecer nuevas dianas terapéuticas potenciales. Así mismo, la búsqueda de genes de susceptibilidad al cáncer en estas familias permitiría la identificación de individuos de alto riesgo que se beneficiarían de un seguimiento más exhaustivo o de la toma de medidas profilácticas.

En el año 2005 se describió la incidencia de cáncer en este tipo de familias [58]. Lindor y colaboradores observaron que familias Amsterdam I sin alteración en la vía MMR presentan una incidencia moderadamente aumentada para CCR pero no para otro tipo de tumores extracolónicos, y que además, la edad media de aparición de CCR en estas familias (61 años) es considerablemente mayor que en las familias Lynch (HNPCC-MSI) (49 años). Lindor y colaboradores sugirieron que estas familias HNPCC sin alteración en la vía MMR estarían formadas por un grupo heterogéneo de familias con agregación de tumores debida al azar en algunos casos, estilos

de vida compartidos en otros, factores genéticos desconocidos o por combinaciones de estos tres factores. Sugirieron también el término “cáncer colorrectal familiar tipo X” (FCC-X o HNPCC-X) para diferenciar a estas familias de las familias HNPCC-MSI con alteración genética detectada en alguno de los genes de la vía MMR (Síndrome de Lynch).

A partir de aquí varios estudios clinicopatológicos se han llevado a cabo en tumores HNPCC-X observándose siempre una edad de aparición del CCR más tardía que las familias HNPCC-MSI, localización del tumor preferentemente distal (colon izquierdo), baja proporción de tumores mucinosos y ausencia de infiltrado linfocitario [59-62]. Los resultados de estos estudios se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Características clinicopatológicas de familias HNPCC que no muestran alteración en la vía MMR.

AUTORES	C.C.	F.HNPCC (%)	EDAD Dx	CCR (%)	T.HNPCC (%)	L.D. (%)	MUC. (%)	IL. (%)
Lindor [58]	X	44	60,7	43	12,5			
Mueller-Koch [59]	X	40	55	78,8	9,1	79		
Llor [60]	X	60	60,2		sí	86,7	14,13	0
Valle [61]	X	40,6	53	45,8	16,6	79,2	12,5	
Abdel-Rahman [62]	MS		53,7					
Sánchez de Abajo [63]	MS		52			61,4		
Goel [64]	X	51	57			80		

C.C.: criterios de selección de familias, X: criterios Amsterdam I/II, MSS: criterios Amsterdam I/II y Bethesda, F.HNPCC: porcentaje del total de familias HNPCC, EDAD Dx: edad media de diagnóstico de CCR, CCR: riesgo de CCR, T.HNPCC: riesgo de cualquier otro tumor asociado a HNPCC, L.D.: localización distal, MUC.: tumores mucinosos, IL.: infiltración linfocítica

A nivel molecular, hay dos estudios publicados que analizan los cambios somáticos en tumores HNPCC (según criterios Amsterdam o Bethesda) sin alteración en la vía MMR (designadas en esta tesis como HNPCC-MSS, para distinguirlas de las familias HNPCC-X, ya que no todas cumplen criterios Amsterdam I o II) [62, 63]. Ambos autores observan un porcentaje bajo (39% Abdel-Rahman y 36% Sánchez de Abajo) de tumores HNPCC-MSS con β -catenina expresada en el núcleo indicando una baja activación de la vía Wnt. En cuanto a la tasa de mutaciones somáticas en *KRAS* los dos estudios difieren (17% Abdel-Rahman y 40,3% Sánchez de Abajo) pero ambos detectan un porcentaje muy bajo de mutaciones en el gen *BRAF* (4 y 3,5%

respectivamente). Abdel-Rahman y colaboradores observan además una mayor proporción de tumores con el gen *PT53* alterado en relación a los HNPCC-MSI y un porcentaje alto de tumores que presentan inestabilidad cromosómica (CIN) (44%).

Más recientemente se han hecho estudios de metilación en tumores HNPCC-X estrictos encontrando una mayor proporción de tumores que presentan hipometilación global en comparación con tumores Lynch o esporádicos [64].

Los datos de estos trabajos se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Características moleculares de familias HNPCC que no muestran alteración en la vía MMR.

AUTORES	CRIT.	β cat. (%)	p53	KRAS (%)	BRAF (%)	CIN+ (%)	MET. (%)
Abdel-Rahman [62]	MSS	39	44	17	4	44	
Sánchez de Abajo [63]	MSS	36,4		40,3	3,5		
Goel [64]	X			31,8	0		100

CRIT: criterios de selección de familias, X: criterios Amsterdam I/II, MSS: criterios Amsterdam I/II y Bethesda, β cat.: expresión nuclear de β -catenina, p53: expresión positiva de p53, KRAS: mutación somática en *KRAS*, CIN+: inestabilidad cromosómica, MET.: hipometilación global

Tanto las diferencias clinicopatológicas como las diferencias moleculares encontradas en estos tumores permiten clasificarlos como una entidad distinta dentro de las rutas carcinogénicas descritas hasta ahora sugiriendo que nuevas formas de inestabilidad genómica puedan estar actuando en este grupo de familias.

1.4.1.3. Poliposis hamartomosa

Son síndromes muy poco frecuentes que se caracterizan por presentar un número elevado de pólipos hamartomosos en el intestino. Estos pólipos son benignos pero se ha visto que alguno de estos síndromes se acompaña también de un riesgo aumentado a padecer CCR. En su conjunto, estos síndromes explicarían menos del 0,1% de los CCR.

1.4.1.3.1. Síndrome de Peutz-Jeghers: SPJ

Síndrome autosómico dominante que se caracteriza por la presencia de múltiples pólipos hamartomosos a lo largo de todo el tracto gastrointestinal que suelen producir obstrucción intestinal y sangrado a partir de la primera década de vida. Se acompaña de pigmentación mucocutánea y un riesgo elevado a padecer cánceres gastrointestinales y también otros extracolónicos como cáncer de mama o de páncreas [36]. Concretamente se estima un riesgo del 39% de sufrir CCR a los 65 años de edad [65].

La mayoría de los casos se asocia a una mutación en el gen supresor de tumor *STK11* (*LKB1*) que codifica para una proteína implicada principalmente en la regulación de la polaridad celular y también en la regulación del ciclo celular y de la vía Wnt [65].

1.4.1.3.2. Síndrome de Poliposis Juvenil: SJP

Síndrome autosómico dominante que se caracteriza por presentar múltiples pólipos hamartomosos en el tracto gastrointestinal normalmente diagnosticados antes de la adolescencia. Presenta un riesgo del 39% de sufrir CCR a lo largo de su vida y riesgos algo menores de sufrir cualquier otro tipo de cáncer gastrointestinal [66].

Se asocia mutaciones en los genes *SMAD4*, *BMPR1A* y *ENG*; los tres son genes supresores de tumor implicados en la ruta de TGF β implicada en la carcinogénesis colorrectal [67].

1.4.1.3.3. Síndrome de Cowden

Síndrome autosómico dominante caracterizado por la presencia de múltiples pólipos hamartomosos en distintos tejidos como mama, tiroides, piel, Sistema Nervioso Central y tracto gastrointestinal. Se acompaña de un riesgo elevado de padecer distintos tipos de cáncer, sobre todo cáncer de mama, tiroides y endometrio [68]. Si existe un riesgo aumentado a padecer CCR no está claro.

En el 80% de los casos se asocia a mutaciones en el gen *PTEN*; gen supresor de tumor que actúa regulando negativamente la ruta PI3K implicada en la carcinogénesis colorrectal [68].

2. DAÑO OXIDATIVO

Se define como ROS a un grupo de moléculas derivadas del oxígeno (peróxidos y radicales libres) que son altamente reactivas pudiendo oxidar a biomoléculas. Los ROS se generan constantemente en la célula como subproductos del metabolismo aeróbico pero también pueden tener un origen exógeno a consecuencia de la exposición a radiaciones ionizantes, drogas u otros agentes oxidantes [69].

La primera línea de defensa contra el ataque de ROS son los antioxidantes, que transforman a los ROS en especies menos reactivas. Cuando aumenta el cociente entre ROS y moléculas antioxidantes se habla de un estrés oxidativo y entonces el daño de biomoléculas puede ocurrir.

El daño oxidativo puede afectar a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Pero quizá el daño más importante sea en el DNA ya que a diferencia de las proteínas, lípidos y RNA, el DNA no se renueva y su daño puede ser deletéreo o propagarse tras la división celular a no ser que sea reparado [70].

Dentro del daño producido en el DNA, existen distintos de tipos de cambios químicos (oxidación de bases, generación de sitios abásicos y roturas de cadena sencilla) que pueden dar lugar a una inestabilidad genómica conduciendo bien a una muerte celular programada o a procesos carcinogénicos [69, 71].

Uno de los daños más importantes en el DNA debido a la oxidación por ROS es la modificación de la guanina a 8OHdG, ya que es el producto más abundante y estable [72].

La 8OHdG se genera tanto en el DNA como en el pool de nucleótidos celular. Su poder mutagénico radica en su capacidad para aparearse tanto con la adenina como con la citosina durante el proceso de replicación del DNA, de tal manera que conduce a un incremento en la tasa de transversiones G>T [26]. Aumentos de los niveles de 8OHdG se han observado en diversos tipos de cáncer [73] y particularmente en cáncer colorrectal [74, 75].

En la célula existen distintos mecanismos que van a combatir el daño oxidativo una vez producido [76]:

- 1.- Arresto del ciclo celular para dar tiempo a la reparación del daño antes de comenzar su siguiente ciclo de replicación y división celular.
- 2.- Reparación del daño mediante vías reparadoras.
- 3.- Si el daño del DNA es muy grande se ponen en marcha mecanismos de apoptosis.

2.1. Vías de reparación BER

La vía BER es la encargada de reparar las bases oxidadas en el DNA. Esta vía de reparación es iniciada por distintas DNA glicosilasas substrato específicas que reconocen la base dañada y la eliminan del DNA mediante la hidrolisis del enlace N-glicosílico que une la base al azúcar fosfato. Se genera así un sitio abásico que posteriormente es rellenado por una polimerasa y una ligasa mediante dos estrategias distintas; una ruta corta en la que solamente el sitio abásico es resintetizado mediante la polimerasa β (producto del gen *POLB*) y la DNA ligasa III (producto del gen *LIG3*) asociadas al producto del gen *XRCC1* y una ruta larga en la que varios nucleótidos vecinos son también resintetizados por medio de varias DNA polimerasas dependientes de los productos de los genes *PCNA*, *FEN1* y la *LIG1* [77, 78] (figura 12).

Dos DNA-glicosilasas distintas son las encargadas de reparar específicamente la 8OHdG incorporada en el DNA:

Ogg1 (gen *OGG1*) es una DNA-glicosilasa bifuncional (con actividad glicosilasa-liasa) que reconoce e hidroliza específicamente la 8OHdG cuando se encuentra emparejada con C generando un sitio abásico que posteriormente corta gracias a su actividad liasa [79].

MutY (*MUTYH*) es una DNA-glicosilasa monofuncional que reconoce e hidroliza específicamente la A emparejada con 8OHdG generando un sitio abásico [80].

Se ha visto que los sitios abásicos generados por Ogg1 siguen una ruta corta de resíntesis dependiente de Xrcc1 mientras que aquellos generados por MutY se resintetizan siguiendo una ruta larga dependiente de PCNA [81].

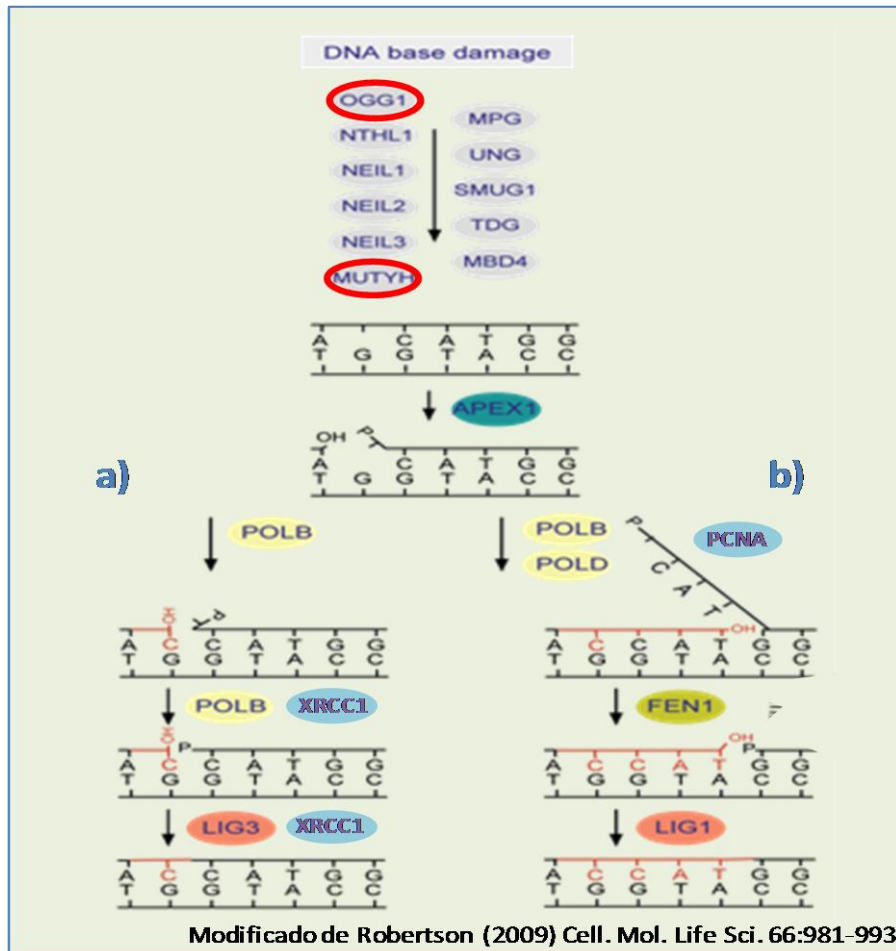


Figura 12: Vía de BER [78]. Distintas DNA-glicosilasas reconocen específicamente bases modificadas y generan sitios abásicos mediante hidrólisis del enlace N-glicosídico. Se genera un corte en el sitio abásico gracias a la actividad liasa de algunas DNA glicosilasas bifuncionales o gracias a la endonucleasa APEX1 en el caso de DNA glicosilasas monofuncionales. A partir de aquí el sitio abásico se va a regenerar por dos vías distintas dependiendo de la DNA glicosilasa que haya iniciado el proceso de reparación: **a)** Ruta corta (caso de Ogg1) en la que la DNA polimerasa β regenera el nucleótido correspondiente y la DNA ligasa III completa la reparación. **b)** Ruta larga (caso de hMutY) en la que varias DNA polimerasas estimuladas por PCNA van a resintetizar entre 3-6 nucleótidos vecinos. La endonucleasa FEN1 escinde los nucleótidos antiguos y la ligasa I completa el proceso sellando el corte.

OGG1: 8-hidroxi guanina DNA-glicosilasa; MUTYH: adenina DNA-glicosilasa homóloga de MutY; APEX1: endonucleasa 1; POLB: DNA polimerasa β ; POLD: DNA polimerasa δ ; FEN1: endonucleasa 1 específica de estructura *flap*; LIG3: DNA ligasa III; LIG1: DNA ligasa I; PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular; XRCC1: proteína reparadora de DNA XRCC1.

Una tercera enzima; Mth1 (*MTH1(NUDT1)*) hidroliza directamente la 8OHdGTP originada en el pool de nucleótidos celular previniendo su incorporación al DNA naciente [82].

La acción conjunta de estas tres enzimas constituye el principal mecanismo reparador de la 8OHdG en mamíferos (ver figura 4).

Una deficiencia en estas enzimas reparadoras aumentaría la tasa de transversiones G>T lo que también podría aumentar el riesgo de cáncer. Por este motivo los genes que codifican estas proteínas son buenos candidatos para la búsqueda de variantes genéticas que puedan estar asociadas al riesgo de cáncer.

Durante estos últimos años se han ido encontrando evidencias que relacionan estas enzimas con el riesgo de padecer cáncer:

El gen *MUTYH* se ha asociado al síndrome de MAP [28] que ya se ha descrito en un apartado anterior, el gen *OGG1* se ha localizado en la región cromosómica 3p26.2 [83] la cual se ha visto que presenta LOH en muchos tumores [84]. También se ha observado un aumento de transversiones G>T y elevados niveles de 8OHdG en líneas celulares colorrectales que no presentan inestabilidad a microsatélites ni inestabilidad cromosómica [85, 86].

Por otro lado se han publicado numerosos estudios de asociación de polimorfismos encontrados en genes de la vía BER que actúan como factores de riesgo en diferentes tipos de cáncer [87-98]. Particularmente en cáncer colorrectal, se han publicado estudios sobre variantes de genes implicados en la vía BER en distintas poblaciones que en algunos casos muestran asociación y en otros no [28, 41, 99-105].

3. HAPLOTIPO YIN-YANG

En el estudio de enfermedades complejas, como es el caso del cáncer, los estudios de asociación (estudios caso-control) son herramientas muy importantes ya que nos permiten estimar el impacto de una variante genética en el riesgo a desarrollar una enfermedad dada en la población de estudio.

Durante las últimas décadas se han encontrado numerosos SNPs asociados a enfermedades complejas. La base de esta asociación SNP-enfermedad radica no

solo en la posibilidad de una acción directa del SNP sobre el riesgo a desarrollar la enfermedad, sino también en la posibilidad de asociación del SNP con la alteración genética causante de la enfermedad.

De la misma manera también se han encontrado haplotipos que han mostrado asociación con enfermedades mediante estudios caso-control. Un haplotipo se puede definir como una combinación de alelos (SNPs) en una región cromosómica (de tamaño variable) que se suele transmitir en bloque debido a su baja frecuencia de recombinación genética durante la meiosis. Si una mutación ocurre en un haplotipo dado, esta mutación se asociará a este haplotipo hasta que nuevos eventos mutacionales o de recombinación ocurran.

Dado el alto número de polimorfismos en el genoma humano, cabría esperar una variabilidad muy grande de haplotipos distintos para una región cromosómica dada. Pero esto no es siempre así; hace unos años se han identificado numerosas regiones cromosómicas (aproximadamente el 75-80% del genoma humano) que muestran un patrón de haplotipos particular llamado "Yin-Yang". Los haplotipos Yin-Yang son pares de haplotipos que difieren en cada uno de los SNP que conforman el haplotipo. Son haplotipos totalmente complementarios y que además representan a la mayoría de los haplotipos existentes en esa región en particular [106].

Este patrón de haplotipos es sorprendente ya que sería justo lo contrario de lo que uno se esperaría encontrar bajo la hipótesis de un origen de haplotipos mediante un proceso secuencial de mutaciones [107]. Se ha sugerido que el origen de los haplotipos Yin-Yang puede radicar en un efecto fundador debido a la mezcla de dos poblaciones bien diferenciadas sumado a un efecto de selección o deriva genética [107].

Que solo dos haplotipos expliquen la mayor parte de la variabilidad haplotípica en una región cromosómica dada, implica que una buena parte de la población presentará un diplotipo homocigoto para alguno de los dos haplotipos Yin o Yang. Se podría uno plantear que la similitud entre cromosomas homólogos en una región particular podría favorecer procesos de recombinación homóloga que en última instancia podrían conducir a la inactivación de genes supresores de tumor aumentando la susceptibilidad al cáncer. De hecho, al comparar las frecuencias de recombinación en SNPs con MAF menor de 0,1% y localizados en

regiones con patrón Yin-Yang y regiones sin patrón Yin-Yang, se observa una mayor recombinación en zonas Yin-Yang [106].

Se ha observado un patrón de haplotipos Yin-Yang en numerosos genes implicados en cáncer tanto en población CEU(CEPH) [108, 109] como en población española [110].

Como apartado anexo al objetivo principal de esta tesis, se ha incluido un nuevo abordaje de los estudios caso-control en el que lo que se quiere analizar no es una variante genética sino una variante estructural como puede ser el diplotipo Yin-Yang en genes supresores de tumor y su asociación o no al riesgo de padecer cáncer.

OBJETIVOS

- 1) El primer objetivo de esta tesis es analizar la implicación de la principal vía de reparación de la 8OHdG en la carcinogénesis colorrectal en un grupo bien definido de familias como son las familias HNPCC-X pero cuyas causas de susceptibilidad son desconocidas. Para intentar cumplir este objetivo se han seguido dos líneas de estudio:
 - a) Búsqueda y análisis de variantes en los genes *OGG1*, *MUTYH* y *MTH1* en familias HNPCC-X
 - b) Estudio del daño oxidativo producido por 8OHdG en el DNA de tumores correspondientes a familias HNPCC-X

- 2) Como segundo objetivo se pretende analizar el estado de la vía Wnt en tumores HNPCC-X y HNPCC-MSI y establecer diferencias en cuanto a la expresión de distintas proteínas relacionadas con esta vía: β -catenina (*CTNNB1*), c-myc (*MYC*), ciclina D1 (*CCND1*) y foxO3 (*FOXO3*).

- 3) El tercer y último objetivo consiste en indagar en nuevas posibles formas de inestabilidad genética que puedan actuar en el CCR y más particularmente en este grupo de familias. Para ello se postula que la similitud entre regiones cromosómicas homólogas pueda afectar a la tasa de recombinación y por tanto pueda favorecer la inactivación de genes supresores de tumor desencadenando procesos carcinogénicos. Para testar esta hipótesis se elige el diplotipo Yin-Yang del gen *APC* como variante genética y se estudia su asociación con CCR en familias HNPCC-X, y una serie de CCR esporádico-MSS.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIONES Y CRITERIOS DE SELECCIÓN

1.1. Población de estudio HNPCC-X

Para el presente estudio se seleccionaron familias atendidas durante los años 1999-2010 en la Consulta de Consejo Genético del Servicio de Oncología del HCSC. Los criterios de selección fueron los siguientes:

Tabla 5: Criterios de selección para familias HNPCC-X.

AMSTERDAM I [48]
✓ Al menos 3 familiares afectados de CCR.
✓ Al menos dos generaciones sucesivas deben estar afectadas.
✓ Al menos dos de los familiares afectos deben estar emparentados en primer grado.
✓ Al menos uno de los tumores debe ser diagnosticado antes de los 50 años.
✓ La Poliposis Familiar Adenomatosa debe ser excluida.
AMSTERDAM [49]
✓ Al menos 3 familiares afectados de CCR u otro tipo de tumor asociado al Síndrome de Lynch (cáncer de endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal).
✓ Al menos dos generaciones sucesivas deben estar afectadas.
✓ Al menos dos de los familiares afectos deben estar emparentados en primer grado.
✓ Al menos uno de los tumores debe ser diagnosticado antes de los 50 años.
✓ La Poliposis Familiar Adenomatosa debe ser excluida.
ALTO RIESGO (propios)
✓ Al menos 3 familiares afectados de CCR u otro tipo de tumor asociado al Síndrome de Lynch (cáncer de endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal). Se incluye también el cáncer gástrico como síndrome asociado.
✓ Al menos dos generaciones sucesivas deben estar afectadas.
✓ Se acepta que no haya dos familiares afectos emparentados en primer grado si el número de casos en la familia es elevado en al menos dos generaciones sucesivas y existe una fuerte sospecha de herencia vertical.
✓ Al menos uno de los tumores debe ser diagnosticado antes de los 55 años.
✓ La Poliposis Familiar Adenomatosa debe ser excluida.

Criterios Clínicos:

Se seleccionaron familias que al menos cumpliesen uno de los siguientes criterios clínicos:

- 1.-Criterios Amsterdam I [48] (tabla 5).
- 2.-Criterios Amsterdam II [49] (tabla 5).
- 3.-Criterios de Alto Riesgo (definidos para este estudio). Básicamente consisten en los mismos criterios Amsterdam pero menos estrictos en cuanto a la edad de diagnóstico e incluyendo el cáncer gástrico como cáncer HNPCC asociado (tabla 5).

Criterios Moleculares:

Dentro del grupo de familias que cumplen los criterios clínicos establecidos en el apartado anterior, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios moleculares:

- 1.- Ausencia de inestabilidad de microsatélites en los tumores seleccionados.
- 2.- Expresión positiva demostrada de las proteínas reparadoras Mlh1, Msh2, Msh6 y Pms2 o en su defecto ausencia de mutación patogénica en los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*.

En dos familias (CC-26 y CC-160) no se pudieron llevar a cabo estudios de inestabilidad e inmunohistoquímica por falta de muestra tumoral y solo se realizaron estudios genéticos en los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* en los familiares afectados.

En total se reunieron 42 familias HNPCC-X de las cuales 29 cumplen criterios estrictos Amsterdam I/II y 13 cumplen los criterios de Alto Riesgo establecidos para este estudio. Los individuos afectados de estas familias presentan edades de aparición del cáncer que van desde los 28 hasta los 84 años con una media de $56,7 \pm 6,3$. Los datos descriptivos de cada una de las familias se muestran en el anexo 1. Y los datos de los familiares participantes en el estudio se indican en el anexo 2.

Las técnicas empleadas para los análisis moleculares que han ayudado a la selección de estas familias se muestran en el apartado 1.6.

Para realizar este estudio se pidieron consentimientos informados a todos los participantes y se revisaron las historias personales y familiares de cáncer.

1.2. Población HNPCC-MSI

Para los distintos estudios, se incluyó una población de pacientes HNPCC-MSI atendidos en la consulta de Consejo Genético del HCSC entre los años 1999-2010. Los criterios clínicos de selección de estos pacientes fueron los mismos que los empleados para la selección de familias HNPCC-X y los criterios moleculares fueron los siguientes:

- 1.- Presencia de inestabilidad de microsatélites en tumores seleccionados.
- 2.- Detección de mutación patogénica en alguno de los genes integrantes de la vía MMR: *MLH1*, *MSH2*, y *MSH6*.

En total se reunieron 48 familias HNPCC-MSI de las cuales 43 cumplen criterios estrictos Amsterdam I/II y 2 cumplen los criterios clínicos de Alto Riesgo establecidos previamente para la selección de familias HNPCC-X. Los individuos afectados de estas familias presentan edades de aparición del cáncer que van desde los 15 hasta los 75 años con una media de $46,2 \pm 4,8$. Los datos descriptivos de cada una de las familias se muestran en el anexo 3 y los datos de los familiares participantes en el estudio se indican en el anexo 4.

Las técnicas empleadas para los análisis moleculares que han ayudado a la selección de estas familias se muestran en el apartado 1.6.

Para realizar este estudio se pidieron consentimientos informados a todos los participantes y se revisaron las historias personales y familiares de cáncer.

1.3. Población MUTYH

Para el análisis del daño oxidativo se incluyeron 29 tumores colorrectales pertenecientes a 28 pacientes escoceses portadores de mutación patogénica en el gen *MUTYH*. 15 de estos pacientes presentan mutación bialélica en el gen *MUTYH* y de éstos, 13 han sido diagnosticados de MAP. Los 13 pacientes restantes son portadores de mutación monoalélica y no presentan poliposis. La edad de aparición del cáncer se sitúa entre 20 y 78 años con una media de $51,2 \pm 12,7$. En el anexo 5 se describen estos pacientes.

Se dispusieron de cortes de tumor en parafina de 21 tumores distintos y de DNA tumoral de 17 tumores.

También se incluyeron 5 cortes parafinados de tumores esporádicos de colon pertenecientes a pacientes escoceses sin mutación germinal detectada en MMR o *MUTYH* (CCResp-SC).

Estas muestras han sido cedidas por la Dra. Susan Farrington, “Colon Cancer Genetics Group”, Western General Hospital, Edinburgh, UK.

1.4. Población CCR esporádico: CCR-ESP

Para los distintos estudios de asociación, se incluyeron 218 muestras de DNA de sangre periférica de pacientes con CCR esporádico diagnosticados entre los años 1998 y 2005 en el Hospital Clínico San Carlos y bajo consentimiento informado de cada participante. Las edades de diagnóstico en esta población oscilan entre 25 a 90 años con una media de 68 ± 14 años. La proporción de mujeres está en torno al 45%.

1.5. Población control

Como población control en los estudios de asociación, se incluyeron 276 muestras de DNA de sangre periférica de voluntarios sin historia personal de cáncer.

La población control fue reclutada en el centro de extracciones del HCSC previo consentimiento informado de cada uno de los participantes. Raza, edad y sexo son comparables a los de la población de estudio. La edad media se sitúa en torno a $63,2\pm 18,3$ años y la proporción de mujeres en torno al 64%.

Para el estudio de los haplotipos Yin-Yang se incluyeron 129 muestras más de DNA de sangre periférica de voluntarios sin historia personal de cáncer. De la misma manera, estas muestras fueron reclutadas en el centro de extracciones del HCSC previo consentimiento informado de cada uno de los participantes. La edad media de los 405 participantes se sitúa en torno a $53,53\pm 18,8$ años y la proporción de mujeres en torno al 67%.

1.6. Análisis moleculares en familias HNPCC-X y HNPCC-MSI

1.6.1. Inestabilidad de microsatélites

Para la determinación de la inestabilidad de microsatélites en tumores CCR se analizó el panel de 5 marcadores de Bethesda (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 y D17S250) [53]. La amplificación y visualización de estos microsatélites se llevó a cabo de acuerdo a protocolos establecidos previamente en nuestro laboratorio [56].

Los tumores que mostraron inestabilidad en al menos 2 microsatélites se consideraron MSI, y solo aquellos que no mostraron ningún microsatélites alterado se consideraron MSS. Los tumores con un solo microsatélite inestable (MSI-L) no se consideraron en este estudio.

1.6.2. Estudio de expresión de las proteínas Mlh1, Msh2, Msh6 y Pms2

La expresión de las proteínas Mlh1, Msh2, Msh6 y Pms2 en tejido tumoral se analizó por inmunohistoquímica en cortes de 3 μ m de grosor de bloques de tumor parafinado y de acuerdo a protocolos establecidos previamente en nuestro laboratorio [56]. El porcentaje de núcleos positivos fue evaluado por dos patólogos distintos. Más de un 10% de núcleos teñidos se consideró como indicador de expresión positiva.

1.6.3. Búsqueda de mutaciones en los genes MMR

Se analizaron todas las secuencias codificantes y uniones intrón-exón de los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* por DGGE y se secuenciaron de acuerdo a protocolos establecidos previamente en nuestro laboratorio [111, 112].

También se buscaron reordenamientos genómicos en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* mediante MLPA con los kits P003 y P008 (MRC-Holland) según el protocolo facilitado por el fabricante.

2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

2.1. Sangre

A cada participante se le extrajeron 10 mL de sangre venosa periférica en tubos con anticoagulante EDTA K3 y bajo consentimiento informado.

2.1.1. DNA

Se extrajo DNA de cada muestra de sangre periférica según la técnica de “Salting Out” [113] o bien con el extractor automático MagnaPure® (Roche) según el protocolo recomendado por el fabricante.

La concentración y calidad del DNA se estimó con el espectrofotómetro NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific).

2.1.2. RNA/cDNA

Se extrajo RNA total de cada muestra de sangre periférica con el extractor automático MagnaPure® (Roche) según el protocolo recomendado por el fabricante.

La concentración y calidad del RNA se estimó con el espectrofotómetro NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific).

Para la síntesis de cDNA a partir de RNA total se empleó el kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System” (Invitrogen™) según el protocolo recomendado por el fabricante y utilizando hexámeros aleatorios como iniciadores de la síntesis de cDNA.

2.2. Bloques de tumor parafinado

Se solicitaron, bajo consentimiento informado, bloques de parafina conteniendo tejido tumoral colorrectal perteneciente a familias HNPCC-X y HNPCC-MSI.

2.2.1. DNA de células tumorales

Para la extracción de DNA tumoral se realizaron 6 cortes de 10 µm de grosor de tejido tumoral embebido en parafina. La zona tumoral fue delimitada mediante una tinción con hematoxilina-eosina por un patólogo experimentado asegurando un contenido tumoral mínimo del 80%. La zona de tejido no delimitada se eliminó con una cuchilla llevándose a cabo el procedimiento de extracción solamente en la zona tumoral señalada.

Para desparafinar el tejido se sumergieron los cortes en Xileno durante 15 minutos y posteriormente se limpiaron los restos de Xileno sumergiendo los cortes en Etanol absoluto durante 15 minutos. Se recogió toda la muestra en un tubo de 2 mL y se centrifugó 10 minutos a 13500 rpm. Se decantó y se lavó el pellet con Etanol 70%. Tras volver a centrifugar a 13500 rpm durante 10 minutos se dejó secar el pellet a temperatura ambiente un mínimo de 10 minutos.

En la gran mayoría de las muestras la extracción de DNA se hizo con el kit “QIAamp® DNA FFPE Tissue” (Qiagen®) según el protocolo facilitado por el fabricante y mediante el procesador automático “QIAcube” (Qiagen®).

En una minoría, la extracción de DNA se llevó a cabo mediante una digestión con proteinasa K (Roche) y purificación con fenol/cloroformo según protocolos previamente descritos en nuestro laboratorio [114].

En cualquier caso, la concentración y calidad del DNA se estimó con el espectrofotómetro “NanoDrop® 1000” (Thermo Scientific).

2.2.2. Tissue MicroArray

Un TMA consiste en una colección de muestras de distintos tejidos en un solo portaobjetos permitiendo así el análisis de un número elevado de tumores a la vez. Las ventajas del TMA no solo son el ahorro de reactivos y de tiempo en la obtención de resultados sino también la disminución de la variación interensayo permitiendo entonces una mejor comparación entre las muestras.

Para facilitar los estudios de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en tumores CCR, se diseñaron dos TMA que incluyeron un total de 85 muestras de tumores, por duplicado, pertenecientes a 69 familias distintas: 31 familias HNPCC-X y 38 familias HNPCC-MSI.

Para la elaboración del TMA se hicieron tinciones hematoxilina-eosina en cortes de 4 μm de cada uno de los bloques tumorales y un patólogo experimentado valoró y delimitó las zonas tumorales. Se recogieron cilindros de tejido tumoral de 1 mm de diámetro de cada bloque y se distribuyeron en un nuevo bloque de parafina virgen utilizando un “Tissue-Arrayer” (modelo MTA1675 Beecher Instrument. Inc.) y dejando siempre una distancia de 0,5 μm con las muestras adyacentes. En total, las muestras tumorales se distribuyeron en dos TMAs (figura 13).

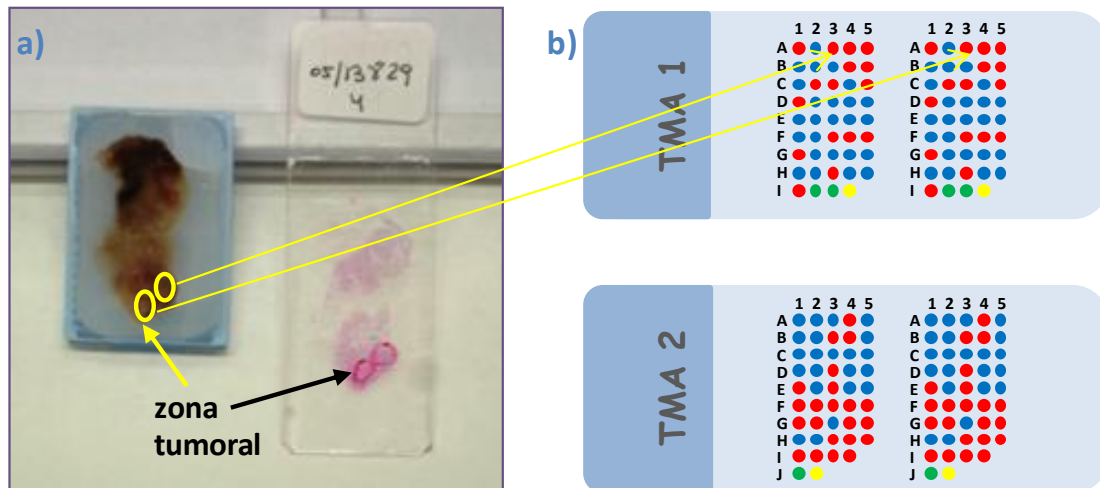


Figura 13: Diseño de TMAs. a) Delimitación de la zona tumoral mediante tinción con hematoxilina-eosina. b) Diseño de los TMAs 1 y 2. Cada TMA contiene dos duplicados. Los círculos rojos simbolizan muestras de tumores HNPCC-X, los azules son muestras de tumores HNPCC-MSI, los verdes muestras control de tejido normal de colon y los amarillos muestras control de tejido tumoral de amígdala. La posición exacta de los tumores HNPCC-X en el TMA viene indicada en la tabla M2 y para los tumores HNPCC-MSI en la tabla M4. Cada muestra equivale a un cilindro de tejido de 1µm de diámetro. La distancia entre muestras es de 0,5 µm.

Finalmente se realizaron cortes de 3 µm de grosor de cada bloque de TMA para posteriores ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

3. BÚSQUEDA DE MUTACIONES GERMINALES EN GENES REPARADORES DEL DAÑO OXIDATIVO

3.1. Amplificación y secuenciación de los genes *OGG1*, *MTH1* y *MUTYH*

Se hizo el estudio genético de los genes implicados en la reparación del la 8OHdG en DNA de sangre periférica de los casos índice de las 42 familias HNPCC-X seleccionadas. Se consideró como caso índice a aquel familiar que presentase la edad más temprana de aparición del cáncer entre todos los familiares participantes.

Se analizaron todas las secuencias codificantes y las uniones intrón-exón de los genes *OGG1*, *MTH1* y *MUTYH* mediante amplificación por PCR y secuenciación capilar. Los cebadores utilizados tanto para amplificar estas regiones como

para su posterior secuenciación se muestran en el anexo 6. Para su diseño se empleó el programa *online Primer3 v.0.4.0* [115] bajo las condiciones establecidas por defecto.

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μL conteniendo 50 ng de DNA genómico, 1X PCR buffer (Ecogen SRL), 0,2 μM de cada cebador, 100 μM de cada deoxinucleótido (Promega), 1,5 mM MgCl_2 y 0,5 Unidades de Eco-Taq DNA polimerasa (Ecogen).

Las reacciones se sometieron al siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 4 minutos; 5 ciclos de amplificación inicial con una desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, hibridación a 58 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos y extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos; 30 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, hibridación a 55 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos y extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados mediante tinción con Bromuro de Etidio.

Para su secuenciación, los productos de amplificación se diluyeron entre 2 y 10 veces de acuerdo a la intensidad de la banda amplificada. Se secuenciaron ambas hebras, directa y reversa, de cada fragmento de amplificación.

Las reacciones de secuencia se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μL conteniendo 1 μM del cebador, 8 μL del producto de amplificación diluido y 1 μL de ABI Prism[®] Big Dye[®] Terminator v1.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems[™]).

Las reacciones se sometieron al siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos; 25 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos, hibridación a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos y extensión a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos y una extensión final de 7 minutos a 60 $^{\circ}\text{C}$.

Los productos se purificaron mediante el kit BigDye[®] XTerminator[™] (Applied Biosystems[™]) según el protocolo facilitado por el fabricante y se sometieron a secuenciación capilar por los autoanalizadores ABI Prism[®] 310 o ABI Prism[®] 3130 (Applied Biosystems[™]) según las recomendaciones del fabricante.

3.2. Análisis de variantes encontradas

Se hicieron los siguientes análisis *in silico* en cada una de las variantes encontradas en los genes de reparación de la 8OHdG a través de distintos programas *online*:

Se utilizó el programa de alineamiento de múltiples secuencias *ClustalW2* [116] para poder estimar el grado de conservación del aminoácido afectado. Para el alineamiento de cada variante se incluyeron 10 proteínas homólogas pertenecientes a las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodites*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Streptococcus mutans* y siempre bajo los parámetros establecidos por defecto en el programa.

Se utilizaron dos programas, *Polyphen* [117] y *SIFT* [118], para estimar el posible impacto de un cambio concreto de aminoácido en la estructura y/o función de la proteína.

SIFT hace una predicción del grado de tolerancia de un determinado cambio de aminoácido basándose en múltiples alineamientos con secuencias homólogas extraídas de la base de datos del *NCBI*. Se analizaron las sustituciones encontradas en las proteínas Ogg1 (gi:12653743), Mth1 (gi:40288286) y hMutY (gi:21902514) bajo los parámetros establecidos en el programa por defecto.

Polyphen clasifica la variante según una estimación de la probabilidad del daño en la estructura y/o función de la proteína. Esta clasificación se hace teniendo en cuenta los sitios específicos de la proteína (utilizando la base de datos *UniProt*), el espectro de sustituciones observadas en una posición dada entre proteínas homólogas, y la estructura espacial de la proteína (según las bases de datos *PDB* o *PQS*) siempre que sea posible. Se analizaron las sustituciones encontradas en las proteínas Ogg1 (Acc O15527), Mth1 (Acc A4D205) y hMutY (Acc 190358497) bajo los parámetros establecidos en el programa por defecto.

El programa *HSF* (v.2.4.1) [119] se utilizó para estimar el efecto potencial de cada una de las variantes sobre los donadores y aceptores de *splicing* del RNA así como la probabilidad de aparición de nuevas secuencias de *splicing*. Es una herramienta que calcula las probabilidades de activación o inhibición de secuencias de *splicing* por medio de dos algoritmos distintos (*HSF* y *MaxEnt*) basados en la comparación de múltiples secuencias consenso de *splicing*. Se hizo un análisis de mutaciones de las variantes encontradas utilizando los

tránscritos ENST00000344629 (*OGG1*), ENST00000343985 (*MTH1*) y ENST00000372115 (*MUTYH*) y marcando un mínimo de 100 nucleótidos intrónicos en los extremos 3' y 5' de los exones.

3.2.1. Análisis de segregación de variantes

Con el fin de analizar si las variantes encontradas segregan con la enfermedad, se hizo el análisis genético en todos los familiares pertenecientes a las familias portadoras de variantes con una frecuencia alélica menor del 5%.

El análisis se llevó a cabo por secuenciación directa del amplicón afectado según los protocolos descritos en el apartado 3.1.

3.2.2. Análisis de *splicing* en la variante *OGG1*-R46Q

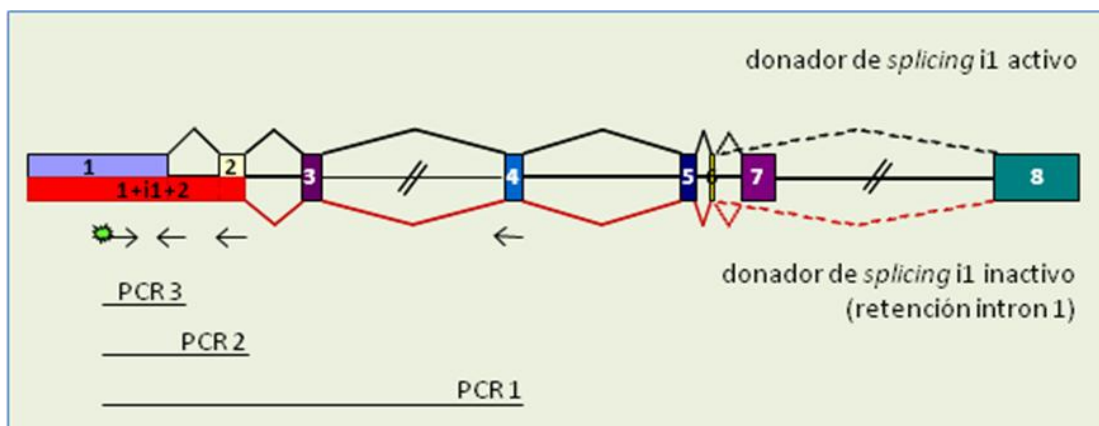


Figura 14: Diseño de amplicones para el análisis de *splicing* de la variante *OGG1*-R46Q Esquema de las PCRs diseñadas para la amplificación del cDNA de pacientes portadores y no portadores de la variante *OGG1*-R46Q. Los exones se representan en barras de distintos colores indicando el número correspondiente en su interior. Los intrones se representan con líneas. En rojo se representa el transcrito esperado de *OGG1* en el caso de la inactivación del donador de *splicing* i1 (retendría el intrón 1 completo).

Las líneas discontinuas indican un *splicing* alternativo que da lugar a la isoforma β .

PCR1= PCR externa específica de cDNA.

PCR2 y PCR3= PCR internas para la amplificación selectiva de cDNA normal y cDNA portador de la inserción del intrón 1 respectivamente.

Para estudiar el grado de inactivación del donador de *splicing* del exon 1 en portadores de la variante *OGG1*-R46Q, se analizaron los transcritos a nivel de cDNA mediante dos aproximaciones distintas que se detallan a continuación.

3.2.2.1. Análisis de *splicing* por secuenciación

Como se indica en las figuras 14 y 15, se amplificó el cDNA con dos cebadores situados entre el exón 1 y exón 4 de *OGG1* (las secuencias de los cebadores se muestran en el anexo 7).

En todos los casos las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ L conteniendo 1 μ L de cDNA, 1X PCR Gold Buffer (Applied BiosystemsTM), 0,2 μ M de cada cebador, 100 μ M de cada deoxinucleótido (Promega), 2,5 mM MgCl₂, 0,8 Unidades de AmpliTaq[®] Gold DNA polimerasa (Applied BiosystemsTM).

Las reacciones se sometieron al siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 58 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto; y una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados mediante tinción con Bromuro de Etidio.

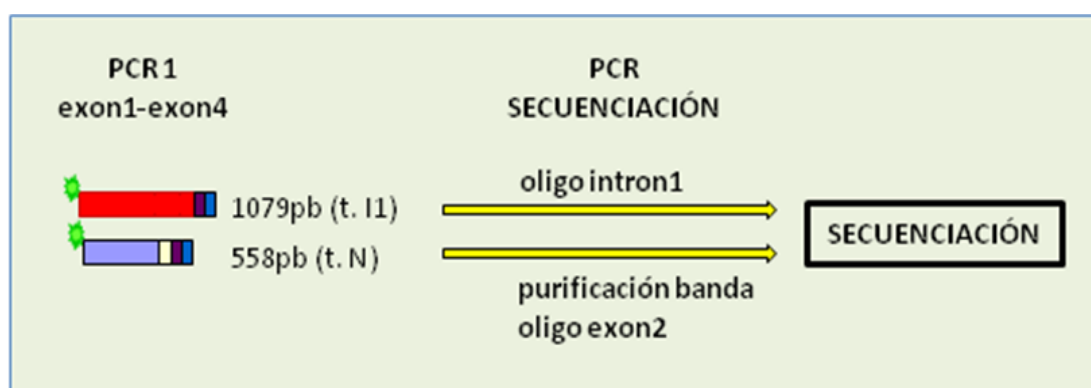


Figura 15: Análisis de *splicing* de la variante *OGG1*-R46Q por secuenciación. A partir de una amplificación específica de cDNA entre los exones 1 y 4 se lleva a cabo la secuencia de los dos productos de la PCR1. Para amplificar específicamente el transcrito que contiene el intrón 1 se emplea un cebador reverse contenido en el intrón 1. Para amplificar selectivamente el transcrito normal, se extrae la banda correspondiente del gel de agarosa y se secuencia con un cebador reverse situado en el exón 2.

Para secuenciar la banda correspondiente al transcrito portador de la inserción del intrón 1 se diluyó el producto de amplificación entre 2 y 10 veces de acuerdo a la intensidad de la banda mostrada en el gel de agarosa y se utilizó un cebador específico situado en el intrón 1 (5'-CTACCCGTGCTTGTTTCCTC-3') (figura 15).

La banda correspondiente al transcrito normal se aisló del gel de agarosa mediante el kit de extracción QUIAquick (Qiagen®) y según el protocolo proporcionado por el fabricante. Posteriormente se secuenció utilizando un cebador reverso situado en el exón 2 (5'-AGACAAGAGCCAGGCTAGCA-3') (figura 15).

Todas las reacciones de secuencia se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado 3.1.

3.2.2.2. Análisis de *splicing* por enzimas de restricción

El producto de la PCR externa entre los exones 1 y 4 (descrita en el apartado anterior) se diluyó 500 veces y se utilizó como molde para dos PCRs internas que comparten un mismo cebador directo marcado en su extremo 5' con el fluorocromo FAM pero difieren en el cebador reverso (figura 14). Una amplificación se hizo entre los exones 1 y 3 (PCR2) para favorecer la amplificación del transcrito normal y la segunda PCR se diseñó entre el exón 1 y el intrón 1 (PCR3) para amplificar selectivamente el transcrito que contiene el intrón 1.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo como se describe en el apartado 3.2.2.1 y las secuencias de las parejas de cebadores utilizados se muestran en el anexo 7.

El cambio R46Q (c.137 G>A) inactiva una diana de restricción para BsaWI permitiendo así diferenciar el cambio tras una digestión enzimática. Con este fin, los fragmentos resultantes de cada amplificación se digirieron con la endonucleasa BsaWI que reconoce y corta la secuencia 5'-WCCGGW-3' en DNA de doble cadena (W equivale a las bases A ó T) (figura 16). Los productos resultantes se visualizaron por electroforesis capilar.

Las reacciones de digestión se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µL conteniendo 1X Buffer 4 (New England Biolabs®), 1X BSA (New England Biolabs®) y 5 Unidades de BsaWI (New England Biolabs®). La incubación se

hizo a 60 °C durante 16 horas. Cada producto de digestión se diluyó en agua 50 veces y se añadieron 2,5 µL de esta dilución en 30 µL de formamida HI-DI™ (Applied Biosystems™) y 0.2 µL de marcador de peso molecular GeneScan™-500 LIZ (Applied Biosystems™). Se desnaturalizó a 95 °C durante 4 minutos y se sometió a electroforesis capilar en un autoanalizador ABI Prism® 3130 (Applied Biosystems™) según las recomendaciones del fabricante.

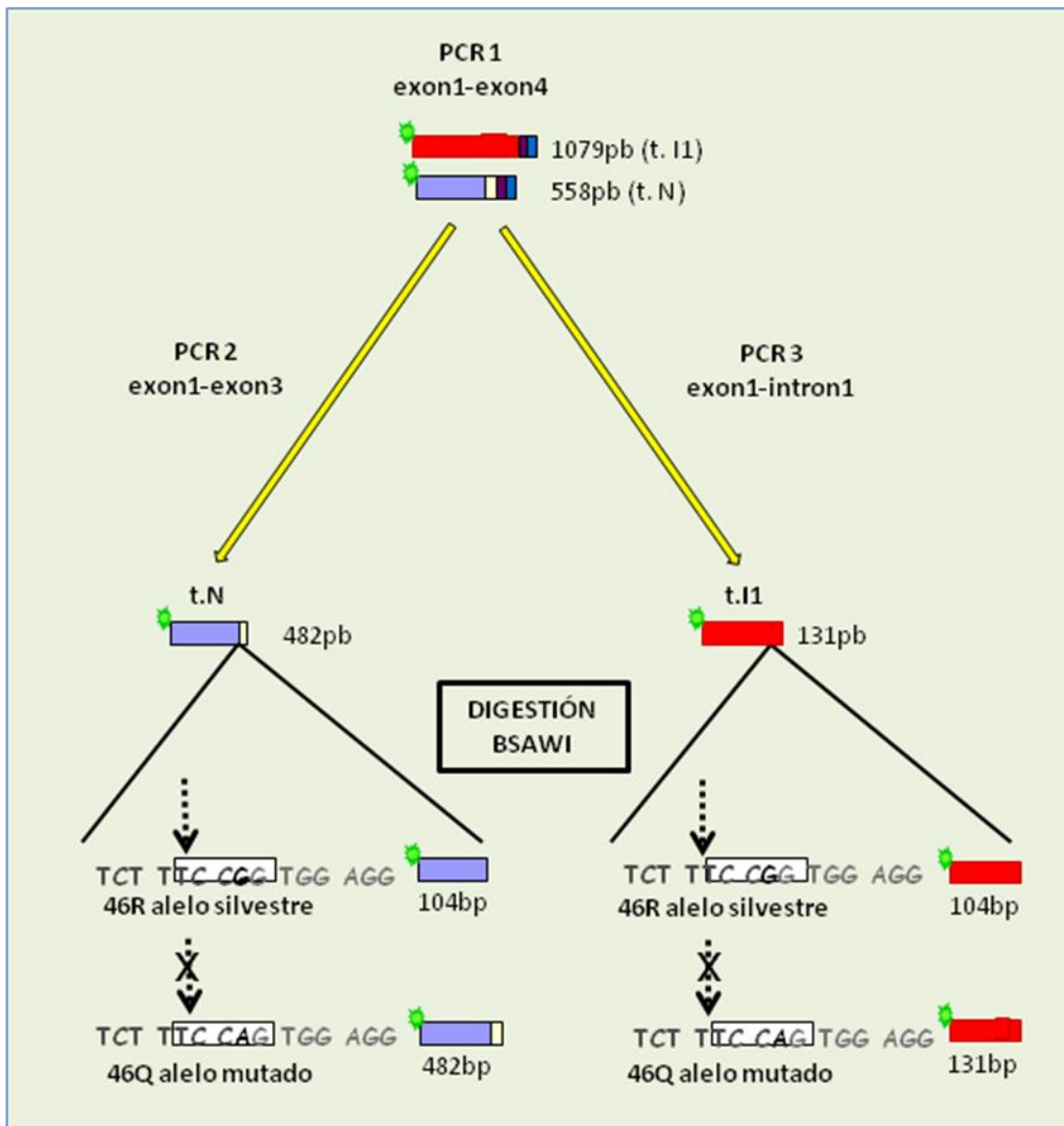


Figura 16: Análisis de *splicing* de *OGG1-R46Q* por enzimas de restricción. A partir de una amplificación específica de cDNA entre los exones 1 y 4 se llevan a cabo dos PCR internas para amplificar selectivamente el transcrito normal (PCR2) y el transcrito con el intrón 1 (PCR3). Para averiguar la procedencia de los transcritos, los productos de cada PCR se digieren con la endonucleasa de restricción BsaWI que va a reconocer al alelo silvestre (c.137G) pero no al alelo mutado (c.137A).

3.2.3. Estudios de asociación caso-control

Se hicieron estudios de asociación en las variantes frecuentes encontradas en los genes *OGG1*, *MTH1* y *MUTYH*, tanto en la población HNPCC-X como en las poblaciones HNPCC-MSI y CCR-ESP. También se analizó la variante *OGG1*-R46Q en la población control.

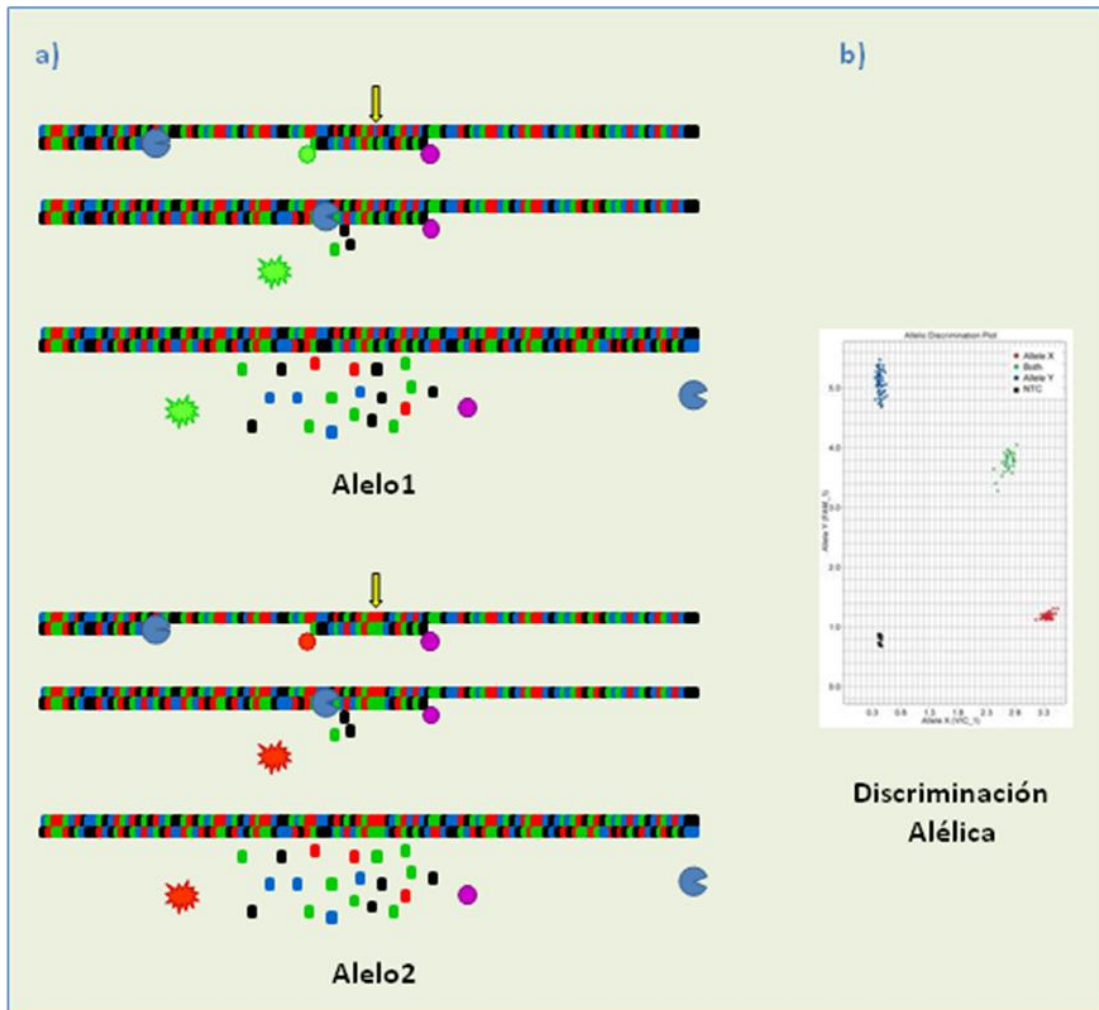


Figura 17: Ensayos de genotipado Taqman®. a) Brevemente, consisten en una reacción de PCR en la que se añaden dos sondas de 18-22 pares de bases que reconocen específicamente los distintos alelos del SNP a genotipar. Cada sonda va marcada en su extremo 5' con un fluorocromo (VIC para un alelo y FAM para el otro) y en el extremo 3' poseen un inhibidor de la fluorescencia. Cuando la polimerasa avanza y llega hasta la sonda hibridada, la hidroliza gracias a su actividad exonucleasa 5'-3' liberando el fluorocromo y provocando así un incremento de la fluorescencia que será directamente proporcional al número de moléculas amplificadas en cada ciclo. b) La relación entre las intensidades detectadas para cada fluorocromo permite clasificar las muestras en homocigotos para uno u otro alelo y heterocigotos.

Estos estudios se llevaron a cabo por ensayos TaqMan® de genotipado de SNPs diseñados por Applied Biosystems. Para su genotipado se utilizaron 10 ng de DNA genómico en un volumen final de 5 µL siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. El fundamento de estos ensayos se esquematiza en la figura 17.

En el caso de las variantes del gen *MUTYH*, los estudios caso-control se realizaron por secuenciación directa de los amplicones correspondientes indicados en el anexo 6 y tal como se indica en el apartado 3.1.

3.2.3.1. Estudio estadístico

Las diferencias en las distribuciones alélicas y genotípicas entre casos y controles se estimaron mediante el test estadístico χ^2 o el test de Fisher. Los riesgos específicos se estimaron por medio del OR con un IC del 95%.

El test χ^2 de tendencia se utilizó para evaluar posibles diferencias en el riesgo de enfermedad según se tenga uno o dos alelos en aquellas variantes que hayan mostrado diferencias significativas en su distribución entre casos y controles.

En aquellas variantes que mostraron diferencias significativas en el estudio caso-control se analizó la supervivencia libre de enfermedad entre los distintos genotipos mediante curvas de Kaplan-Meier y se estimó el riesgo según el modelo de riesgo proporcional de Cox.

En todos los casos se comprobó que la distribución de los distintos genotipos de las variantes frecuentes cumpliera el equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control mediante el test χ^2 y con un IC del 95%.

4. BÚSQUEDA DE MUTACIONES SOMÁTICAS EN *KRAS* Y *BRAF*

Se analizaron todas las secuencias codificantes y uniones intrón-exón de los exones 2, 3 y 4 del gen *KRAS* donde se localizan la mayoría de las mutaciones (codones 12, 13, 61 y 146), y el codón 600 del gen *BRAF* (situado en el exón 15). Para ellos se secuenció DNA procedente de 40 tumores HNPCC-X y 17 tumores

MUTYH utilizando los cebadores que se indican en el anexo 8. Para su diseño se empleó el programa *Primer3 v.0.4.0*.

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μL conteniendo 100 ng de DNA tumoral. 1X Platinum[®] PCR buffer (Invitrogen), 0,2 μM de cada cebador, 200 μM de cada deoxinucleótido (Invitrogen), 1,5 mM MgCl_2 , 1 Unidad de Platinum[®] Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Las reacciones se sometieron al siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos; 40 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, hibridación a 58 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 segundos y extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 segundos y una extensión final de 5 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados mediante tinción con Bromuro de Etidio.

Se purificó un volumen de 2,5 μL de cada producto de amplificación con 5 U de Exonucleasa I (USB) y 0,5 U de fosfatasa alcalina de camarón (SAP, USB) durante 15 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$ con una inactivación de 15 minutos a 80 $^{\circ}\text{C}$.

Ambas hebras de cada fragmento amplificado se secuenciaron en un volumen final de 10 μL conteniendo 1 μM de cebador, entre 0,5 y 10 μL del producto de amplificación purificado y 1 μL de ABI Prism[®] Big Dye[®] Terminator v1.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems). Las reacciones se sometieron al siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 96 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos; 25 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 96 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos, hibridación a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos y extensión a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 4 minutos.

Los productos de secuencia se precipitaron con Etanol 65% y Acetato sódico 1M centrifugando 30 minutos a 2000 rpm. Posteriormente se lavaron los precipitados una sola vez con Etanol 70% y centrifugando 20 minutos a 2000 rpm. Los productos precipitados se secaron a temperatura ambiente y se disolvieron en formamida HI-DITM (Applied BiosystemsTM) para su posterior secuenciación capilar en el autoanalizador ABI Prism[®] 3130 (Applied Biosystems) según las recomendaciones del fabricante.

5. ANÁLISIS POR INMUNOFLORESCENCIA DE LOS NIVELES DE 8OHdG EN TEJIDO TUMORAL

5.1. Protocolo de inmunofluorescencia para 8OHdG en tejido tumoral parafinado

Para el estudio del daño oxidativo en tejido tumoral se analizaron cortes histológicos de 3 μm de grosor de los TMA 1 y 2 descritos en la sección 2.2.2. También se analizaron cortes completos de 3 μm de 21 tumores MUTYH y 5 tumores esporádicos (CCR esp-SC) cedidos por la Dra. Farrington (WGH, Edimburgo).

Para su análisis se utilizó el anticuerpo monoclonal *anti-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine* (8OHdG) clon N45.1 (JaICA) mediante el siguiente protocolo de inmunofluorescencia:

Los cortes se desparafinaron incubándolos a 60°C durante 90 minutos y posteriormente lavándolos dos veces en xilol 100% durante 5 minutos. Se rehidrataron con dos lavados en Etanol 100% de 5 minutos seguidos de un lavado de 5 minutos en Etanol 70% y un lavado de 5 minutos en H₂O.

La recuperación antigénica se llevó a cabo por calor. Se sumergieron las muestras en tampón Citrato (10 mM Trisodium citrate HCl, pH 6 y 0,025% Tween 20) y se calentaron en un horno microondas a la máxima potencia durante 15, 8 y 7 minutos rellenando el volumen evaporado en cada paso con tampón Citrato fresco. Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 1 hora en el mismo tampón y posteriormente se lavaron con TBS (50 mM Tris.HCl, pH 7,4 y 150 mM NaCl.) y 1% Triton X-100 durante 20 minutos y dos veces en TBS durante 10 minutos.

El bloqueo de antígenos inespecíficos se realizó incubando las muestras durante 16 horas a 4 °C con una Solución Universal (10% BSA, 10% suero de caballo 0,5% Triton X-100 en TBS).

Después de lavar las muestras 5 minutos en TBS, se incubaron durante 16 horas a 4 °C con anti-8OHdG 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en Solución Universal. En el caso de cortes empleados como controles negativos, el anticuerpo primario no se añadió a la Solución Universal.

Se lavaron las muestras 3 veces durante 15 minutos en TBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con un anticuerpo

secundario unido al fluorocromo *Texas-Red* (*TexasRed-Donkey anti Mouse IgG*; *Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.*) a una concentración de 7,5 µg/mL en TBS.

Se hicieron 4 lavados de 5 minutos en TBS Tween-20 0,1% y se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (50 µg/mL en *Vectashield*) cubriendo los cristales con portaobjetos e incubándolos en oscuridad, a 4 °C durante dos días.

5.2. Valoración de 8OHdG en núcleos de células tumorales

Se visualizaron las muestras en un microscopio de fluorescencia con tres canales y se tomaron fotografías de las imágenes combinadas a 10x100 aumentos.

Para cuantificar los niveles de 8OHdG se valoraron las células contenidas en un número de fotografías suficiente para contar al menos 100 núcleos de cada tumor y se halló el porcentaje de núcleos positivos. Se estableció previamente un umbral de positividad analizando células de tejido normal en tumores control. El contaje fue llevado a cabo por dos personas distintas y se dieron por válidos aquellos contajes que no difirieran en más del 10%.

5.3. Estudio estadístico

Se hicieron análisis estadísticos para dos variables distintas; edad de diagnóstico y porcentaje de núcleos positivos. Se determinó la normalidad de estas variables mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov* y también gráficamente.

La edad de diagnóstico se consideró normal y se hicieron comparaciones de medias entre los distintos grupos mediante el test estadístico *t-student*.

La variable porcentaje de núcleos positivos se desvió fuertemente de la distribución normal. Se escogió la mediana como mejor parámetro estadístico y se utilizó el test no paramétrico de la *mediana* para comparar grupos.

6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LA VÍA WNT EN TEJIDO TUMORAL

Para el estudio de la vía Wnt en tejido tumoral de tumores HNPCC-X y HNPCC-MSI se analizaron cortes histológicos de 3 μm de grosor de los TMA 1 y 2 descritos en la sección 2.2.2.

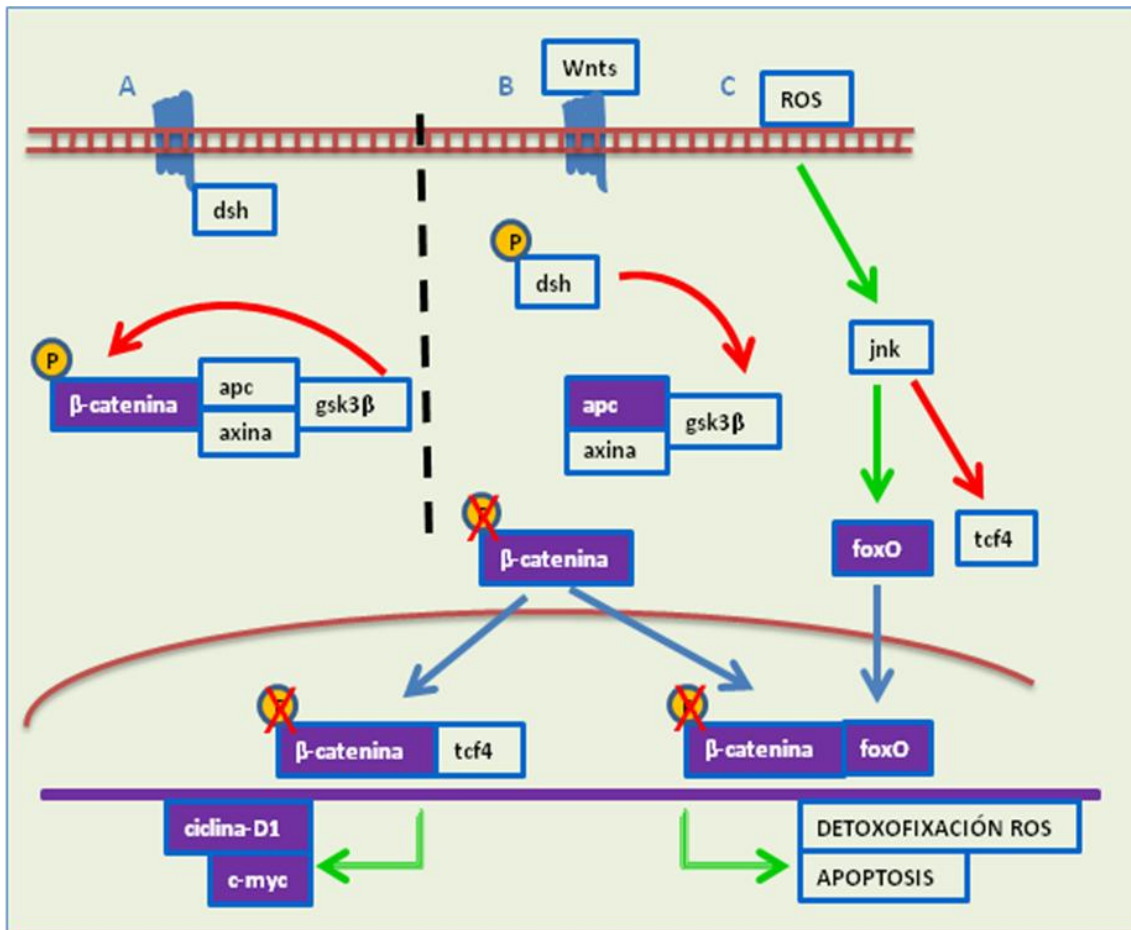


Figura 18: Principales integrantes y dianas de la vía Wnt. A) En ausencia de ligando; la β -catenina permanece unida al complejo axina, apc, gsk3 β . Gsk3 β fosforila a β -catenina y es degradada en el proteosoma. **B)** En presencia de ligando; dsh es fosforilado y liberado del receptor de membrana. Dsh inhibe a gsk3 β impidiendo la fosforilación de β -catenina la cual entra al núcleo y se une a tcf4 activando la transcripción de genes de proliferación y diferenciación celular como c-myc y ciclina D1. **C)** Cuando hay un estrés oxidativo aumentan los niveles de ROS y se estimula la expresión de foxO. FoxO entra en el núcleo y compite con tcf4 por la unión a β -catenina activando genes de detoxificación de ROS y apoptosis. El balance entre una u otra vía es determinado por los niveles de ROS.

Se estudió la expresión de 4 proteínas implicadas en la vía Wnt por medio de tinciones inmunohistoquímicas. Se utilizaron anticuerpos contra β -catenina

(Ready to Use) (Ref.IR702, Dako), ciclina-D1 (Ready to Use) (Ref.IR152, Dako), c-myc (Ref.NCL-cMYC, Novocastra) y foxO3a (Ref.9467S, Cell Signaling Technologies). La relación entre estas proteínas se esquematiza en la figura 18.

6.1. Protocolo de inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica para β -catenina y ciclina-D1 se llevó a cabo de manera automatizada con el sistema de detección EnVision™ FLEX+ (Dako, Denmark) que se basa en la conjugación del anticuerpo secundario a la enzima peroxidasa y detección cromogénica mediante una diaminobencidina, la cual al oxidarse da lugar a un producto final marrón.

Se llevó a cabo una desparafinación, rehidratación y recuperación antigénica por calor y de manera única en el módulo de pretratamiento PT-Link (dako, Denmark) incubando las muestras en un buffer pH=9 (Envision™ FLEX Target Retrieval Solution) durante 20 minutos a 95°C.

Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y posteriormente se trasladaron al módulo Autolinker 48 (Dako, Denmark) para el procedimiento de tinción según las recomendaciones del fabricante. Brevemente:

Se hizo un bloqueo de la peroxidasa endógena con EnVision™ FLEX *Peroxidase-Blocking Reagent* (SM801 Dako, Denmark) durante 10 minutos.

Posteriormente se llevó a cabo una incubación con el anticuerpo primario correspondiente en su formato prediluido seguido de incubación con el anticuerpo secundario EnVision™ FLEX/HRP. Los tiempos de incubación, tanto para el antígeno primario como secundario fueron de 30 minutos.

La detección se realizó incubando las muestras con las soluciones EnVision™ FLEX DAB + *Chromogen* y EnVision™ FLEX *Substrate Buffer* (peróxido de hidrógeno) durante 10 minutos.

Se hizo una contratinción de núcleos con hematoxilina durante 10 minutos utilizando el kit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako, Denmark).

Finalmente las muestras se deshidrataron en lavados de alcohol 96º, alcohol 100º y xilol de 5 minutos cada uno para su posterior montaje permanente.

La inmunohistoquímica para c-myc se llevó a cabo íntegramente en el autoanalizador Benchmark XT (Roche) con el kit de detección *ultraVIEW™* Universal DAB (Ventana, Medical Systems, Inc.) basado también en la

conjugación del anticuerpo secundario con la peroxidasa y tinción cromogénica con DAB. Brevemente:

Los cortes se desparafinaron con buffer EZ Prep 1X (Ventana, Medical Systems, Inc.). La recuperación antigénica se llevó a cabo por calor con buffer TBE pH alto (8,2-8,6) durante 30 minutos, posteriormente se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente.

Se bloqueó la peroxidasa endógena con la solución de inhibición (peróxido de hidrógeno) suministrada en el kit durante 10 minutos.

Posteriormente se llevó a cabo una incubación con el anticuerpo primario con una dilución 1:300 y un tiempo de incubación de 28 minutos.

Se incubaron las muestras con la solución del kit "Universal HRP Multimer" (anticuerpo secundario) durante 30 minutos.

La detección se realizó incubando las muestras con las soluciones "DAB Chromogen" y "DAB H₂O₂" (suministradas en el kit) durante 10 minutos.

Posteriormente se hizo una contratinción de núcleos con hematoxilina durante 10 minutos.

Finalmente las muestras se deshidrataron en lavados de alcohol 96º, alcohol 100º y xilol de 5 minutos cada uno para su posterior montaje permanente.

Se hicieron análisis inmunohistoquímicos en los TMAs para estudiar la expresión de foxO3a. Estos análisis se llevaron a cabo y se valoraron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron por el Dr. Javier Hernández. Para su detección se utilizó el Sistema "EnVision™ FLEX+" (Dako, Denmark) también utilizado para β-catenina y ciclina-D1. En el caso de foxO3a se utilizó una dilución 1/100 del anticuerpo primario y un tiempo de incubación de 2 horas. El resto del protocolo fue el mismo.

6.2. Valoración de los anticuerpos

Cada uno de los anticuerpos fue valorado por dos anatomopatólogos distintos de la siguiente manera:

En la β-catenina se valoró la tinción nuclear considerando positivas aquellas muestras con más del 10% de los núcleos teñidos.

En el caso de la ciclina-D1 también se valoró la tinción nuclear considerando como positivas a aquellas muestras con más del 30% de núcleos teñidos.

En c-myc se valoró tinción citoplasmática (no se detectó tinción nuclear en ninguna muestra) considerando como positivas las muestras que presentaban tinción fuerte.

En el caso de foxOa3 se valoró la tinción nuclear considerando como positivas las muestras con presencia de núcleos fuertemente teñidos.

6.3. Estudio estadístico

Se estudió la expresión diferencial de cada una de las 4 proteínas en los dos grupos de tumores por medio del test de la χ^2 y se halló el OR con un IC del 95% para cada caso.

Se comparó la edad media de diagnóstico en cada grupo con el test *t de student*.

Se buscaron posibles interacciones entre las proteínas analizadas estimando el riesgo en cada pareja de proteínas por medio del OR con un IC del 95%.

7. ESTUDIO DEL DILOTIPO YIN-YANG EN EL GEN APC

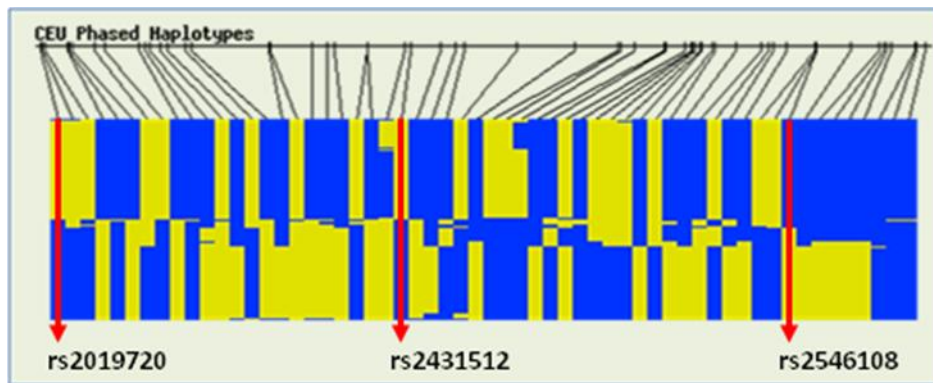


Figura 19: Haplotipos en fase del gen APC para la población CEU (Proyecto HapMap [120]). Representación gráfica de los haplotipos genotipados en la población CEU para el APC. Cada línea horizontal representa el haplotipo de un individuo y cada línea vertical equivale a un SNP determinado. Los alelos alternativos en cada SNP se muestran en azul y amarillo. Se observa la presencia de dos haplotipos mayoritarios que se denominan Yin-Yang. Las líneas rojas indican aquellos SNPs seleccionados para el estudio de diplotipos Yin-Yang.

Se analizó la distribución del diplotipo Yin-Yang en el gen *APC* en un total de 35 muestras de DNA de sangre periférica procedentes de 35 familias HNPCC-X, 405 muestras procedentes de la población control y 157 muestras de individuos de la población CCR-ESP con tumores MSS (CCR-ESP-MSS).

A través de la gráfica de “Haplotipos en Fase” del gen *APC* facilitada por la página web de la organización HapMap [120] se visualizaron los dos haplotipos Yin-Yang y los SNPs implicados. Para determinar estos haplotipos en sangre, se seleccionaron 3 SNPs marcadores (rs2019720, rs2431512, rs2546108) distribuidos a lo largo de la zona Yin-Yang del gen (figura 19) y con un índice de heterocigosidad cercano a 0,5 (tabla 6).

[53] **Tabla 6:** Descripción de los tgSNPs utilizados en el estudio de diplotipo Yin-Yang en el gen *APC*.

Referencia SNP (NCBI)	rs2019720	rs2431512	rs2546108
Posición en <i>APC</i> (crm 5)	Intron 1	Intron 6	Intron11
Alelos	A/G	C/T	A/C
Alelo ancestral (frec. CEU)	A (0,508)	C (0,5)	C (0,492)
Heterocigosidad \pm EE	0,494 \pm 0,055	0,495 \pm 0,047	0,495 \pm 0,048
ID ensayo Taqman®	C_1120624_10	C_3162979_10	C_9389410_10

EE: error estándar

Se utilizaron ensayos Taqman® (Applied Biosystems) (ver figura 17) para el genotipado de los SNPs en un autoanalizador “ABI Prism® 7900HT System” (Applied Biosystems) según el protocolo recomendado por el fabricante.

Las muestras se clasificaron según el diplotipo Yin-Yang en homocigotas (Yin-Yin ó Yang-Yang) y heterocigotas (Yin-Yang). Aquellas muestras que mostraban haplotipos distintos se clasificaron como muestras heterocigotas ya que en ningún caso se mostraron en homocigosis.

Se comprobó que tanto los SNPs por separado como los haplotipos Yin-Yang cumplieran el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el test χ^2 . Se analizaron las diferencias en la distribución de las frecuencias de los haplotipos y diplotipos Yin-Yang entre ambas poblaciones por medio del test exacto de Fisher.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL DAÑO OXIDATIVO EN FAMILIAS HNPCC-X

1.1. Búsqueda de mutaciones en genes reparadores del daño oxidativo

Con el propósito de detectar alteraciones germinales en genes reparadores del daño oxidativo y analizar su posible papel como factores de riesgo de CCR en familias HNPCC-X, se secuenciaron los genes correspondientes a las dos DNA-glicosilasas de la vía BER (*OGG1* y *MUTYH*) y a la enzima de reparación *MTH1* en un total de 42 casos índice. Los resultados del análisis de mutaciones en estos tres genes se detallan en el anexo 9.

Casi todos los casos índices (95%) presentaron alteraciones en alguno de los tres genes estudiados exceptuando dos familias (CC-7 y CC-143). Estas dos familias cumplen criterios Amsterdam I, presentan una edad media de diagnóstico de cáncer de 53 y 51 años respectivamente y en ambos casos la edad de aparición del CCR más precoz resultó ser de 42 años. El resto de las familias mostraron alteraciones en uno, dos o tres de los genes analizados.

Se identificaron un total de 8 variantes raras y 5 variantes frecuentes. Todas ellas previamente descritas en la literatura excepto la variante c.285C>T (A95A) en *OGG1*. Se calcularon las frecuencias alélicas en la población de estudio y se utilizaron programas *online* para estimar el grado de conservación de los aminoácidos afectados (*ClustalW2*), la probabilidad de que un cambio de aminoácido determinado afecte a la estructura y/o función de la proteína (*SIFT*, *Polyphen*) y posibles alteraciones en el *splicing* (*HSF*). La descripción de las variantes se resume en la tabla 7.

1.1.1. Análisis de variantes raras

Las variantes R46Q, A95A y G308E en *OGG1*; IVS8+21, IVS12-27 y G396D en *MUTYH* y V106M y D122D en *MTH1* mostraron una frecuencia menor del 5% y siendo clasificadas como “variantes raras”. Todas ellas son cambios puntuales: 4 mutaciones de cambio de sentido, 2 silenciosas y 2 cambios en zona intrónica.

Tabla 7: Alteraciones germinales encontradas en el análisis de genes reparadores del daño oxidativo. Descripción y estimación del daño *in silico* en aquellas variantes que implican cambio de aminoácido.

GEN	ID	ID HGVS	ID NCBI	Frec. CEU	Frec. HNPCC-X	SEG	CONS AA	DAÑO	HSF	REF.
OGG (e1)	R46Q	c.137 G>A (p.Arg46Gln)	rs104893751	G=0.992 A=0.008	G=0.988 A=0.012	si	si	si	c.137 $\Delta CV = -11.24$	Kohno 1998
OGG1 (e2)	A95A	c.285 C>T (p.Ala95Ala)		sin datos	C=0.988 T=0.012	no	no	no	no	no
OGG1 (i4)	IVS4-15	c.748-15C>G	rs2072668	C=0.788 G=0.212	C=0.774 G=0.226				no	Kohno 1998
OGG1 (e6)	G308E	c.923 G>A (p.Gly308Glu)	rs113561019	sin datos	G=0.988 A=0.012	si	si	si	no	Blons 1999
OGG1 (e7)	S326C	c.977 C>G (p.Ser326Cys)	rs1052133	C=0.776 G=0.224	C=0.786 G=0.214	no	no	no	no	Kohno 1998
MTH1 (e3)	V106M	c.316 G>A (p.Val106Met)	rs4866	G=0.992 A=0.008	G=0.988 A=0.012	no	si	si/no	no	Wu 1995
MTH1 (e3)	D122D	c.366 C>T (p.Asp122Asp)	rs35932242	C=0.986 T=0.008	C=0.976 T=0.024	no	si	si	no	Görgens 2007
MTH1 (e4)	D142D	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	rs1799832	C=0.796 T=0.204	C=0.655 T=0.345	si	si	si	no	Wu 1995
MUTYH (i6)	IVS6+35	c.504+35 G>A	rs3219487	G=0.903 A=0.097	G=0.846 A=0.154				no	Al-Tassan 2004
MUTYH (i8)	IVS8+21	c.690+21 C>A		sin datos	A=0.987 C=0.013	no			no	Isidro 2004
MUTYH (i12)	IVS12-27	c.1187-27 C>T	rs3219490	C=0.979 T=0.021	C=0.987 T=0.013				no	Peterlongo 2006
MUTYH (e12)	Q338H	c.1014 G>C (p.Gln338His)	rs3219489	G=0.756 C=0.284	G=0.787 C=0.213		no	no	no	Slupska 1996
MUTYH (e13)	G396D	c.1187 G>A (p.Gly396Asp)	rs36053993	PATOG	G=0.987 A=0.013	si	si	si	no	Al-Tassan 2002

SEG: análisis de segregación; si: todos los individuos afectados son portadores, no: no todos los individuos afectados son portadores. CONS. AA: conservación del aminoácido afectado a nivel del reino Metazoa (analizado con el programa Clustal2). DAÑO: predicción del daño en la proteína por los programas SIFT y POLYPHEN. HSF: programa de predicción de alteración en el *splicing*; ΔCV = diferencia entre valores consenso de los sitios de *splicing* de la secuencia wt y la secuencia mutada. Más del 10% de diferencia se considera que puede afectar.

Las variantes R46Q y G308E en *OGG1*, y la conocida mutación G396D en *MUTYH* afectan a aminoácidos situados en posiciones altamente conservadas, y los dos programas de predicción utilizados (*Polyphen* y *SIFT*) estiman daños en la proteína para los tres casos (tabla 7).

La variante G396D en *MUTYH* provoca el cambio de un aminoácido alifático por un aminoácido ácido. Es una mutación conocida que provoca MAP cuando se presenta en homocigosis o junto con otra mutación en *trans* [28]. Esta mutación fue detectada en heterocigosis en la familia CC-19, clasificada como Amsterdam I. Todos los familiares con CCR estudiados mostraron la variante (figura 20).

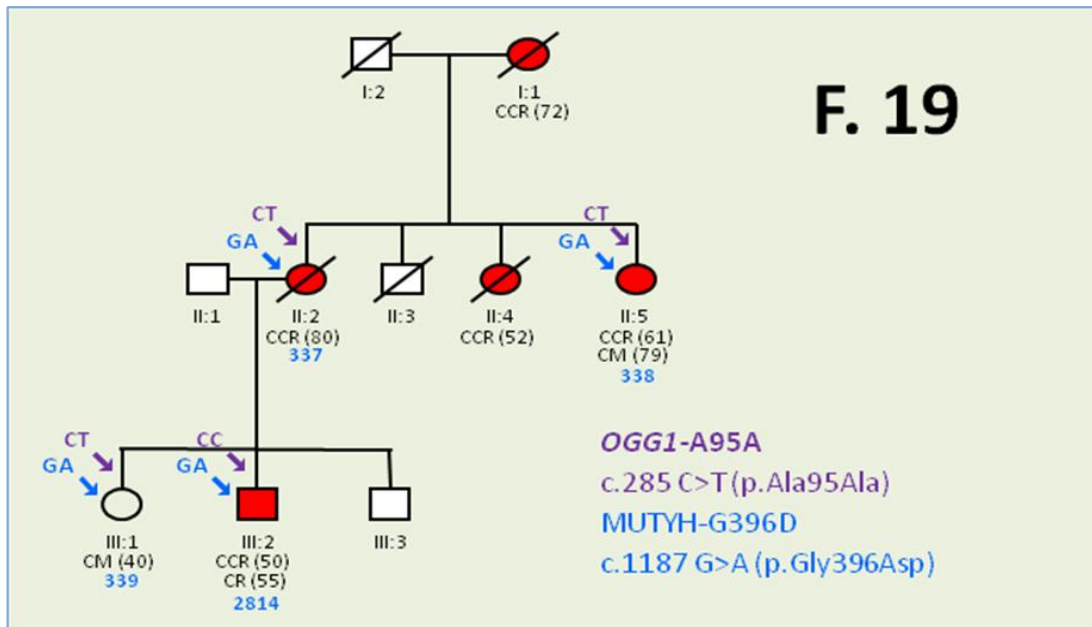


Figura 20: Análisis de segregación de las variantes *OGG1-A95A* y *MUTYH-G396D*.

CCR: cáncer colorrectal; CM: cáncer de mama; CR: cáncer renal

La variante R46Q afecta al último nucleótido del exón 1 de *OGG1* y provoca un cambio de un aminoácido básico por otro ácido. El análisis *in silico* del *splicing* en esta variante predijo la desactivación del donador de *splicing* en el intrón 1. Esta mutación fue detectada en la familia CC-298 clasificada como familia de Alto Riesgo. En el estudio de segregación, todos los familiares con CCR estudiados resultaron ser portadores de la variante (figura 21). Se analizó la presencia de esta variante en una serie de 367 controles libres de historia personal de cáncer y recogidos en la Unidad de Extracciones del HCSC tras

consentimiento informado. Se detectaron 8 individuos portadores en heterocigosis de la variante R46Q (frecuencia alélica del 1,1%).

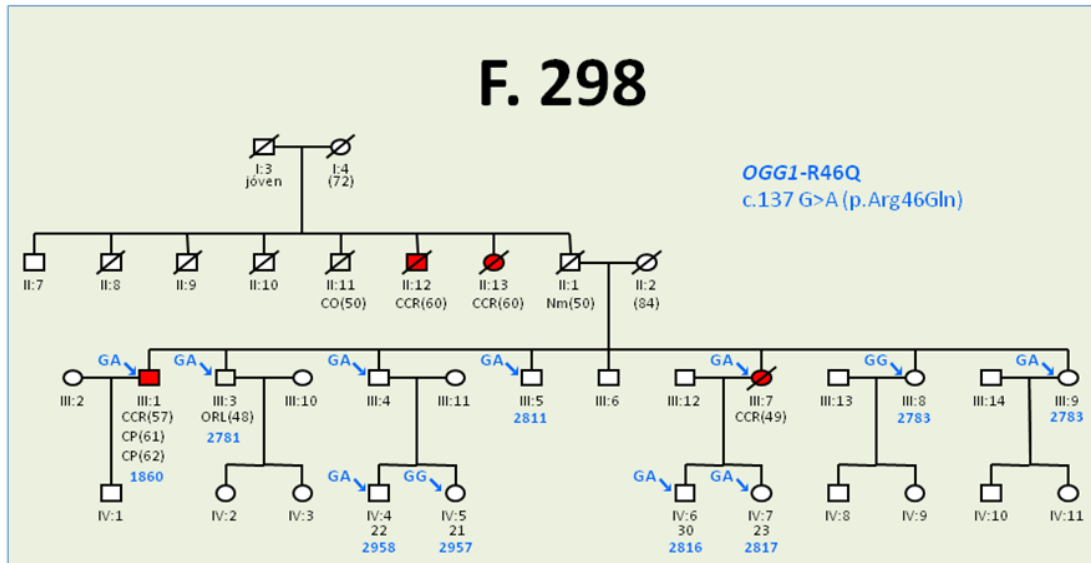


Figura 21: Análisis de segregación de la variante *OGG1*-R46Q.

CCR: cáncer colorrectal; ORL: cáncer de cabeza y cuello; CP: cáncer de pulmón; Nm: neumonía

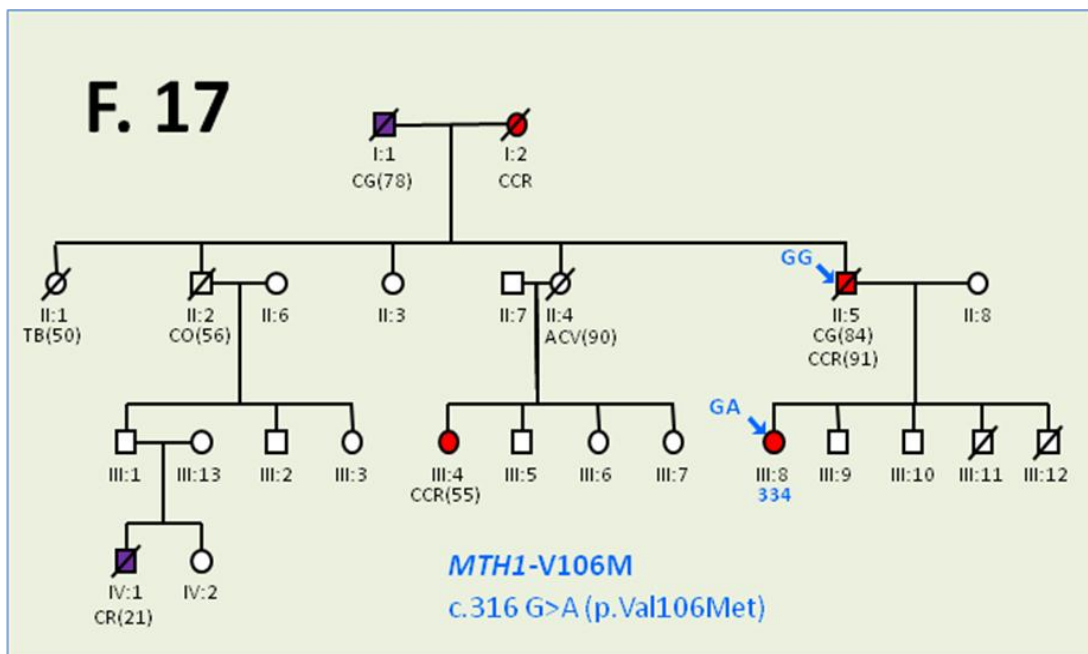


Figura 22: Análisis de segregación de la variante *MTH1*-V106M.

CCR: cáncer colorrectal; CG: cáncer gástrico; CO: cáncer oral; CR: cáncer renal; TB: tuberculosis; ACV: accidente cardiovascular

La variante G308E en *OGG1* provoca el cambio de un aminoácido alifático por un aminoácido ácido. Esta mutación se detectó en la familia CC-CH6, clasificada como Amsterdam I. No se hicieron estudios de segregación debido a la falta de DNA en el resto de familiares.

La variante V106M en *MTH1* afecta a un aminoácido en una posición conservada en Vertebrados. Provoca el cambio de un aminoácido alifático por un aminoácido hidrofóbico con átomo de azufre. Los análisis de predicción del daño fueron inconcluyentes. La variante se detectó en la familia CC-17 clasificada como Amsterdam I. En el estudio de segregación se observa que la variante no segrega con la enfermedad (figura 22).

El resto de variantes raras encontradas en este análisis no predicen ningún daño en la proteína, ni ocurren en aminoácidos conservados, ni segregan con la enfermedad en los casos que se han podido analizar.

1.1.1.1. Análisis de transcritos en la variante *OGG1*-R46Q (c.137 G>A)

Debido a que el análisis de *splicing in silico* en la variante *OGG1*-R46Q mostró una probabilidad muy alta para la inactivación del donador de splicing en el exón 1 (donador e1), y a que previamente se ha descrito la inactivación parcial de esta diana en tejido tumoral homocigoto para esta variante dando lugar a transcritos que retienen el intrón 1 completo [96], se llevó a cabo un estudio de los transcritos de *OGG1* en cDNA de sangre periférica de portadores tal y como se describe en el apartado 3.2.2. del capítulo de Material y Métodos de esta tesis y se esquematiza en las figuras 15, 16 y 17.

La amplificación selectiva del cDNA de portadores con cebadores situados entre los exones 1 y 4 muestra una banda cuyo tamaño se podría corresponder con el del transcrito normal (558 pb), y otra banda con un tamaño que podría coincidir con el del transcrito con retención del intrón 1 (1079 pb) (figura 23). Al secuenciar estas dos bandas específicamente en individuos portadores y no portadores, se confirma la secuencia correspondiente al transcrito normal y la correspondiente al transcrito con el intrón 1. La secuencia del transcrito normal no muestra el cambio c.137G>A en ningún caso, mientras que la secuencia correspondiente al transcrito con el intrón 1 es homocigota para el cambio en individuos portadores (figura

23), lo que sugiere una inactivación total del donador e1 en el alelo mutado (c.137A).

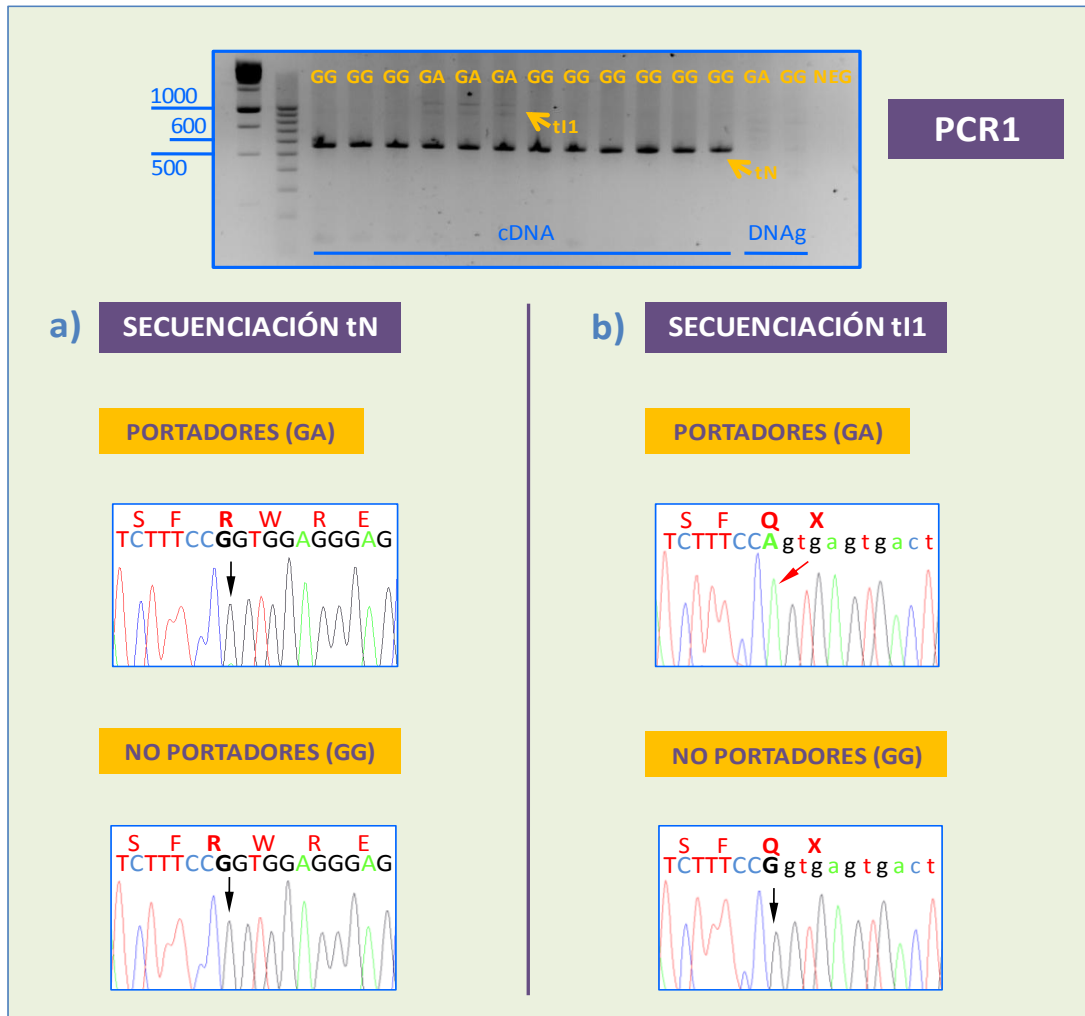


Figura 23: Análisis por secuenciación de los transcritos de la variante *OGG1-R46Q*. PCR1: amplificación de transcritos de *OGG1* entre los exones 1 y 4. En todos los casos se observa una banda intensa compatible con el tamaño del transcrito normal (tN) (558 pb). En portadores de la variante R46Q (GA) se observan bandas tenues de tamaño compatible con el transcrito esperado (1079 pb) en el caso de inactivación del donador de *splicing* e1 y retención del intrón 1 (t11). Se amplificó DNA genómico como control negativo de esta PCR. Los genotipos se indican en amarillo. Marcador de peso molecular 1Kb (Biotools, B&M Labs) en la línea 1 y 100pb (GenSura Lab, Inc.) en la línea 2. **a)** Secuenciación de la banda tN: purificación de la banda correspondiente en portadores y no portadores. Secuenciación directa con un cebador reverso situado en el exón 2. En todos los casos el tN es homocigoto para el alelo silvestre (c.137G). **b)** Secuenciación de la banda t11: secuenciación directa del producto de la PCR1 en portadores y no portadores con un cebador reverso situado en el intrón 1. Los portadores para la mutación muestran un t11 homocigoto para el alelo mutado (c.137A).

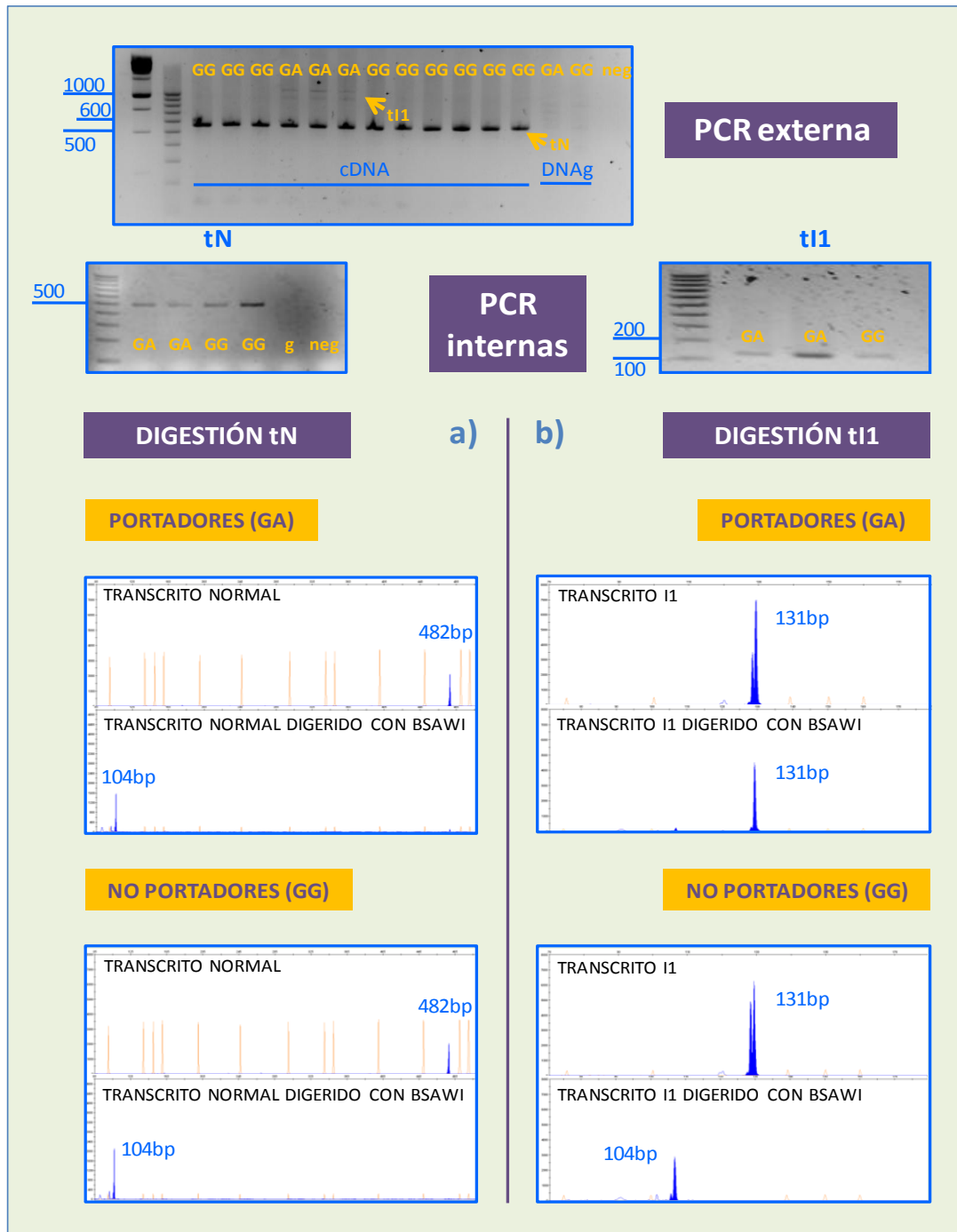


Figura 24: Análisis de restricción de los transcritos de la variante *OGG1-R46Q*. PCR externa (PCR1): amplificación de transcritos de *OGG1* entre los exones 1 y 4. En todos los casos se observa una banda intensa compatible con el tamaño del transcrito normal (tN) (558 pb). En portadores de la variante R46Q (GA) se observan bandas tenues de tamaño compatible con el transcrito I1 (tI1) esperado en el caso de inactivación del donador de *splicing* e1 (1079 pb). Se amplificó DNA genómico como control negativo de cDNA. Los genotipos de cada muestra se indican en amarillo. Marcador de peso molecular de 1Kb (Biotools, B&M Labs) en la línea 1 y de 100pb (GenSura Lab, Inc.) en la línea 2.

PCR internas: amplificaciones a partir de los productos obtenidos en la PCR externa diluidos 500 veces. **a)** Se emplearon cebadores situados en los exones 1 y

3 para amplificar el transcrito normal (tN) (482 pb). Los genotipos de cada muestra se indican en amarillo. Marcador de peso molecular 100pb (GenSura Lab, Inc.) en la línea 1. El análisis de restricción muestra una digestión prácticamente total de todo el transcrito tanto en portadores como en no portadores indicando que transcrito normal es homocigoto para el alelo silvestre (c.137G) en todos los casos. **b)** Se emplearon cebadores situados en el exón 1 e intrón 1 para así amplificar específicamente el transcrito con retención del intrón 1 (tI1). En todos los casos se obtuvo una banda intensa compatible con el tamaño esperado (131pb). Los genotipos de cada muestra se indican en amarillo. Marcador de peso molecular 100pb (GenSura Lab, Inc.) en la línea 1. El análisis de restricción muestra una falta total de digestión en el transcrito de los individuos portadores, indicando que el transcrito con retención del intrón 1 es homocigoto para el alelo mutado (c.137A) en portadores.

Se hizo un análisis de restricción de ambos transcritos para confirmar los resultados vistos por secuenciación. En este análisis se hicieron dos PCRs internas distintas a partir del producto de amplificación del cDNA de portadores y no portadores entre los exones 1 y 4 PCR externa) diluido 500 veces (figura 24).

Una de las PCR se hizo entre los exones 1 y 3, obteniendo así un producto de amplificación correspondiente al transcrito normal que tiene un tamaño óptimo para poder ser visualizado por electroforesis capilar (482 pb) (figura 24). Este producto se digirió con la enzima de restricción BsaWI y se visualizó de nuevo por electroforesis capilar. Como se puede observar en la figura 25a, tanto en los portadores de la variante R46Q como en los no portadores se observa una digestión total del transcrito indicando que en los portadores el transcrito normal procede enteramente del alelo silvestre (c.137G).

La segunda PCR interna se realizó entre el exón 1 y el intrón 1 para amplificar específicamente el transcrito que retiene el intrón 1. El producto de amplificación también tiene un tamaño acorde con el esperado y visualizable por electroforesis capilar (131 pb) (figura 24). Tras la incubación con BsaWI no se detecta digestión alguna del transcrito en pacientes portadores, indicando que todo el transcrito con intrón 1 detectado en portadores de la variante procede del alelo mutado (c.137A) (figura 24b). Cabe destacar que los no portadores también muestran la banda correspondiente al transcrito con retención del intrón 1 sugiriendo una inactivación parcial del donador e1 en el alelo silvestre (c.137G).

1.1.2. Análisis de variantes frecuentes

Las variantes con una frecuencia alélica superior al 10% fueron clasificadas como “variantes frecuentes”. Todas ellas cumplieron el equilibrio de *Hardy-Weinberg* en la población control.

1.1.2.1. Estudios de asociación caso-control

Se llevaron a cabo estudios caso-control con el fin de establecer una posible asociación entre cada variante y la aparición de cáncer en familias HNPCC-X, HNPCC-MSI y CCR-ESP. En las poblaciones HNPCC-X y HNPCC-MSI se seleccionó aleatoriamente un individuo afectado de CCR en cada familia para evitar un posible sesgo.

Los estudios se realizaron en todas las variantes frecuentes encontradas excepto en la variante intrónica IVS4-15 en *OGG1* ya que resultó estar fuertemente ligada a la variante S326C en *OGG1* (ver anexo 9).

La variante D142D en *MTH1* mostró diferencias estadísticamente significativas entre casos HNPCC-X y controles (OR= 2,23; IC (95%)= 1,35-3,66). Y la variante S326C en *OGG1* mostró diferencias significativas entre casos CCR-ESP y controles (OR=1,41; IC (95%)= 1,03-1,93). El resto de resultados se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Estudios de asociación caso-control de las variantes frecuentes encontradas en los genes *OGG1*, *MTH1* y *MUTYH* en las poblaciones HNPCC-X, HNPCC-MSI y CCR esporádico (CCR-ESP). Se muestra la distribución del alelo mutado en las distintas poblaciones de estudio (%).

POBLACIÓN HNPCC-X						
GEN	VAR.	CAMBIO	CASOS (%)	CONTROLES (%)	OR (IC=95%)	p-valor
<i>OGG1</i>	S326C	C>G	14/84(16.7)	104/516(20.2)		ns
<i>MTH1</i>	D142D	C>T	30/84(35.7)	99/496(19.9)	2.23 (1.35-3.66)	0,003
<i>MUTYH</i>	IVS6+35	G>A	12/76(15.8)	23/164(14)		ns
<i>MUTYH</i>	Q338H	G>C	15/78(19.2)	31/168(18.4)		ns
POBLACIÓN HNPCC-MSI						
GEN	VAR.	CAMBIO	CASOS (%)	CONTROLES (%)	OR (IC=95%)	p-valor
<i>OGG1</i>	S326C	C>G	23/86(26.7)	104/516(20.2)		ns
<i>MTH1</i>	D142D	C>T	17/90(18.9)	99/496(19.9)		ns
POBLACIÓN CCR-ESP						
GEN	VAR.	CAMBIO	CASOS (%)	CONTROLES (%)	OR (IC=95%)	p-valor
<i>OGG1</i>	S326C	C>G	103/392(26.3)	104/516(20.2)	1,41 (1,03-1,93)	0,029
<i>MTH1</i>	D142D	C>T	91/398(22.9)	99/496(19.9)		ns

OR: *odd ratio*; IC: intervalo de confianza; ns: estadísticamente no significativo

1.1.2.2. Estudio de las variantes *MTH1-D142D* y *OGG1-S326C*

Debido a la fuerte asociación detectada para las variantes *MTH1-D142D* y *OGG1-S326C* en las poblaciones HNPCC-X y CCR-ESP respectivamente, se profundizó en su análisis estadístico. Se estudió el posible efecto de la dosis génica y la supervivencia libre de cáncer.

La variante *MTH1-D142D* mostró un incremento del riesgo según el incremento de la dosis génica (tabla 9). El OR aumenta significativamente con una sola dosis de la variante (OR= 2,61; $p=0,009$) y este OR se incrementa aún más en individuos homocigotos para la variante (OR= 3,66; $p=0,035$). El resultado del test de tendencia confirma una diferencia significativa ($p=0,009$) para el aumento del riesgo de cáncer según el incremento de la dosis génica.

Tabla 9: Efecto de la dosis génica de la variante *MTH1-D142D* en la población HNPCC-X.

a) Análisis del efecto de la dosis génica de la variante *MTH1-D142D* en la población HNPCC-X.

GENOTIPO	DOSIS GÉNICA	CASOS (%)	CONTROLES (%)	OR (CI=95%)	p-valor
CT/TT	1 ó 2	25/42 (59,5)	86/248 (34,7)	2.77 (1.42-5.41)	0.003
CT	1	20/37 (54,1)	73/235 (31,1)	2.61 (1.29-5.27)	0.009
TT	2	5/22 (22,7)	13/175 (7,4)	3.66 (1.16-11.53)	0.036

CT: heterocigoto para la mutación; TT: homocigoto para el alelo mutado (timina)

b) Análisis de tendencia del efecto de la dosis génica de la variante *MTH1-D142D* en la población HNPCC-X.

GENOTIPO	CASOS (%)	CONTROLES (%)
CC	17/42 (40,5)	162/248 (65,3)
CT	20/42 (47,6)	73/248 (29,5)
TT	5/42 (11,9)	13/248 (5,2)
$p= 0.009$		

CC: homocigoto para el alelo silvestre (citosina); heterocigoto; TT: homocigoto para el alelo mutado (timina).

En la figura 25 se representan las curvas de supervivencia libre de cáncer para los diferentes genotipos de la variante *MTH1-D142D*. Los individuos homocigotos para la variante *MTH1-D142D* muestran un descenso de la edad de aparición del cáncer con una media de 51 años (HR= 2,55; IC (95%)=

1,06-6,13; $p=0,036$) mientras que los heterocigotos se comportan como el genotipo silvestre respecto a la edad de aparición del cáncer (60 años de media).

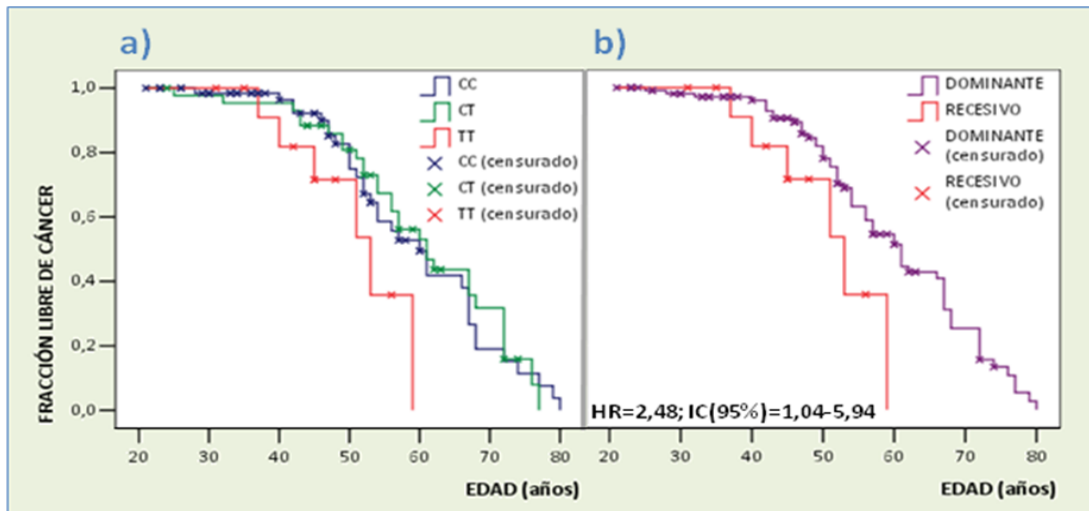


Figura 25: Supervivencia libre de enfermedad para la variante *MTH1-D142D* en la población HNPCC-X. a) Curva de Kaplan-Meier para los 3 genotipos distintos. Las medias de edad de diagnóstico son de $59,8 \pm 3,7$ (genotipo CC), $60,6 \pm 4$ (genotipo CT) y $51,3 \pm 5,3$ (genotipo TT). **b)** Curva de Kaplan-Meier para individuos con genotipo recesivo (TT) e individuos con genotipo dominante (CC+CT). Las medias de edad de diagnóstico son de $51,3 \pm 5,3$ (TT) y $60,5 \pm 2,7$ (CC+CT).

HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza

Para la variante *OGG1-S326C*, el efecto de la dosis génica no resultó evidente (tabla 10). En cuanto a la edad de aparición del cáncer, no se aprecian diferencias entre ninguno de los tres genotipos (figura 26).

Tabla 10: Efecto de la dosis génica de la variante *OGG1-S326C* en la población CCR-ESP.

a) Análisis del efecto de la dosis génica de la variante *OGG1-S326C* en la población CCR-ESP.

GENOTIPO	DOSIS GÉNICA	CASOS (%)	CONTROLES (%)	OR (CI=95%)	p-valor
CG/GG	1 ó 2	90/196 (45,9)	91/258 (33,3)	1.56 (1.07-2.28)	0.022
CG	1	77/183 (42,1)	78/245 (31,8)	1.55 (1.04-2.31)	0.029
GG	2	13/119 (10,9)	13/180 (7,2)	1.57 (0.7-3.53)	ns

CG: heterocigoto para la mutación; GG: homocigoto para el alelo mutado (guanina)

b) Significancia de la tendencia del efecto de la dosis génica de la variante *OGG1*-S326C en la población CCR-ESP.

GENOTIPO	CASOS (%)	CONTROLES (%)
CC	106/196 (54,1)	167/258 (64,7)
CG	77/196 (39,3)	78/258 (30,2)
GG	13/196 (6,6)	13/258 (5)

$\rho = 0.032$

CC: homocigoto para el alelo silvestre (citosina); heterocigoto;
GG: homocigoto para el alelo mutado (guanina).

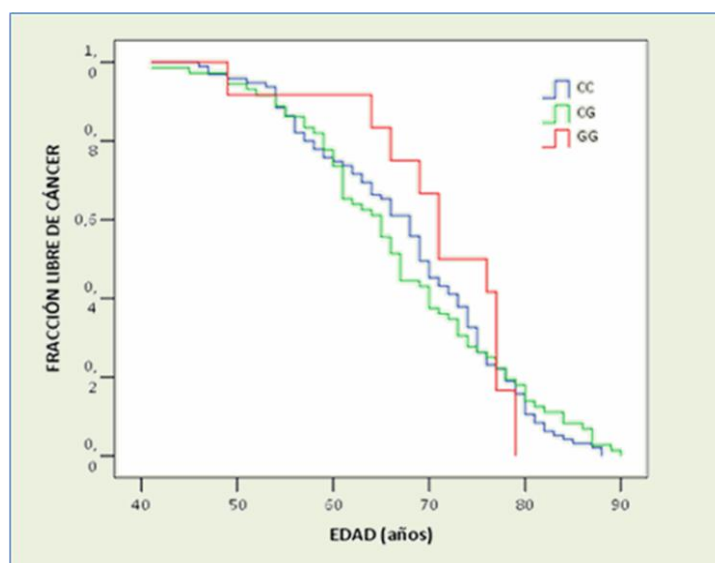


Figura 26: Supervivencia libre de enfermedad para la variante *OGG1*-S326C en la población CCR-ESP. Curva de Kaplan-Meier para los 3 genotipos distintos. Las medias de edad de diagnóstico son de $68,6 \pm 2,1$ (genotipo CC), $67,7 \pm 2,6$ (genotipo CG) y $71,2 \pm 4,9$ (genotipo GG).

1.2. Análisis del daño oxidativo

1.2.1. Análisis del espectro de mutaciones en los genes *KRAS* y *BRAF*

Se hizo un análisis de mutaciones somáticas en los exones 2, 3 y 4 del gen *KRAS* y en el exón 15 del gen *BRAF* en un total de 40 tumores de familias HNPCC-X y 17 tumores de pacientes *MUTYH* procedentes de Escocia.

No se detectaron mutaciones en el gen *BRAF* en ninguno de los tumores analizados.

Se detectaron mutaciones en 25 tumores HNPCC-X (anexo 10) y 7 tumores MUTYH (anexo 11).

Se detectaron mutaciones en los codones 12, 13, 50, 59 y 146 de *KRAS* concentrándose mayoritariamente en los codones 12 y 13. Las mutaciones encontradas en los codones 50 y 59 no se han encontrado descritas en la bibliografía. Se secuenció DNA genómico procedente de las sangres correspondientes a estos tumores para confirmar que los cambios encontrados son a nivel somático y no a nivel germinal (figura 27).

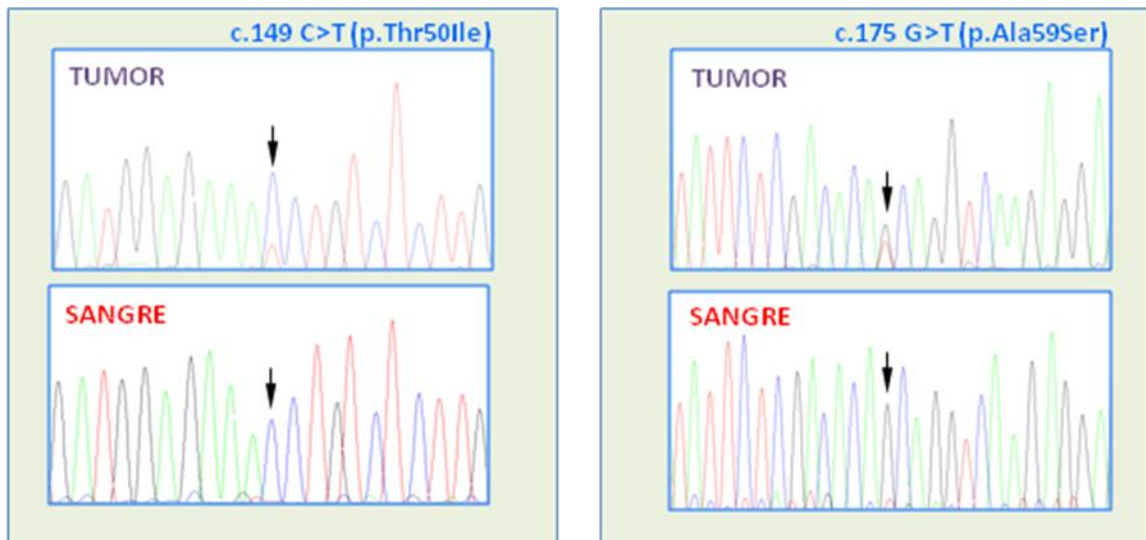


Figura 27: Secuencias de mutaciones somáticas en el gen *KRAS* detectadas en este trabajo y no descritas en la literatura.

En tres casos aparecen dobles mutaciones en *KRAS* (codones 12 y 50; 12 y 13; 12 y 12). En el tumor 99/7971F de la familia 43 (HNPCC-X) la doble mutación ocurre en el mismo codón 12 (GGT>TAT), para esclarecer si estos cambios ocurren en el mismo alelo, dando lugar a una nueva variante proteica (Gly12Tyr), o simplemente son dos cambios en distintos alelos (Gly12Cys y Gly12Asp), se analizó la muestra con el “kit TherasScreen” (DxS Ltd.), basado en la detección alelo específica de las 7 mutaciones más prevalentes del gen *KRAS* en los codones 12 y 13 mediante una PCR a tiempo real. El análisis confirmó que el tumor presentaba dos mutaciones en dos alelos distintos (Gly12Cys y Gly12Asp).

La frecuencia de mutaciones en el gen *KRAS* resultó ser más elevada en los tumores HNPCC-X (60%) que en los tumores portadores de mutación en *MUTYH* (47.1%) (figura 28a).

El espectro de mutaciones en *KRAS* resultó ser considerablemente distinto en ambas poblaciones (figura 28b). El tipo de cambio más representativo en la población HNPCC-X es el cambio G>A (52%) seguido por el cambio G>T (22%) y finalmente los cambios G>C (15%) y C>T (11%). En la población *MUTYH* aparece casi exclusivamente el cambio G>T (7/8) y además, solo aquellos tumores procedentes de pacientes portadores de mutación bialélica en *MUTYH* y diagnosticados de MAP mostraron mutación en *KRAS*.

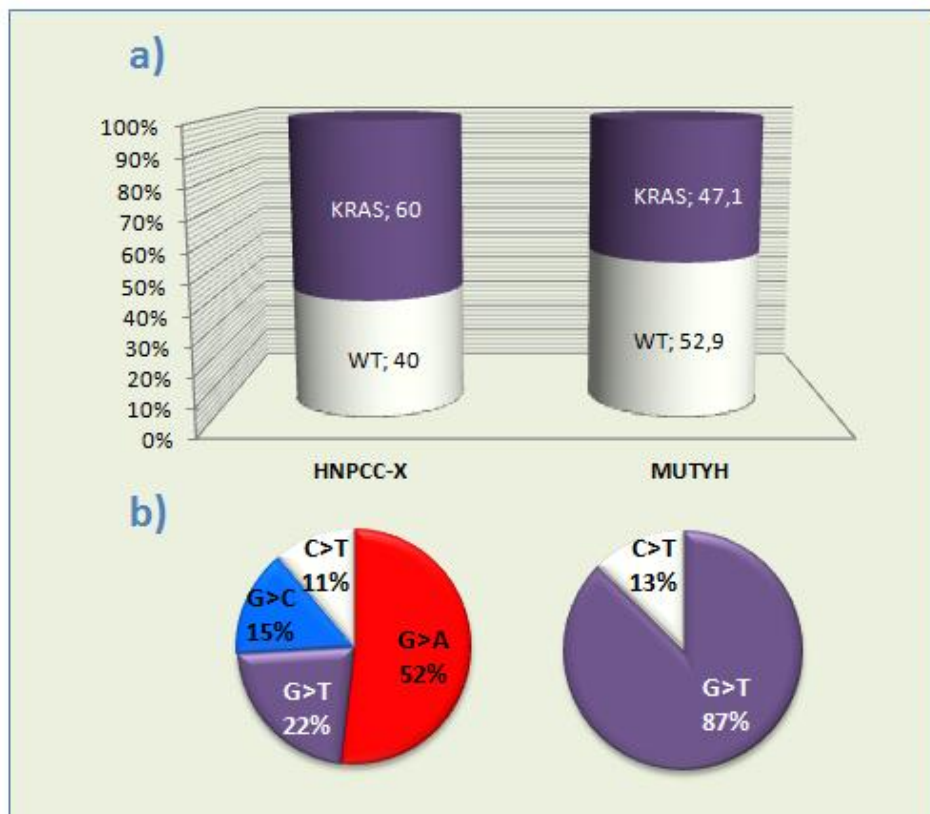


Figura 28: Frecuencia (a) y espectro (b) de mutaciones somáticas del gen *KRAS* en las poblaciones HNPCC-X de origen español y *MUTYH* de origen escocés.

1.2.2. Análisis de 8OHdG en tumores

Se analizaron los niveles de 8OHdG en tumores de cuatro poblaciones distintas: MUTYH (n=21), CCR esporádico-SC (n=5), HNPCC-MSI (n=47) y HNPCC-X (n=38). Para su estudio se emplearon técnicas de inmunofluorescencia en cortes completos de tumor en el caso de los tumores MUTYH y CCR esporádico-SC y en TMAs conteniendo cilindros tumorales de 1 mm de diámetro en el caso de los tumores HNPCC-MSI y HNPCC-X (ver sección 2.2.2). En cualquier caso, se halló el porcentaje de núcleos positivos para el nucleósido 8OHdG en áreas de tejido normal adyacente al tumor, tejido tumoral diferenciado y tejido tumoral indiferenciado siempre y cuando fuera posible visualizar estas zonas en cada muestra (figura 29).

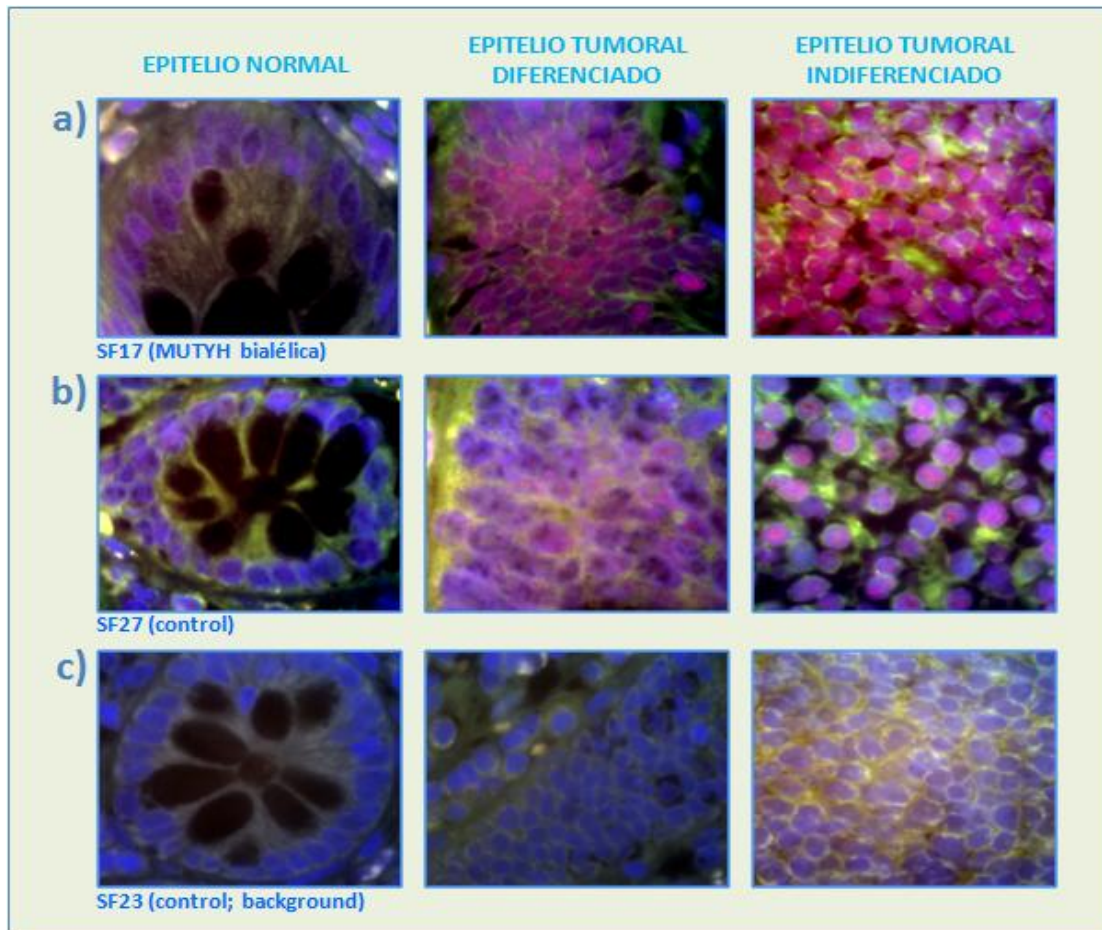


Figura 29: Detección de 8OHdG por inmunofluorescencia. Fotografías tomadas a 100x10 aumentos. Se muestran fotografías de 2 tumores distintos (**a** y **b**) tomadas en 3 áreas morfológicas distintas (epitelio normal adyacente al tumor, tumor diferenciado e indiferenciado). La muestra SF23 (**c**) se utilizó como control negativo de la técnica (mismo protocolo pero sin añadir anticuerpo primario).

Se pudieron obtener contajes para áreas no tumorales en un total de 25 pacientes, áreas de tumor diferenciado en 87 pacientes y áreas de tumor indiferenciado en 34 pacientes. Los datos totales para las distintas poblaciones analizadas se detallan en los anexos 12, 13 y 14.

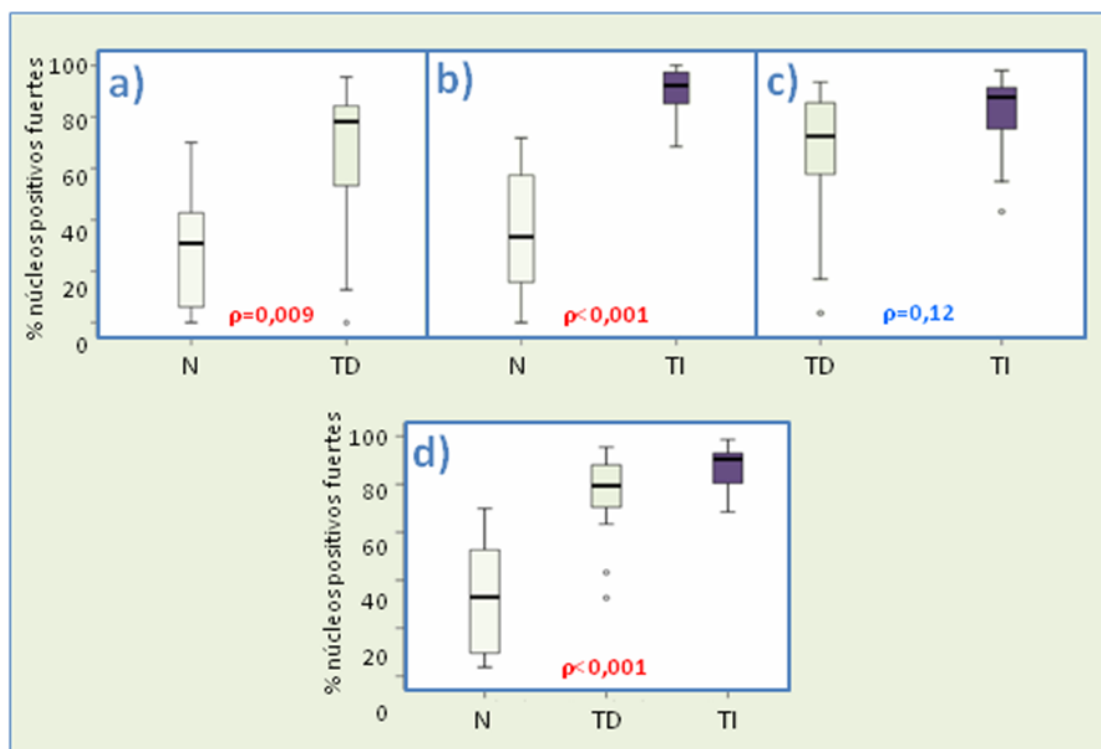


Figura 30: Estudio comparativo del porcentaje de núcleos positivos para 8OHdG en los tres tipos de morfología epitelial analizada. Se han tenido en cuenta aquellas parejas y/o tríos de distinta morfología que pertenecen a la misma muestra. **a)** Parejas de tejido epitelial normal y tumoral (n=19). **b)** Parejas de tejido epitelial normal y tumoral indiferenciado (n=19). **c)** Parejas de tejido epitelial tumoral y tumoral indiferenciado (n=21). **d)** Tríos de tejido epitelial normal, tumoral y tumoral indiferenciado (n=14).

Primero se estudiaron los niveles de 8OHdG según el grado de diferenciación tumoral. Para ello se consideraron conjuntamente las 4 poblaciones analizadas y se identificaron aquellos tumores en los que se pudieron hacer contajes en áreas de distinta morfología. De esta manera se encontraron 19 muestras que presentaron tanto áreas normales como de tumor diferenciado, 19 con áreas de tumor diferenciado e indiferenciado, 21 muestras con áreas normales y de tumor indiferenciado, y un total de 14 muestras que presentaron áreas con los tres tipos de morfología. Se compararon las medianas de los porcentajes de núcleos positivos para 8OHdG (figura 30)

observándose un aumento significativo de los niveles de 8OHdG según disminuye el grado de diferenciación celular ($p < 0,001$). Este aumento resultó ser mucho más marcado en el paso de epitelio normal a epitelio tumoral diferenciado (figura 30a) que en el paso de epitelio tumoral diferenciado a epitelio tumoral indiferenciado (figura 30b).

Tabla 11: Estudio comparativo de 8OHdG en núcleos de células de tejido tumoral de pacientes HNPCC-X, HNPCC-MSI, MUTYH y CCR esp-SC (controles esporádicos escoceses sin mutación detectada en línea germinal).

POBLACIÓN	N	EDAD DE Dx		MORFOLOGÍA	N	NÚCLEOS POS (%)	
		MEDIA	DT			MEDIANA	RQ
HNPCC-X	36	56,1	12,2	Normal	3	35,1	87,3
				T diferenciado	33	90,5	28
				T indiferenciado	3	96,6	6,9
HNPCC-MSI	39	41,6	12,9	Normal	2	1,1	2,1
				T diferenciado	33	87,2	22,6
				T indiferenciado	8	85,5	22,2
MUTYH-SC	21	50,9	8,4	Normal	19	33,3	37,6
				T diferenciado	17	79,3	21
				T indiferenciado	19	92,3	12,3
CCR esp-SC	5			Normal	1	5,5	
				T diferenciado	4	86,2	7,5
				T indiferenciado	4	89,1	11,1

N: tamaño de muestra; DT: desviación típica; RQ: rango intercuartílico; T: tumor

Posteriormente se pasó a comparar las cuatro poblaciones analizadas (tabla 11). Como es de esperar, se observó una edad de aparición del cáncer mucho más temprana en los tumores procedentes de familias HNPCC-MSI ($p < 0,001$) (figura 31). En cuanto a los niveles de 8OHdG en los distintos tipos de epitelio analizados, se observan unos niveles de núcleos positivos relativamente altos (mediana alrededor del 30%) en tejidos normales de tumores HNPCC-X y MUTYH mientras que en las muestras control y HNPCC-MSI apenas llegan al 5% (figura 32a). En tejido tumoral, independientemente del grado de diferenciación, estas diferencias no se aprecian (figura 32b y 32c).

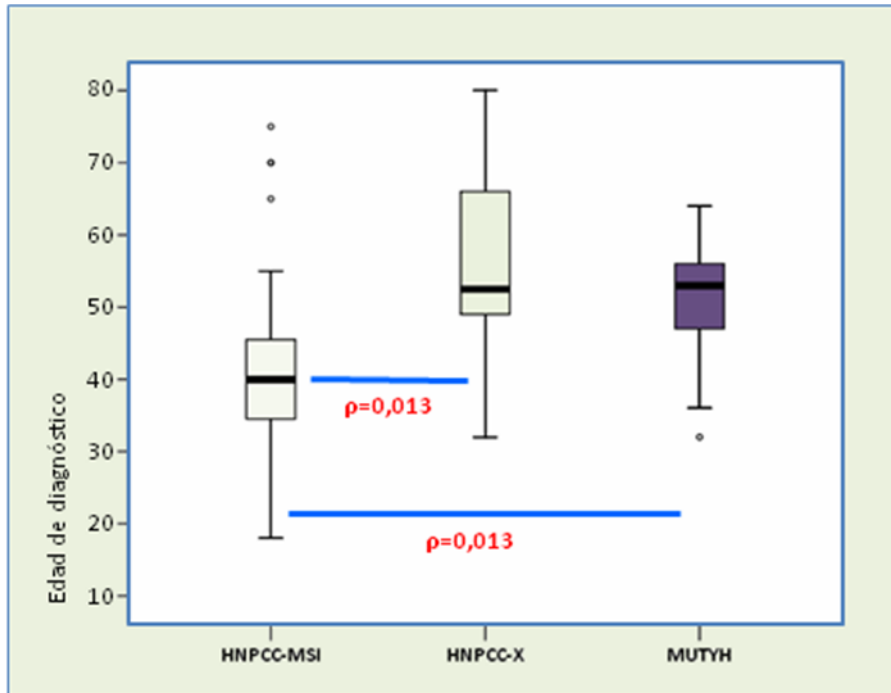


Figura 31: Comparación de la edad de diagnóstico de CCR en las tres poblaciones de estudio. ($p < 0.001$)

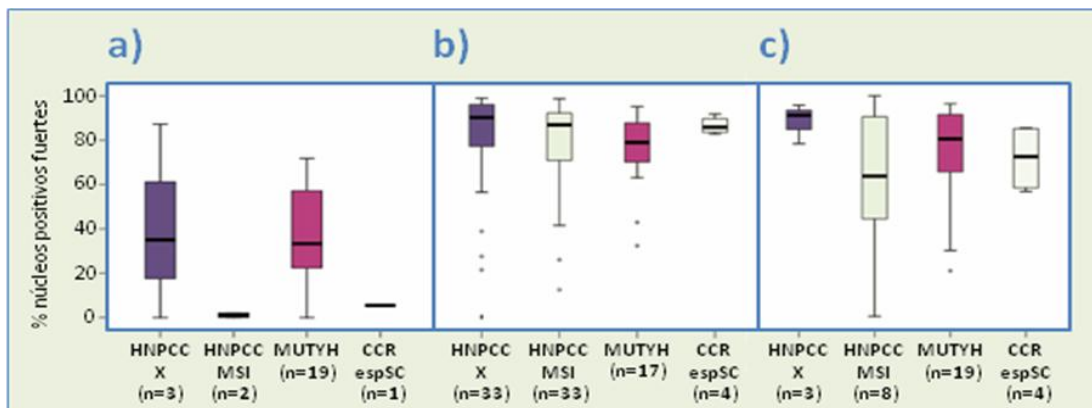


Figura 32: Estudio comparativo del porcentaje de núcleos positivos para 8OHdG entre las cuatro poblaciones analizadas. Tejido epitelial normal (a), tumoral diferenciado (b) e indiferenciado (c).

n: número de muestras

Finalmente se analizaron las poblaciones por separado.

Por un lado se clasificó la población MUTYH en tumores portadores de mutación monoalélica (7 tumores) o bialélica (14 tumores) en el gen *MUTYH*. No se encontraron diferencias en la edad de diagnóstico de CCR ni en el porcentaje de núcleos positivos para 8OHdG entre ambas subpoblaciones analizando cada una de las morfologías estudiadas (tabla 12).

Tabla 12: Estudio comparativo de 8OHdG en población MUTYH. Niveles de 8OHdG en tejido normal, tumoral diferenciado e indiferenciado según la dosis génica (mutación monoalélica (MONO) o bialélica (BI)).

MUTYH	N	EDAD Dx		MORF.	N	NÚCLEOS POS (%)	
		MEDIA	DT			MEDIANA	RQ
MONO	7	53	11,4				
				Normal	7	39,4	43,5
				T diferenciado	5	79,9	24
				T indiferenciado	6	92,5	10,1
BI	14	49,9	6,8				
				Normal	12	32,9	45,7
				T diferenciado	12	78,6	26,2
				T indiferenciado	13	92,3	15,4

N: tamaño muestral; DT: desviación típica; RQ: rango intercuartílico; T: tumor

Se analizó la posible influencia de las variantes *OGG1-S326C* y *MTH1-D142D* en los niveles de 8OHdG tanto en la población HNPCC-X como en la población HNPCC-MSI (tabla 13). Los tumores de cada población se reagruparon según su genotipo para estas variantes y se compararon las edades de diagnóstico (figura 34a) y los porcentajes de núcleos positivos para 8OHdG (figura 33b).

Tabla 13: Resumen descriptivo del estudio de 8OHdG en poblaciones HNPCC-X y HNPCC-MSI. Niveles de 8OHdG en núcleos de tejido tumoral diferenciado según su genotipo para las variantes *OGG1-S326C* y *MTH1-D142D*.

POBLACIÓN	VARIANTE	GENOTIPO	N	EDAD Dx		NÚCLEOS POS (%)	
				MEDIA	DT	MEDIANA	RQ
HNPCC-X	<i>OGG1-S326C</i>	CC	18	53,8	13,9	89,9	60,6
		CG	11	58,1	9	90,5	13,3
		GG	1	51		87,1	
	<i>MTH1-D142D</i>	CC	15	57,33	10,5	87,7	37,7
		CT	13	55,5	13,1	88,8	37,1
		TT	2	38,5	2,1	97,7	2
HNPCC-MSI	<i>OGG1-S326C</i>	CC	19	37,6	10,3	87,2	9,8
		CG	11	44,4	14,7	87,9	24,7
		GG	0				
	<i>MTH1-D142D</i>	CC	19	41,5	12,4	87,6	22,5
		CT	10	37,5	11,5	86,9	23,1
		TT	1	50		87,2	

N: tamaño muestral; DT: desviación típica; RQ: rango intercuartílico, *OGG1-S326C*: C-alelo silvestre; G-alelo mutado, *MTH1-D142D*: C-alelo silvestre; T-alelo mutado

No se encontraron diferencias en cuanto a la edad o a los niveles de 8OHdG para los distintos genotipos de la variante *OGG1-S326C*. Sin embargo, los tumores HNPCC-X homocigotos para el alelo raro (TT) de la variante *MTH1-D142D* mostraron una edad media de diagnóstico significativamente más temprana que los no portadores ($p=0,026$) (figura 33a) y una tendencia al aumento de los niveles de 8OHdG (figura 33b). Estas diferencias en la edad y en los niveles de 8OHdG no se observaron en la población HNPCC-MSI.

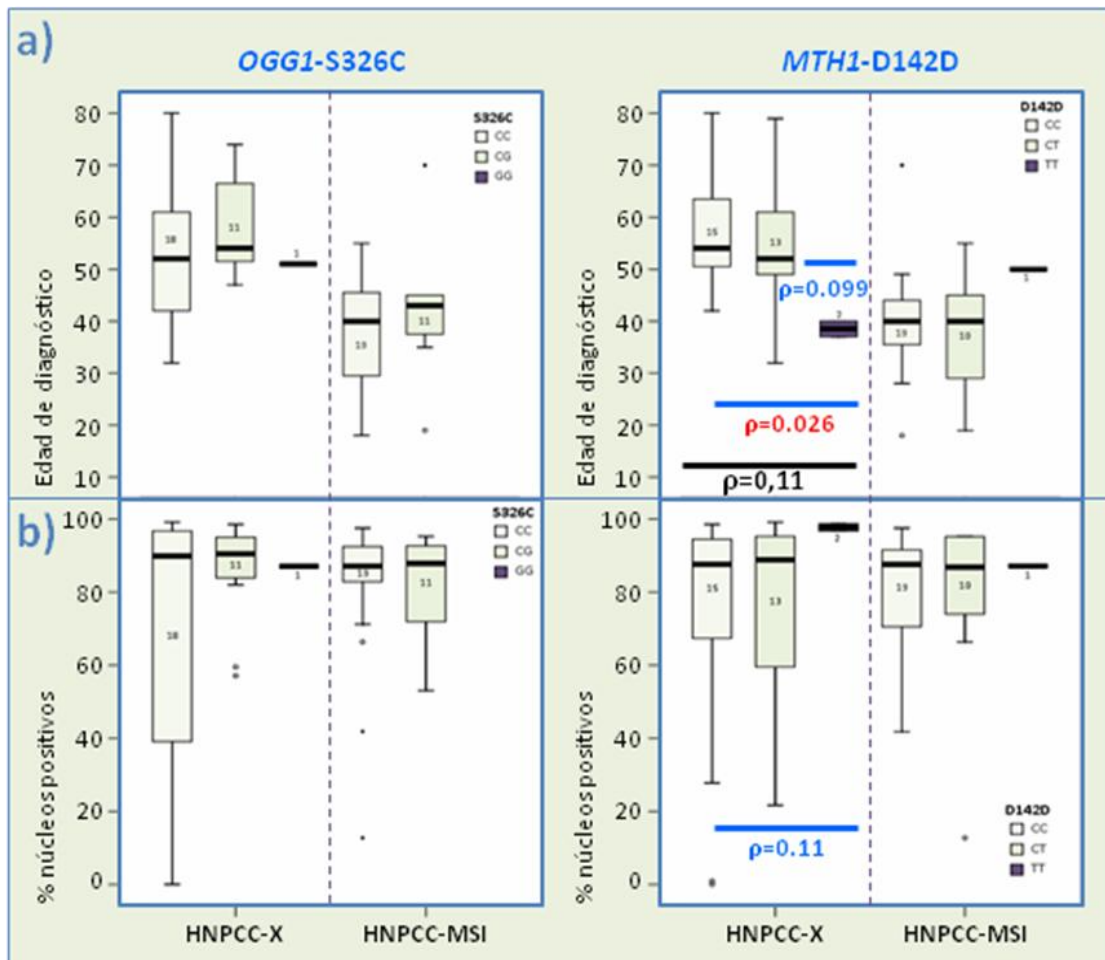


Figura 33: Estudio comparativo de 8OHdG en las distintas subpoblaciones de tumores HNPCC-X y HNPCC-MSI según su genotipo para las variantes *OGG1-S326C* y *MTH1-D142D*. a) Comparación de la edad de diagnóstico de CCR. b) Comparación del porcentaje de núcleos positivos para 8OHdG. Los tamaños muestrales se indican dentro de cada caja

OGG1-S326C: CC: homocigoto salvaje; GG: homocigoto mutado; CG: heterocigoto
MTH1-D142D: CC: homocigoto salvaje; TT: homocigoto mutado; CT: heterocigoto

2. ESTUDIO DE LA VÍA WNT

Se analizó la expresión de β -catenina, ciclina D1, c-myc y foxO3a en los dos TMAs que contienen tumores HNPCC-X y HNPCC-MSI (ver sección 2.2.2). En total se obtuvieron resultados valorables para al menos alguno de los anticuerpos testados en 38 tumores HNPCC-X y 41 tumores HNPCC-MSI. De éstos, 33 tumores HNPCC-X y 34 tumores HNPCC-MSI pudieron ser valorados para los 4 anticuerpos. Ejemplos de tumores incubados con los distintos anticuerpos se muestran en la figura 35. Los resultados de cada análisis para las dos poblaciones se muestran en los anexos 15 y 16.

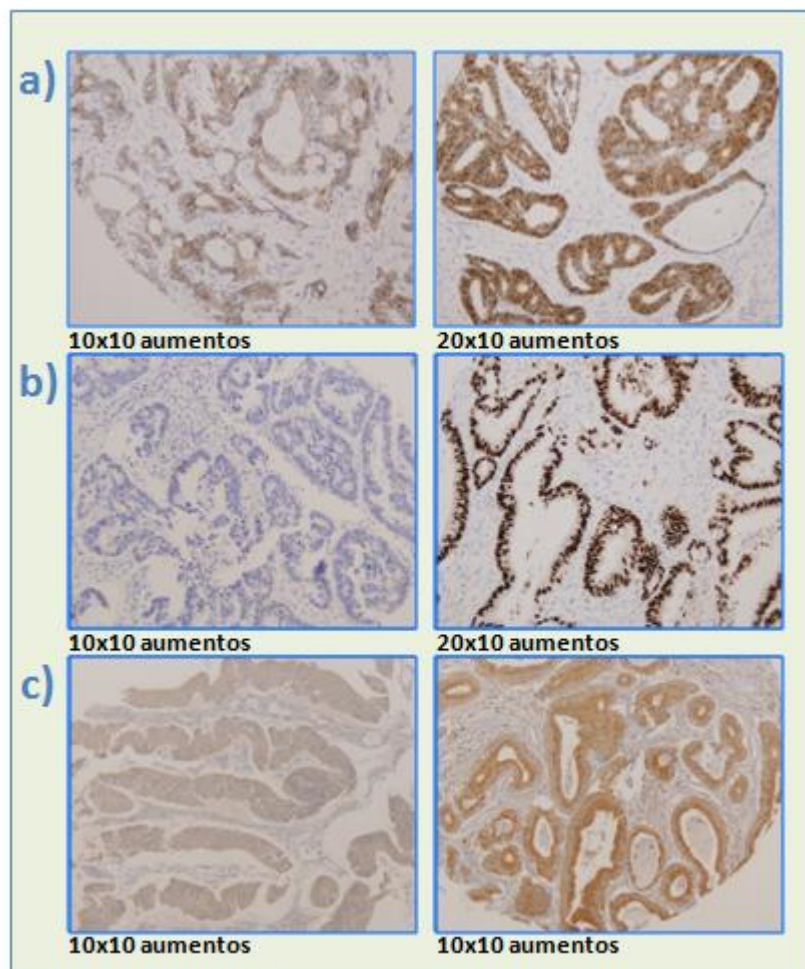


Figura 34: Análisis mediante inmunohistoquímica de la expresión de proteínas implicadas en la vía Wnt. Fotografías de tumores con expresión negativa y positiva para las proteínas **a)** β -catenina, **b)** ciclina D1 y **c)** c-myc.

Las diferencias en la expresión de cada proteína entre los dos grupos de tumores se resumen en la tabla 14 y gráficamente en la figura 35. β -catenina y foxO3a mostraron mayor expresión en el grupo de tumores HNPCC-X. Ciclina D1 mostró mayor expresión en el grupo de tumores HNPCC-MSI. C-myc no mostró grandes diferencias entre los dos grupos.

Tabla 14: Resumen del estudio de expresión de proteínas implicadas en la vía Wnt en tumores HNPCC-X y HNPCC-MSI.

PROTEINA	HNPCC-X (positivos/totales)	HNPCC-MSI (positivos/totales)	OR	IC (95%)
β -catenina	13/38	5/37	3,33	1,05-10,58
ciclina-D1	13/34	24/37	0,33	0,13-0,88
c-myc	23/37	28/40	0,7	0,27-1,82
foxO3a	6/37	1/38	7,16	0,82-62,73

OR: *odd ratio*, IC: interval de confianza

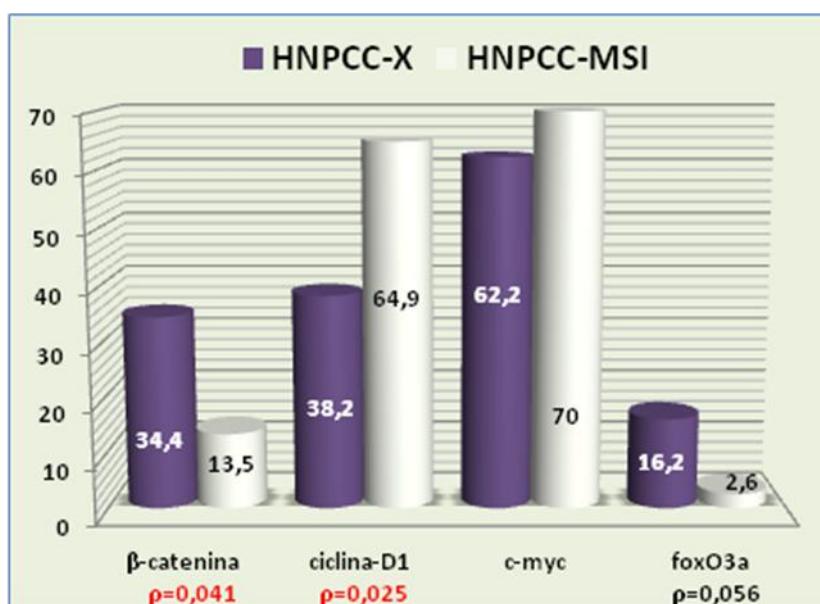


Figura 35: Diferencias en la expresión de distintas proteínas implicadas en la vía Wnt entre las poblaciones HNPCC-X y HNPCC-MSI.

Se analizó la posible influencia de la expresión de cada una de las proteínas con respecto a las demás (tabla 15). De esta tabla cabe resaltar la fuerte interacción positiva entre β -catenina y ciclina-D1 en los tumores HNPCC-X que sugiere invertirse en tumores HNPCC-MSI.

Tabla 15: Interacción en la expresión de las proteínas implicadas en la vía Wnt en tumores HNPCC-X y HNPCC-MSI. Se muestra el riesgo para la expresión conjunta de pares de proteínas.

POBLACIÓN HNPCC-X				
	β -catenina	ciclina-D1	c-myc	foxO3a
β -catenina	1	-	-	-
ciclina-D1	6,8 (1,43-32,37)	1	-	-
c-myc	1,33 (0,31-5,64)	0,58 (0,14-2,41)	1	-
foxO3a	4,89 (0,76-31,6)	2,7 (0,38-18,96)	0,37 (0,05-2,54)	1
POBLACIÓN HNPCC-MSI				
	β -catenina	ciclina-D1	c-myc	foxO3a
β -catenina	1	-	-	-
ciclina-D1	0,79 (0,11-5,53)	1	-	-
c-myc	nd	1,52 (0,37-6,29)	1	-
foxO3a	nd	nd	nd	1

nd: sin datos suficientes para estimar el riesgo

Finalmente se analizaron las dos poblaciones en función del número de proteínas con expresión positiva y la combinación de estas proteínas expresadas (figura 36).

La figura 36a representa todas las combinaciones de proteínas con expresión positiva encontradas en los dos grupos de tumores analizados. Se puede observar que en el grupo HNPCC-X la mayoría de los tumores mostraron expresión única de c-myc (n=9) o incluso ninguna proteína (n=5). El siguiente grupo más representativo sería el formado por los tumores con expresión conjunta para β -catenina, ciclina D1 y c-myc (n=4).

En el grupo de tumores HNPCC-MSI, se observa que la expresión de ciclina D1 y c-myc es muy frecuente tanto de manera conjunta (n=12) como, aunque en menor medida, de manera independiente (n=7 y n=5 respectivamente). Cabe resaltar en estos tumores la escasa expresión de β -catenina y foxO3a.

La figura 36b representa bloques de tumores que muestran expresión positiva para, al menos, las proteínas señaladas en la leyenda de la derecha. Sería la gráfica acumulada de la anterior. Con esta gráfica se pueden observar varias cosas. Se observa una alta expresión de c-myc y ciclina-D1 en ambos grupos de tumores. β -catenina está más representada en los tumores HNPCC-X y parece correlacionarse con la expresión de c-myc y ciclina D1 mientras que en HNPCC-MSI no se observa apenas expresión de β -catenina. También se sugiere una mayor expresión de foxO3a en tumores HNPCC-X.

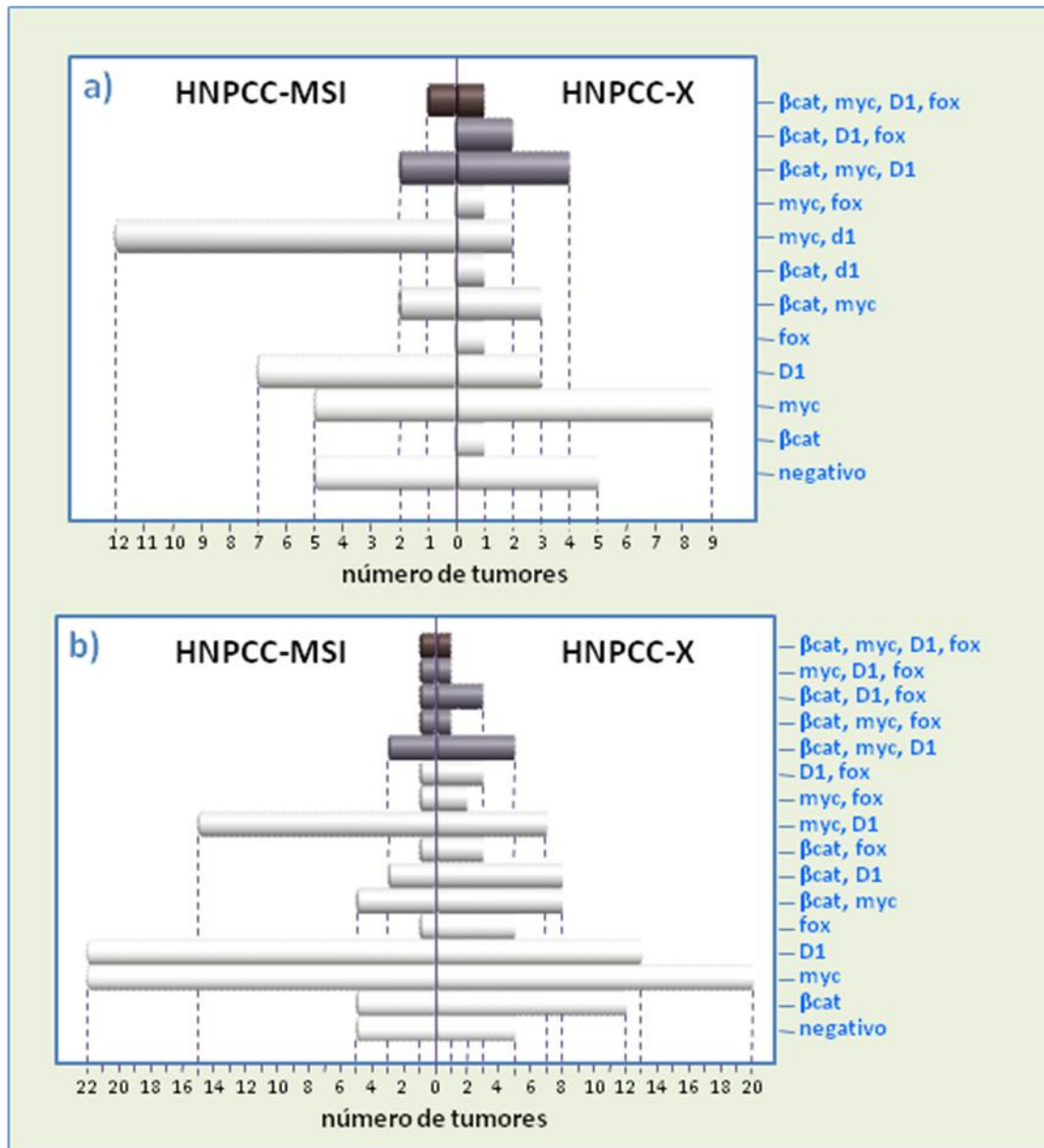


Figura 36: Interacción entre las distintas proteínas analizadas en tumores HNPCC-X y tumores HNPCC-MSI. a) Se muestran todas las combinaciones de proteínas positivas detectadas y el número de tumores que las presentan en cada población de estudio. b) Gráfica acumulada del número de tumores positivos para las distintas combinaciones de proteínas independientemente del resto. Cada bloque representa el número de tumores positivos para esa combinación.

βcat: β-catenina; myc: c-myc; D1: ciclina D1; fox: foxO3a. Los colores representan el número de proteínas positivas en cada combinación:

- 4 proteínas positivas, ■ 3 proteínas positivas, □ 2 proteínas positivas,
- 1 proteínas positiva, □ ninguna proteína positiva.

3. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS YIN-YANG EN EL GEN APC

El propósito de este estudio de asociación es intentar detectar posibles diferencias en la distribución de diplotipos Yin-Yang del gen *APC* entre las distintas poblaciones de estudio. Se pretende establecer hasta que punto la similitud entre alelos puede actuar como factor de riesgo en CCR al favorecer los procesos de recombinación homóloga. Para ello se estudió el diplotipo Yin-Yang del gen *APC* en 2 poblaciones distintas de CCR (HNPCC-X y CCR-ESP-MSS) y se compararon con una población control libre de cáncer.

Para establecer el diplotipo Yin-Yang en las poblaciones HNPCC-X, CCR-ESP y control, se genotiparon los SNPs marcadores rs2019720, rs2431512 y rs2546108. Se comprobó que cada uno de los SNPs cumpliera el equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control ($p > 0,17$; $p > 0,19$ y $p > 0,17$).

Se analizaron las frecuencias de los distintos haplotipos formados por la combinación de estos tres SNPs (tabla 16) comprobándose que los dos haplotipos Yin-Yang representaban a la mayoría de los haplotipos encontrados en las tres poblaciones (más del 95%). No se observaron diferencias significativas en cuanto a la distribución de haplotipos Yin-Yang entre las tres poblaciones.

Tabla 16: Frecuencia de haplotipos en el gen *APC* en las poblaciones HNPCC-X, CCR esporádico-MSS y control.

POBLACIÓN	N	YIN (GTA) N (%)	YANG (ACC) N(%)	OTROS N (%)
HNPCC-X	70	40 (57,2)	29 (41,4)	1 (1,4)
CCR-ESP-MSS	314	166 (52,9)	146 (46,5)	2 (0,6)
CONTROL	810	418 (51,6)	379 (46,8)	13 (1,6)
TOTAL	1194	624 (52,3)	554 (46,4)	16 (1,3)

N: número de muestras

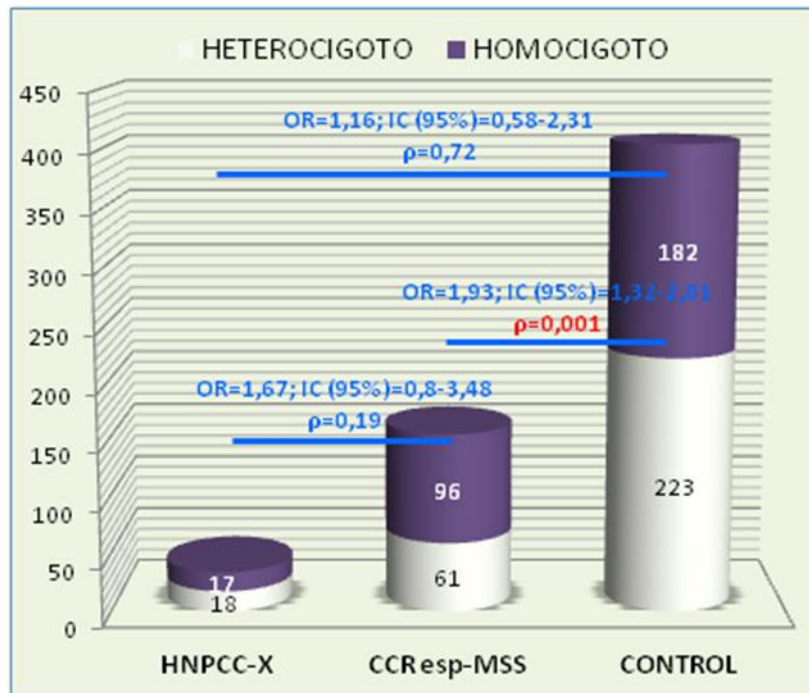
Tabla 17: Estudio caso-control de la distribución del diplotipo Yin-Yang en el gen *APC* en las poblaciones HNPCC-X, CCR esporádico-MSS y la población control del HCSC.

POBLACIÓN	N	HOMOCIGOTO			HETEROCIGOTO YIN/YANG	p-valor
		YIN (GTA)	YANG (ACC)	TOTAL		
HNPCC-X	35	11 (31,5)	6 (17,1)	17 (48,6)	18 (51,4)	ns
CCR-ESP-MSS	157	53 (33,8)	43 (27,4)	96 (61,2)	61 (38,9)	0,001
CONTROL	405	101 (24,9)	81 (20)	182 (44,9)	223 (55,1)	

N: número de muestras

Posteriormente, cada muestra se dividió en dos subgrupos según fuesen homocigotas o heterocigotas para el diplotipo Yin-Yang. Los diplotipos portadores de haplotipos raros se consideraron como heterocigotos ya que en ningún caso se encontraron en homocigosis. La distribución de diplotipos en las 3 poblaciones de estudio se muestra en la tabla 17 y el análisis estadístico en la figura 37. Se observa un aumento significativo en la distribución de diplotipos homocigotos en las muestras CCR-ESP-MSS (OR= 1,93; IC (95%)= 1,32-2,81; $p=0,001$) con respecto a la población control libre de cáncer. Este aumento no se detecta en la población HNPCC-X observándose una distribución semejante a la población control.

Figura 37: Distribución de diplotipos del gen APC en las distintas poblaciones de estudio.



DISCUSIÓN

1. JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DEL ESTUDIO DE FAMILIAS HNPCC-X

Como ya se comentó en la Introducción de este trabajo, el grupo de familias clasificadas como HNPCC-X que se aborda en este estudio es un grupo importante y problemático en las Consultas de Consejo Genético.

Es importante porque su incidencia es muy alta dentro de las familias clasificadas como Amsterdam I/II. En nuestro laboratorio llegan a ser el 35,5% de las familias que cumplen criterios Amsterdam (ver figura 11) y en otras poblaciones se han descrito incidencias similares o incluso más altas alcanzo al 60% de las familias clasificadas como Amsterdam [58-61, 64] (tabla 3).

Es un grupo problemático porque no se conocen las causas moleculares de su susceptibilidad al cáncer, lo que implica que no se puedan identificar individuos de alto y bajo riesgo y por lo tanto no se puedan personalizar estrategias de seguimiento ni profilaxis.

Es por tanto de gran interés, identificar las causas subyacentes a la susceptibilidad al cáncer en este grupo de familias. Desde el punto de vista molecular ayudaría a entender la carcinogénesis colorrectal mediante la identificación de nuevas vías o formas de inestabilidad y así poder ofrecer nuevas dianas terapéuticas. Desde el punto de vista clínico, la identificación de factores de susceptibilidad en estas familias permitiría identificar pacientes de alto riesgo que se pudiesen beneficiar de un seguimiento más exhaustivo y de la toma de medidas profilácticas.

2. APROXIMACIÓN A LA BÚSQUEDA DE ALELOS DE SUSCEPTIBILIDAD EN FAMILIAS HNPCC-X

Lindor y colaboradores [58] postularon que las familias clasificadas como HNPCC-X englobarían a un grupo heterogéneo de familias formado por algunos casos de agregación, bien debidos al azar o bien debidos a factores ambientales compartidos, y también por familias portadoras de alelos de alta, moderada y/o baja penetrancia aún por definir.

Esta hipótesis explicaría por qué aún no se han detectado alelos de alta penetrancia implicados en la susceptibilidad al cáncer en estas familias. Su

representación posiblemente sea escasa en el grupo dificultando así su detección por estudios de ligamiento.

Gracias al avance de la tecnología, hoy en día es posible secuenciar el exoma completo, lo que sería una estrategia muy atractiva para la búsqueda de alelos de alta penetrancia ya que no se requiere una selección previa de genes candidatos y estaríamos analizando una buena parte del exoma en tan solo un experimento.

Debido a la falta de disponibilidad de esta técnica en el momento de la realización de este trabajo, se escogió la estrategia de genes candidatos para intentar identificar posibles alelos de alta penetrancia en cada una de las familias seleccionadas.

La estrategia de genes candidatos también es adecuada para detectar posibles genes de moderada penetrancia. Estos genes, debido a su penetrancia incompleta tampoco podrían ser detectados mediante estudios de ligamiento.

Por otro lado, algunas de las familias HNPCC-X podrían estar afectadas por combinaciones de alelos de baja penetrancia que fuesen los responsables, directa o indirectamente, de la susceptibilidad al cáncer. En estos casos, la aproximación más adecuada para estimar el riesgo de estos alelos serían los estudios de asociación entre casos y controles, bien basados en una previa selección de genes candidatos, o bien mediante técnicas que cubran una buena parte del genoma como son los famosos estudios GWAS [30].

3. BÚSQUEDA DE VARIANTES EN LOS GENES *OGG1*, *MUTYH* Y *MTH1* EN FAMILIAS HNPCC-X

El primer objetivo de este trabajo se centra precisamente en el estudio de tres genes candidatos implicados en la reparación de la 8OHdG en 42 casos índices de familias HNPCC-X.

Se escogieron estos genes como candidatos por varias razones:

1.- Son genes reparadores que podrían actuar como genes supresores de tumor. Su déficit impediría la reparación de la 8OHdG dando lugar a un aumento en la tasa de mutaciones G>T [26]. Estaríamos hablando entonces de una inestabilidad genética que en última instancia podría desencadenar un proceso carcinogénico.

- 2.- El gen *OGG1* se localiza en la región 3p26.2 [83], la cual muestra LOH en varios tipos de tumores [84].
- 3.- Se han descrito líneas celulares de cáncer colorrectal MSS y CIN(-) que presentan un aumento en la tasa de transversiones acompañado de altos niveles de 8OHdG y deficiencia en su reparación [85, 86].
- 4.- El gen *MUTYH*, implicado en la reparación de la 8OHdG, se ha asociado a poliposis MAP en pacientes con mutación bialélica en línea germinal [28].
- 5.- Se han encontrado variantes en los genes *OGG1*, *MUTYH*, y *MTH1* asociadas a distintos tipos de tumores sugiriendo un posible papel de estas variantes como factores de riesgo en ciertas poblaciones [41, 88, 91-98].
- 6.- Hay pocos estudios de asociación entre polimorfismos en estos genes y el cáncer colorrectal. Estudios en población escocesa encuentran asociación entre variantes monoalélicas en el gen *MUTYH* y CCR [41]. Varios estudios de asociación se han hecho entre la variante *OGG1-S326C* y CCR en distintas poblaciones mostrando resultados controvertidos [99-105].

Para llevar a cabo nuestro objetivo se analizaron las secuencias codificantes y uniones intrón-exón en 42 casos índice de familias HNPPC-X seleccionadas. Este análisis reveló la presencia de 13 variantes distintas (ver tabla 7) (5 en el gen *OGG1*, 3 en *MTH1*, y 5 en *MUTYH*) en un total de 40 familias (95%). De estas variantes, 8 presentaron una frecuencia inferior al 5% y por lo tanto se clasificaron como raras, y 5 mostraron frecuencias mayores del 5% clasificándose como variantes frecuentes.

Se intentó profundizar en el estudio de cada una de estas variantes con el fin de establecer una posible implicación en la susceptibilidad al cáncer de la población de estudio HNPPC-X.

3.1. Variantes raras

Para indagar sobre el posible carácter patogénico de cada una de las variantes raras encontradas se hicieron distintos análisis *in silico* y análisis de segregación en cada familia afectada. Finalmente se encontraron tres variantes raras (*MUTYH-G396D*, *OGG1-G308E* y *OGG1-R46Q*) que potencialmente podrían actuar como factores de riesgo en las familias afectadas ya que las tres

provocan cambios de aminoácidos en posiciones altamente conservadas y los programas *in silico* utilizados predijeron una alta probabilidad de daño patogénico en la función y/o estructura de las proteínas correspondientes.

La familia CC-19 presenta la variante *MUTYH*-G396D. Es una variante patogénica que muestra una menor capacidad de reconocimiento y unión a los pares A:8OHdG y una actividad reparadora reducida [121]. Esta variante ha sido descrita como mutación patogénica recesiva asociada a MAP [28, 122, 123], y como variante de riesgo asociada a heterocigotos [41, 124, 125]. Además, se ha sugerido que mutaciones monoalélicas en *MUTYH* puedan actuar como genes de baja penetrancia en familias HNPCC-X [126]. Nuestro estudio de segregación de dicha variante en la familia CC-19 (ver figura 20) apoya la hipótesis de que la variante en heterocigosis podría estar incrementando el riesgo a desarrollar CCR en la familia afectada.

Esta misma familia presentó otra variante en la vía BER, *OGG1*-A95A, variante no descrita en la bibliografía que no implica cambio de aminoácido, ni alteración en el *splicing*, ni se observa segregación con la enfermedad, por lo que se descarta su papel como factor de riesgo.

Se ha encontrado la variante *OGG1*-G308E en la familia CC-CH6 en la cual no se han podido llevar a cabo estudios de segregación por falta de muestras. Esta variante ha sido descrita en un tumor de cabeza y cuello [89] y en un tumor renal [88]. Aunque un estudio previo de actividad enzimática no muestra diferencias respecto a la proteína silvestre [89] no se puede descartar un posible efecto patogénico debido a otras causas como localización o estabilidad.

La variante *OGG1*-R46Q se ha encontrado en la familia CC-298 clasificada como alto riesgo (ver figura 21). Esta variante afecta al último nucleótido del exón 1 de *OGG1*, el cual codifica para un aminoácido conservado. Los análisis *in silico* empleados sugirieron tanto una alta probabilidad de daño en la función y/o estructura de la proteína como una alta probabilidad de alteración del *splicing*. En la literatura se ha descrito esta misma variante en homocigosis en una línea celular de cáncer de pulmón [96] y en un tumor renal [88]. También se ha encontrado en heterocigosis en DNA genómico de pacientes con cáncer de pulmón [127].

Varios estudios sugieren un efecto patogénico de esta variante. Por un lado se han publicado estudios funcionales de complementación y actividad enzimática mostrado siempre una disminución significativa con respecto a la actividad de la proteína silvestre [88, 96, 128, 129]. También hay descrito un estudio de simulación proteica donde se predice una expansión de la cavidad del centro activo que podría ser la causa de la disminución de actividad en esta variante [130].

A nivel de DNA, el cambio consiste en una mutación puntual que afecta al último nucleótido del exón 1 de *OGG1*, nucleótido contenido en la secuencia consenso del donador de *splicing*. Estudios anteriores han confirmado una inactivación del donador de *splicing* i1 dando lugar a transcritos que retienen el intrón 1 completo originándose un codón de parada prematuro [88, 96] y por tanto el truncamiento de la proteína. Estos estudio analizan los transcritos de *OGG1* en DNA tumoral homocigoto para el cambio y ambos observan la presencia de transcrito aberrante y también de transcrito normal, justificándolo como una inactivación parcial, y no total, del donador de *splicing* [96] o por contaminación de tejido normal adyacente al tumor [88].

En este trabajo se ha profundizado un poco más en el *splicing* de pacientes portadores de R46Q. Hemos analizado el cDNA procedente de leucocitos de individuos portadores en heterocigosis de la variante. Hemos podido detectar la presencia del transcrito aberrante que contiene la secuencia del intrón 1 completa pero solo a través del uso de cebadores específicos, lo que nos hace pensar que o bien la expresión de este transcrito es muy baja, o bien el transcrito esté siendo degradado probablemente por el mecanismo NMD. Por otra parte se ha observado una inactivación total del donador de *splicing* i1 por parte del alelo mutado (c.137A) dando lugar a una expresión monoalélica de transcrito normal por parte del alelo silvestre. Con estos datos se pone de manifiesto que en condiciones de heterocigosis prácticamente el alelo silvestre (c.137G) es el único que contribuye a la expresión del transcrito normal de *OGG1* siendo la contribución del alelo mutado (c.137A) despreciable. Probablemente la falta de expresión de uno de los alelos provoque una disminución en los niveles de transcrito *OGG1* y esto podría afectar al funcionamiento de la proteína agudizándose en situaciones de estrés oxidativo donde la demanda de actividad de *OGG1* sería mayor.

Poco después de la publicación de los datos que se presentan en esta tesis [131], se publicó un trabajo donde se sugiere una susceptibilidad al CCR debida a una herencia digénica de esta misma variante junto con otra variante en *MUTYH* en un caso de CCR diagnosticado a una edad muy temprana (36 años) [132]. Nosotros hemos llevado a cabo estudios de segregación en la familia afectada y la variante se mostró en los 2 familiares afectados de CCR analizados y en otro familiar más con cáncer de ovario diagnosticado a los 48 años. Hay que señalar que el cáncer de ovario, aunque no se tiene en cuenta en los criterios clínicos Amsterdam II (ver tabla 2), sí se ha visto relacionado con familias diagnosticadas de Síndrome de Lynch y se considera como un cáncer asociado en los criterios de Bethesda (ver tabla 2). La variante muestra una penetrancia incompleta presentándose también en 4 individuos sanos y mayores de 50 años. Este patrón de herencia podría ser compatible con un alelo de penetrancia moderada. Al igual que sugiere el estudio de Morak [132], podría tratarse de un modelo de herencia digénica u oligogénica. En este caso, no se han encontrado variantes en los genes *MTH1* y *MUTYH*, pero no hay que descartar la posibilidad de que otros genes distintos a los estudiados podrían afectar a la susceptibilidad al CCR en combinación con *OGG1*-R46Q. Entonces, sería conveniente pensar en el análisis de otros genes distintos implicados en la vía BER o en otras vías implicadas en el estrés oxidativo en esta familia. Tampoco hay que descartar una herencia monogénica de moderada penetrancia unida a factores ambientales.

Los primeros autores que describieron esta variante en una línea celular de cáncer de pulmón, analizaron la presencia de R46Q en 45 DNAs genómicos procedentes de pacientes sanos sin encontrarla [96], Morak y colaboradores la analizan en 70 controles sin encontrarla [132]. Nosotros la hemos analizado en una serie de 367 controles sanos y la hemos encontrado en 8 pacientes (aproximadamente equivale a una frecuencia alélica del 1%). La población control seleccionada consiste en una serie de pacientes provenientes de la sala de extracciones del hospital sin historia personal de cáncer. Debido a la gran incidencia de cáncer en nuestra sociedad no se preguntó por la historia familiar ya que podríamos caer en un sesgo seleccionando individuos que puedan tener factores protectores. Por este motivo, al ver los resultados de la variante R46Q en controles se miraron las historias de cada uno de los pacientes control que presentaron la variante. Se pudo comprobar que 3 de los controles portadores

de R46Q tenían familiares en primer grado afectados de tumores digestivos, otros 2 tenían familiares en segundo grado con tumores digestivos, y 1 tenía tan solo 25 años. Estos 6 controles, además presentaban edades inferiores a los 60 años, edades que se sitúan alrededor de la edad media de diagnóstico de cáncer en las familias HNPCC-X de este trabajo ($56,7 \pm 6,3$ años). Por lo tanto, la variante *OGG1-R46Q* sigue siendo una buena candidata como factor de riesgo al CCR de moderada penetrancia en este grupo de familias.

3.2. Variantes frecuentes

Para indagar sobre el posible papel como alelos de moderada o baja penetrancia en las variantes frecuentes encontradas, se llevaron a cabo estudios de asociación entre casos y controles en tres poblaciones distintas de cáncer colorrectal: familias HNPCC-X, familias HNPCC-MSI y una población seriada de casos esporádicos de CCR.

La variante *MTH1-D142D* es la única variante que mostró asociación con el riesgo a desarrollar CCR en familias HNPCC-X cuando se compararon en ambos grupos tanto las frecuencias alélicas ($OR=2,23$; $p=0,003$) como los genotipos ($OR=2,77$; $p=0,003$). La primera pregunta que surgió tras este resultado fue si el efecto de la variante sobre el riesgo era dominante o recesivo. Entonces se realizó un estudio de la dosis génica comparando las frecuencias de los diferentes genotipos de la variante D142D en casos HNPCC-X y controles. Se observó un aumento significativo del riesgo según aumentaba la dosis génica ($p=0,009$) (ver tabla 9). Es decir; el riesgo a desarrollar cáncer en individuos portadores en heterocigosis de la variante *MTH1-D142D* resultó ser 2,61 veces más alto que en individuos no portadores, y este riesgo es aún mayor (3,66 veces más que en no portadores) en individuos homocigotos para la variante. Otra pregunta que nos planteamos entonces era si, además de aumentar el riesgo, también se adelantaba la edad de aparición del cáncer. Analizando la supervivencia libre de cáncer para los distintos genotipos de la variante en individuos pertenecientes a familias HNPCC-X se observa que individuos heterocigotos para la variante no presentan diferencias en la edad de aparición del cáncer respecto a los individuos no portadores, pero en cambio, los

individuos homocigotos muestran un adelanto de 9 años en la edad media de aparición del cáncer ($p=0,036$) (ver figura 25).

El riesgo tan alto que muestra esta variante, y su incremento en homocigotos, es sorprendente en una variante que se presenta en el 20% de la población control libre de cáncer. Se puede pensar en varias razones que puedan explicar este suceso. Podría tratarse de una mutación de moderada o alta penetrancia que se haya originado en un alelo portador de la variante D142D y por lo tanto se encuentren en ligamiento. De esta manera los individuos portadores de la mutación causante mostrarían la variante polimórfica D142D pero no todos los portadores del polimorfismo serían portadores de la mutación. Otra explicación sería que la variante D142D, bien directamente o indirectamente, elevaría el riesgo a desarrollar cáncer colorrectal solo cuando se presenta en combinación con otra u otras variantes en otros genes distintos, estaríamos hablando entonces de una herencia digénica u oligogénica que estuviese afectando a este grupo de familias.

La variante *MTH1*-D142D se describió por primera vez en DNA germinal de familias HNPCC-MSS [133] pero no se profundizó en su estudio. Solo hay un estudio de asociación descrito para esta variante en pacientes con cáncer de cabeza y cuello [90], en él los autores no encuentran asociación tras analizar la variante en 29 casos y 30 controles.

Los resultados de nuestro estudio muestran una MAF en torno al 20% para la variante D142D en población control. Esta frecuencia es similar a la descrita por Görgens en sus controles (17%) [90] y a la población CEU (20%) descrita en el Proyecto HapMap [120]. En definitiva, las frecuencias que hemos encontrado en nuestro trabajo están de acuerdo con las frecuencias descritas en otros trabajos descartando posibles sesgos en nuestra población control.

Por otro lado, en este trabajo hemos encontrado una asociación entre la variante *MTH1*-D142D y el riesgo a desarrollar CCR en familias HNPCC-X. Este hallazgo es la primera vez que se describe y sería conveniente confirmarlo en una población HNPCC-X más numerosa.

La variante *OGG1*-S326C muestra una asociación con el riesgo a padecer CCR esporádico. Tras el análisis del riesgo según la dosis génica, se observó que el riesgo es igual ($OR=1,5$) en individuos portadores en homocigosis o heterocigosis. Sin embargo, no se observó ningún cambio en la edad de

diagnóstico en portadores de esta variante. Estos resultados encajan con lo esperado en el caso de un alelo de baja penetrancia. Esta asociación no se observa en las otras dos poblaciones estudiadas (HNPCC-X y HNPCC-MSI). Este hecho podría explicarse debido a que las dos poblaciones que no muestran asociación son casos de cáncer colorrectal familiar donde alelos de alta penetrancia conocidos (HNPCC-MSI) o desconocidos (HNPCC-X) son responsables de la susceptibilidad al cáncer y pueden enmascarar cualquier pequeño efecto que pueda tener un alelo de baja penetrancia.

La variante *OGG1-S326C* es una variante que ha sido ampliamente estudiada en distintos tipos de tumores y poblaciones. Se han hecho estudios de complementación en *E. coli* [96] y en células humanas [134] observándose una actividad disminuida con respecto a la proteína silvestre. Hay numerosos estudios de asociación en distintos tipos tumorales que dan lugar a controversia aunque se le atribuye principalmente un papel de riesgo en cáncer de pulmón [93, 135-137]. En CCR, los resultados son inconsistentes, hay varios estudios de asociación en tumores esporádicos en distintas poblaciones. Se ha publicado recientemente un meta-análisis que engloba a los principales estudios de asociación de esta variante llevados a cabo en CCR y su análisis sugiere una falta de asociación de la variante con la susceptibilidad al CCR [105]. Solamente dos estudios muestran asociación de la variante *OGG1-S326C* y el riesgo a CCR. Uno de ellos, realizado en la República Checa, encuentra un riesgo aumentado a desarrollar CCR en pacientes portadores en homocigosis de la variante pero solo si son fumadores [102]. El otro ha sido realizado en población española y detecta un riesgo aumentado (OR=2,31) en individuos homocigotos para *S326C* [101]. Nuestro trabajo aporta un dato más a favor de la implicación de *OGG1-S326C* en la susceptibilidad a desarrollar CCR aunque a diferencia de los otros dos estudios, no observamos un modelo recesivo sino dominante. Probablemente el papel de este alelo en la carcinogénesis colorrectal dependa de la población de estudio. Diferencias en el fondo genético o en otros factores externos pueden ocultar el posible efecto de este polimorfismo en el CCR.

4. ESTUDIO DEL DAÑO OXIDATIVO

Debido a que encontramos dos variantes raras y una frecuente que parecen estar implicadas en la carcinogénesis de familias HNPCC-X, y que estos genes son los encargados de reparar la 8OHdG, se decidió analizar el daño oxidativo en tumores de familias HNPCC-X. Este análisis se hizo mediante dos abordajes distintos, analizando el perfil de mutaciones somáticas en el gen *KRAS* y analizando los niveles de 8OHdG en núcleos de células de tejido tumoral.

4.1. Análisis de mutaciones somáticas en el gen *kras*

Se escogió este gen para analizar el daño oxidativo a partir del perfil de mutaciones somáticas porque en él se han descrito aumentos en la tasa de transversiones G>T asociados al déficit de proteínas reparadoras de la 8OHdG en tumores de pulmón en ratón [138], y más particularmente en tumores colorrectales humanos procedentes de pacientes con mutación bialélica en el gen *MUTYH* [139]. Se analizó el perfil de mutaciones en el gen *KRAS* en 40 tumores HNPCC-X y también en 17 tumores *MUTYH* de procedencia escocesa que nos sirven como controles positivos de inestabilidad genética debida al fallo en la reparación de 8OHdG.

En ninguno de los dos grupos de tumores analizados en este trabajo se observan mutaciones en el codón 600 del gen *BRAF*. Es lo esperado ya que mutaciones en este codón se asocian a tumores esporádicos con fenotipo metilador en islas CpG [140, 141]. Algunos autores encuentran mutaciones en *BRAF* analizando tumores HNPCC-MSS [62, 63] pero hay que señalar que la selección de tumores en estos dos estudios se realizó según unos criterios menos estrictos (criterios de Bethesda) lo que aumenta la heterogeneidad del grupo pudiendo incluir casos de cáncer no familiar. En otros dos estudios que analizan estas mutaciones en familias HNPCC-X seleccionadas según los criterios estrictos Amsterdam I y II [64, 142] no se encuentran mutaciones en *BRAF* en ninguno de los tumores analizados. Estos datos coinciden con nuestros resultados.

En cuanto a los resultados observados en la población *MUTYH*, de los 9 casos de tumores procedentes de pacientes con mutación bialélica y diagnóstico de MAP,

7 muestran un cambio G>T en el codón 12 de *KRAS*. Estos resultados coinciden con lo esperado ya que la carcinogénesis de estos pacientes es desencadenada precisamente por un aumento en la tasa de transversiones G>T que afecta frecuentemente a genes como *APC* y *KRAS* [28, 139]. En principio es llamativo que ninguno de los tumores con mutación monoalélica en el gen *MUTYH* presente mutaciones en *KRAS*, pero seguramente se deba al escaso número de muestras analizado (n=8).

Lo más sorprendente del análisis de mutaciones somáticas en el gen *KRAS* es la elevada tasa de mutaciones que se observa en nuestra población HNPCC-X (60%). Hay cuatro estudios que analizan la tasa de mutaciones somáticas en *KRAS* en distintas poblaciones de CCR hereditario y esporádico [62-64, 142].

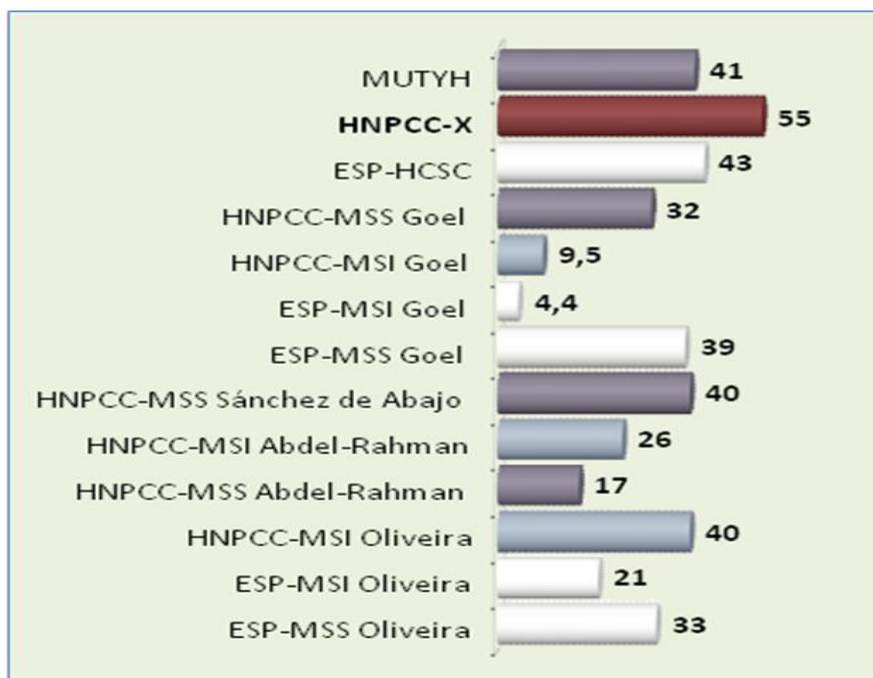


Figura 38: Frecuencia (%) de mutaciones somáticas en *KRAS* en distintas poblaciones de CCR. Tasa de mutaciones teniendo en cuenta solo las 7 mutaciones más prevalentes en los codones 12 y 13.

Estos estudios muestran resultados dispares, pero ninguno encuentra una tasa de mutación superior al 40% (figura 38). Solo uno de ellos realiza el estudio en familias HNPCC-X seleccionadas con criterios estrictos Amsterdam [64] obteniendo un 32% de mutaciones. Estos autores solo analiza las mutaciones en

los codones c.12 y c.13 de *KRAS*. La diferencia en los resultados, entonces, podría deberse a la inclusión de los exones 3 y 4 en nuestro estudio, pero el bajo número de mutaciones encontrados en tales exones no explica el gran aumento en la tasa de mutaciones *KRAS* en nuestra población (figura 38).

Atendiendo a la técnica empleada para la detección de mutaciones, tanto en nuestro estudio como en el de Goel [64] se ha utilizado secuenciación directa en todos los tumores. La búsqueda de mutaciones somáticas en DNA tumoral por secuenciación es un método poco sensible ya que va a depender de la pureza del DNA tumoral que tengamos y del porcentaje de células tumorales que sean portadoras de la mutación. Hay casos en los que es difícil decidir si una pequeña variación en el electroferograma se debe a una mutación en un pequeño porcentaje de células de nuestra muestra o sin embargo se debe a un artefacto de la técnica, por esta razón el análisis de mutaciones somáticas por secuenciación se vuelve subjetivo pudiendo dar lugar a interpretaciones diferentes y por tanto distintos resultados. Nosotros hemos confirmado todos aquellos casos dudosos por la técnica TheraScreen[®] (DxS Ltd.) que consiste en la amplificación alelo específica mediante PCR a tiempo real de las mutaciones más prevalentes en *KRAS*, por lo que descartamos la presencia de falsos positivos.

Si analizamos el perfil de mutaciones en los tumores teniendo en cuenta solo los codones 12 y 13 (figura 39), nuestros resultados son similares a los encontrados en las poblaciones HNPCC-MSS descritas por Sánchez de Abajo [63] y Abdel-Rahman [62].

En relación al tipo de mutación, el porcentaje de cambios G>A en nuestros tumores HNPCC.X se asemeja a la población HNPCC-MSS de Sánchez de Abajo, a la población de CCR esporádico MSS descrita por Oliveira y también a los CCR esporádicos analizados en nuestro laboratorio (ESP-ESP-HCSC) (figura 39).

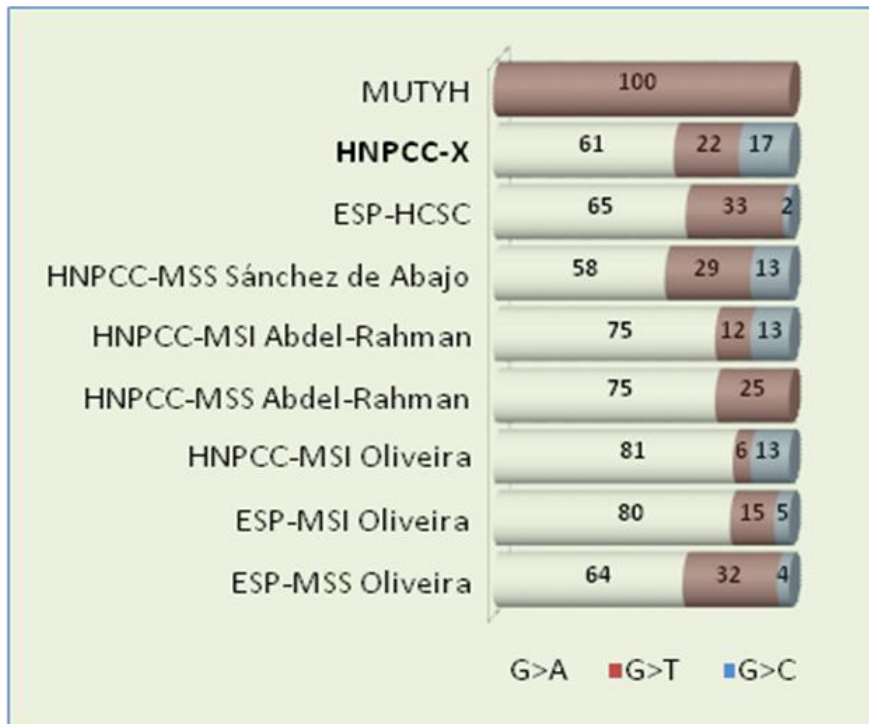


Figura 39: Tipos de mutaciones encontradas (%) en el gen KRAS en distintas poblaciones de tumores CCR. Teniendo en cuenta solo las 7 mutaciones más prevalentes en los codones 12 y 13.

En relación al cambio G>T, que implica un daño oxidativo mayor, nuestros tumores HNPCC-X se asemeja a los HNPCC-MSS descritos [62, 63] mostrando un patrón intermedio entre los tumores esporádicos descritos por Oliveira [142] y los tumores HNPCC-MSI.

4.2. Niveles de 8OHdG en núcleos de células tumorales

Un segundo abordaje para estimar el daño oxidativo en familias HNPCC-X fue la detección por inmunofluorescencia de 8OHdG en tejido tumoral mediante el uso de un anticuerpo específico. El estudio se llevó a cabo en muestras parafinadas de tumores HNPCC-X, HNPCC-MSI, MUTYH y tumores esporádicos de procedencia escocesa.

Primero se compararon los niveles de 8OHdG en tejido normal adyacente al tumor, tejido tumoral diferenciado y tejido tumoral indiferenciado. Este análisis reveló unas diferencias significativas ($p < 0,001$) y grandes (ver figura 30) en los niveles de 8OHdG en tejido normal y tumoral. Otros estudios han descrito el incremento de los niveles de 8OHdG en DNA de tumores colorrectales con

respecto al DNA de tejido normal de colon [75] y también en núcleos de células de CCR en comparación con núcleos de células del correspondiente tejido normal [74]. Por lo tanto nuestros datos corroboran estos estudios anteriores manifestando que células tumorales están sometidos a un estrés oxidativo mucho mayor que el epitelio normal.

El segundo análisis que se llevó a cabo fue la comparación de niveles de 8OHdG en núcleos de células de tumores diferenciados en las 4 poblaciones de estudio (ver figura 32b). Nos encontramos con unos niveles muy altos de 8OHdG y ninguna diferencia entre las distintas poblaciones analizadas. Es lógico pensar que posibles diferencias entre distintas poblaciones estén siendo enmascaradas por el alto estrés oxidativo que se origina en el tumor, por esta razón intentamos realizar el mismo análisis pero en tejido normal adyacente al tumor donde el estrés oxidativo es menor. En este caso (ver figura 32a), se observan unos niveles de 8OHdG relativamente altos (en torno al 30%) en los tumores procedentes de las poblaciones MUTYH y HNPCC-X, siendo estos niveles casi nulos (1 y 5%) en los tumores HNPCC-MSI y esporádicos escoceses. Hay que tener en cuenta que este análisis es una estimación muy grosera debida al escaso número de muestras en las que se pudo encontrar zona normal adyacente al tumor. Aún así la diferencia es muy llamativa lo que hace necesario y atractivo repetir el estudio en un número suficientemente alto de muestras de tejido tumoral adyacente. Si estas diferencias se confirman, podrían estar indicando un posible fallo en los genes de reparación de la 8OHdG o en los enzimas neutralizantes de los ROS o en alguna otra ruta implicada en el estrés oxidativo en familias HNPCC-X.

Finalmente, aunque los resultados anteriores nos indican que el tejido tumoral no es una buena muestra para buscar diferencias en los niveles de 8OHdG, se analizaron estos niveles atendiendo a los distintos genotipos de las variantes *OGG1-S326C* y *MTH1-D142D* tanto en la población HNPCC-X como en la población HNPCC-MSI. No se realizó en tejido normal adyacente debido al escaso número de muestras en el TMA que mostraran este tipo de morfología. Aún así, se pudo observar que tumores HNPCC-X procedentes de pacientes homocigotos para la variante *MTH1-D142D* mostraban una tendencia al aumento de los niveles de 8OHdG, datos que concuerdan con los resultados

obtenidos en el estudio caso-control de esta variante. Hay que recordar que en el estudio de asociación de la variante en esta misma población se detectó un riesgo a desarrollar CCR en individuos homocigotos 3,66 veces mayor que individuos no portadores y una anticipación de 9 años de la edad de aparición del cáncer. Estos resultados son también interesantes y alentadores para el futuro estudio de los niveles de 8OHdG en muestras de tejido normal.

Como resumen del estudio de los niveles de 8OHdG podemos decir que la estrategia de valorar los niveles de 8OHdG en tejido tumoral no ha sido la más adecuada ya que estos niveles son demasiado altos para establecer pequeñas diferencias. Aún así; los datos sugieren diferencias grandes en los niveles basales de 8OHdG en tejido normal en las poblaciones *MUTYH* y HNPCC-X. En el caso de pacientes con mutación en *MUTYH* es razonable que nos encontremos con unos niveles superiores de 8OHdG, y en el caso de tumores HNPCC-X este incremento podría ser debido al azar o bien podría deberse a un defecto en las vías de reparación o de neutralización del daño oxidativo sugiriendo que el estrés oxidativo juega un papel importante en la carcinogénesis de la población HNPCC-X. Estudios en tejido normal se están empezando a diseñar para esclarecer estos datos.

En este análisis también se ha podido ver una tendencia a incrementarse los niveles de 8OHdG en el tejido tumoral diferenciado de individuos homocigotos para la variante *OGG1-D142D*, los cuales han mostrado también un riesgo incrementado de CCR y edad de aparición del cáncer adelantada. Si se confirman estos datos estaríamos avalando el papel de *OGG1-D142D* como factor de riesgo en la población HNPCC-X.

5. VÍA WNT

Con el objetivo de intentar caracterizar a nivel molecular los tumores de familias HNPCC-X se analizó la expresión de varias proteínas implicadas directa o indirectamente en la vía Wnt tanto en tumores HNPCC-X como en tumores HNPCC-MSI.

La activación de la vía Wnt es un proceso iniciador de la carcinogénesis [6] muy común en la vasta mayoría de los CCR bien por mutaciones en el gen *APC*, *CTNNB1*, *AXINA* o *TCF4* [7].

Cuando la vía Wnt se estimula, su efector, la β -catenina, se libera de sus inhibidores (*apc*, *axina* y *gsk3 β*) y entra en el núcleo donde se une a *tcf4* y activan la transcripción de factores proliferativos como *c-myc* y ciclina D1 (ver figura 2).

Varios estudios encuentran una mayor expresión de β -catenina nuclear, coactivador transcripcional de la vía Wnt, en CCR esporádico MSS frente a CCR esporádico MSI o HNPCC [143, 144]. Nosotros encontramos un mayor porcentaje (35%) de β -catenina nuclear en tumores HNPCC-X frente a HNPCC-MSI lo que indica una mayor activación de la vía Wnt en ese grupo de familias. Porcentajes similares de β -catenina nuclear se han encontrado en otras poblaciones HNPCC-MSS [62, 63].

La ciclina D1 es un oncogén que interviene en el ciclo celular favoreciendo el paso de la fase G1 a la fase S. En tumores CCR la activación de la vía Wnt conduce a una activación del gen *CCND1*, pero existen también otras vías que van a estimular la expresión de ciclina D1 como puede ser la vía MAPK [145]. Además de la desregulación de estas vía, se han observado también otros mecanismos de sobreexpresión de ciclina D1 en cáncer como pueden ser las alteraciones genómicas y post-transcripcionales [146]. La expresión de ciclina D1 en nuestra población HNPCC-X se correlaciona positivamente con la expresión de β -catenina (OR=6,8; IC(95%)=1,43-32,37) lo que confirma la activación de la vía Wnt en estos tumores. Sin embargo, en la población HNPCC-MSI observamos unos niveles mayores de ciclina D1 y que además no se acompañan de expresión nuclear de β -catenina, esto nos sugiere que la ciclina D1 está sobreexpresada por otras vías distintas en los tumores HNPCC-MSI.

C-myc es una oncogén que actúa como factor de transcripción de genes que participan en procesos esenciales como la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular. No solo es regulado a través de la vía Wnt sino que también se estimula por medio de otras vías como MAPK o Notch [147]. En

cáncer es frecuente observar una sobreexpresión de c-myc debida a la alteración de estas vías o a alteraciones genómicas [147].

En cuanto a los resultados obtenidos, la expresión de c-myc se mostró muy elevada en ambos grupos de tumores (62% en HNPCC-X y 70% en HNPCC-MSI) independientemente de la presencia de β -catenina nuclear. Seguramente la vía Wnt está contribuyendo a esta sobreexpresión en el caso de tumores HNPCC-X, pero en tumores HNPCC-MSI son otras vías o mecanismos distintos los principales responsables de su sobreexpresión.

En conjunto, los resultados de la expresión de proteínas de la vía Wnt indican una mayor activación de la vía en familias HNPCC-X con respecto a las familias HNPCC-MSI. Podemos decir entonces que los tumores HNPCC-X se asemejan más a los tumores CCR esporádicos MSS en cuanto a la vía iniciadora de la carcinogénesis. Los tumores HNPCC-MSI presentarían una activación de factores proliferativos debida a otras vías distintas.

Por otro lado se analizó la expresión del factor de transcripción FoxO3a debido a su implicación tanto en la vía Wnt como en el estrés oxidativo (ver figura 18). Esta proteína se estimula ante una señal de estrés oxidativo, FoxO entra en el núcleo y compite con tcf4 por β -catenina [148]. La unión entre β -catenina y foxO va a estimular genes de neutralización de ROS y de apoptosis. En definitiva, es el balance de ROS, a través de los niveles de FoxO, el que va a determinar que la vía se incline hacia la activación de factores de proliferación o en cambio de neutralización y apoptosis. Al analizar esta proteína en las dos poblaciones de estudio, encontramos una expresión baja en los tumores HNPCC-X y prácticamente nula en los tumores HNPCC-MSI. Aunque el número de tumores con expresión positiva de FoxO no es muy grande (n=5), la mayoría muestran también expresión nuclear de β -catenina. Una vez más encontramos datos que nos sugieren que el estrés oxidativo puede jugar un papel clave en la carcinogénesis de un pequeño porcentaje de las familias HNPCC-X.

6. DILOTIPO YIN-YANG EN EL GEN APC

Con este último apartado se pretende determinar si la recombinación homóloga entre alelos puede actuar como un factor de riesgo en CCR. Para establecer la similitud entre alelos y así poder probar nuestra hipótesis, nos servimos de la estructura de haplotipos Yin-Yang que presenta el gen *APC*. Escogimos *APC* como gen candidato para este estudio por su papel como gen guardian (*gatekeeper*) en la carcinogénesis colorrectal [149] y también por su perfil de haplotipos Yin-Yang descrito en población tanto europea (CEU) [120] como española [110].

Analizamos la representación de los diplotipos homocigotos para los haplotipos Yin-Yang en la población HNPCC-X y también en población CCR esporádico, y llevamos a cabo estudios caso-control en ambas poblaciones.

Para poder determinar el diplotipo seleccionamos 3 SNPs marcadores distribuidos a lo largo de la región Yin-Yang del gen *APC* (ver figura 19 y tabla 6). Analizamos la distribución de los haplotipos formados por estos 3 SNPs en las dos poblaciones de estudio y también en la población control libre de cáncer. La distribución de estos dos haplotipos en las poblaciones analizadas (98%) resultó ser similar a la descrita en población española (84%) [110].

Tras llevar a cabo el análisis del diplotipo Yin-Yang en las poblaciones de estudio, encontramos una mayor representación del diplotipo homocigoto en la población CCR esporádico con respecto a la población control (OR=1,93; IC(95%)=1,32-2,81; $p=0,001$). Sin embargo la población HNPCC-X mostró una distribución de diplotipos Yin-Yang similar a la población control libre de cáncer (OR=1,16; IC(95%)=0,58-2,31) (ver figura 37). Nuestra hipótesis no ha resultado válida para la población HNPCC-X pero en cambio los resultados en CCR esporádico muestran asociación entre el diplotipo Yin-Yang homocigoto y el riesgo a desarrollar CCR sugiriendo un posible papel de la recombinación homóloga en la susceptibilidad al CCR esporádico. Gracias a la colaboración del ICO, Barcelona, se analizó una segunda población de CCR esporádico para intentar confirmar esta asociación en una población distinta (datos no presentados en esta tesis), y no se encontró ninguna diferencia en la distribución de diplotipos Yin-Yang no pudiéndose confirmar el papel del diplotipo homocigoto como factor de riesgo frente al CCR [150]. Para intentar

explicar esta falta de replicación se atribuyeron estas diferencias a la selección de la población control (la población control catalana provenía de un Banco de Sangre lo que significa el desconocimiento de la historia clínica de cada control), factores ambientales y a un posible menor riesgo en la población catalana que no podría ser detectado debido a un escaso poder estadístico. En definitiva, sería necesario repetir el estudio con poblaciones grandes de casos y controles libres de enfermedad para poder confirmar o descartar el riesgo detectado en nuestra población de CCR esporádico [110].

Aunque la asociación entre el diplotipo Yin-Yang homocigoto y el riesgo a desarrollar CCR permanece sin esclarecer, con este estudio se ha presentado un planteamiento nuevo en los estudios de asociación. Se ha llevado a cabo un estudio de asociación con una característica genética estructural, como es un diplotipo, en lugar de una variante genética. Es decir, en vez de analizar la asociación que puede haber entre la funcionalidad de un alelo y una enfermedad, hemos analizado la asociación entre mecanismos genéticos de recombinación homóloga y enfermedad.

Tras discutir individualmente los resultados, podemos decir que a pesar de disponer de un número no muy alto de familias HNPCC-X y sobre todo de tumores de esas familias, hemos obtenido resultados que aportan conocimientos en los mecanismos carcinogénicos colorrectales. Estudios en colaboración con otros grupos y la disponibilidad de nuevos avances metodológicos permitirán mayores logros en el estudio de estas familias.

CONCLUSIONES

En relación a los genes de reparación de la 8OHdG:

1. Se ha identificado a la variante c.137 G>A (p.Arg46Gln) del gen *OGG1* en la familia CC-298 clasificada como HNPCC-X. Esta variante muestra un patrón de herencia dominante de penetrancia incompleta y puede ser clasificada como patogénica.
2. Se ha detectado la variante patogénica c.1187 G>A (p.Gly396Asp) del gen *MUTYH* en una familia HNPCC-X mostrando segregación con la enfermedad lo que sustenta su papel como factor de riesgo a desarrollar CCR en heterocigosis.
3. La variante c.426 C>T (p.Asp142Asp) del gen *MTH1* aumenta el riesgo de desarrollar CCR en familias HNPCC-X pero no en familias HNPCC-MSI o CCR esporádico. El riesgo que confiere es dominante y dependiente de la dosis génica. Además, los individuos homocigotos para la variante presentan una edad de diagnóstico de CCR adelantada y un mayor estrés oxidativo en el tumor.
4. La variante c.977 C>G (p.Ser326Cys) del gen *OGG1* aumenta el riesgo de desarrollar CCR en casos esporádicos pero no en familias HNPCC-X o en HNPCC-MSI. El riesgo que confiere es dominante e independiente de la dosis génica.

En relación al de estrés oxidativo:

5. Los niveles de 8OHdG en núcleos celulares de tejido tumoral no son un buen marcador para estimar diferencias en el estrés oxidativo.
6. El porcentaje de tumores con mutaciones G>T en la población HNPCC-X es menor que el presentado por otras poblaciones de CCR esporádico aunque mayor que el presentado por poblaciones HNPCC-MSI.

7. Tumores procedentes de pacientes con mutación patogénica en *MUTYH* y familias HNPCC-X parecen indicar un mayor daño oxidativo en tejido normal adyacente al tumor que los tumores HNPCC-MSI o esporádicos.
8. Un pequeño grupo de tumores HNPCC-X pero no HNPCC-MSI presentan expresión de factores de transcripción en respuesta al daño oxidativo.

En relación a las vías de señalización estudiadas:

9. La tasa de mutaciones somáticas en el gen *KRAS* en nuestros tumores HNPCC-X es mayor que en las descritas hasta ahora.
10. Los tumores HNPCC-X presentan mayor activación de la vía Wnt que los tumores HNPCC-MSI asemejándose a los tumores CCR esporádicos MSS en cuanto a la vía iniciadora de la carcinogénesis.

En relación a otros mecanismos estudiados:

11. Procesos de recombinación homóloga no son importantes en la carcinogénesis de las familias HNPCC-X.

En resumen, las familias HNPCC-X engloban a un grupo heterogéneo de familias que presentan procesos carcinogénicos distintos a los descritos en CCR esporádico o HNPCC-MSI. Los resultados expuestos en este trabajo explican la susceptibilidad al cáncer por alteraciones en la reparación de la 8OHdG, en una minoría de estas familias. Es necesario seguir profundizando en los mecanismos carcinogénicos implicados en este tipo de familias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay, J., et al., *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.10 [Internet]*. 2010, International Agency for Research on Cancer (IARC).
2. Lopez-Abente, G., et al., *Changes in colorectal cancer incidence and mortality trends in Spain*. *Ann Oncol*, 2010. **21 Suppl 3**: p. iii76-82.
3. Boyle, P. and B. Levin, *Cancer site by site. Colorectal Cancer.*, in *World Cancer Report 2008*, P. Boyle and B. Levin, Editors. 2008, International Agency for Research on Cancer (IARC). Lyon, France. p. 374-378.
4. Alberts, S.R., D. Citrin, and M.A. Rodriguez-Bigas, *Colon, Rectal, and Anal Cancers.*, in *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach.*, R. Pazdur, et al., Editors. 2011, Oncology.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 1990. **61**(5): p. 759-67.
7. Fearon, E.R., *Molecular genetics of colorectal cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2011. **6**: p. 479-507.
8. Wood, L.D., et al., *The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers*. *Science*, 2007. **318**(5853): p. 1108-13.
9. Greenman, C., et al., *Patterns of somatic mutation in human cancer genomes*. *Nature*, 2007. **446**(7132): p. 153-8.
10. Cadigan, K.M. and R. Nusse, *Wnt signaling: a common theme in animal development*. *Genes Dev*, 1997. **11**(24): p. 3286-305.
11. Marshman, E., C. Booth, and C.S. Potten, *The intestinal epithelial stem cell*. *Bioessays*, 2002. **24**(1): p. 91-8.
12. Pino, M.S. and D.C. Chung, *The chromosomal instability pathway in colon cancer*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(6): p. 2059-72.
13. Korinek, V., et al., *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma*. *Science*, 1997. **275**(5307): p. 1784-7.
14. Powell, S.M., et al., *APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis*. *Nature*, 1992. **359**(6392): p. 235-7.

15. Rowan, A.J., et al., *APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits"*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3352-7.
16. Sparks, A.B., et al., *Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(6): p. 1130-4.
17. Loeb, L.A., *Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis*. Cancer Res, 1991. **51**(12): p. 3075-9.
18. Ionov, Y., et al., *Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis*. Nature, 1993. **363**(6429): p. 558-61.
19. Duval, A. and R. Hamelin, *Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers*. Ann Genet, 2002. **45**(2): p. 71-5.
20. Boland, C.R. and A. Goel, *Microsatellite instability in colorectal cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2073-2087 e3.
21. Huang, J., et al., *APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9049-54.
22. Hitchins, M.P. and R.L. Ward, *Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer*. J Med Genet, 2009. **46**(12): p. 793-802.
23. Ligtenberg, M.J., 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, 2009. **41**(1): p. 112-7.
24. Toyota, M., et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8681-6.
25. Goel, A., et al., *The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer*. Gastroenterology, 2007. **132**(1): p. 127-38.
26. Shibutani, S., M. Takeshita, and A.P. Grollman, *Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG*. Nature, 1991. **349**(6308): p. 431-4.
27. Kremer, T.M., et al., *Protection of pulmonary epithelial cells from oxidative stress by hMYH adenine glycosylase*. Respir Res, 2004. **5**: p. 16.

28. Al-Tassan, N., et al., *Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors*. Nat Genet, 2002. **30**(2): p. 227-32.
29. Walther, A., et al., *Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(7): p. 489-99.
30. Bodmer, W. and I. Tomlinson, *Rare genetic variants and the risk of cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2010. **20**(3): p. 262-7.
31. Dragani, T.A., F. Canzian, and M.A. Pierotti, *A polygenic model of inherited predisposition to cancer*. Faseb J, 1996. **10**(8): p. 865-70.
32. Fletcher, O. and R.S. Houlston, *Architecture of inherited susceptibility to common cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(5): p. 353-61.
33. de la Chapelle, A., *Genetic predisposition to colorectal cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 769-80.
34. Grady, W.M., *Genetic testing for high-risk colon cancer patients*. Gastroenterology, 2003. **124**(6): p. 1574-94.
35. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
36. Jasperson, K.W., et al., *Hereditary and familial colon cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2044-58.
37. Galiatsatos, P. and W.D. Foulkes, *Familial adenomatous polyposis*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(2): p. 385-98.
38. Foulkes, W.D., *A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome*. Qjm, 1995. **88**(12): p. 853-63.
39. Fleischmann, C., et al., *Comprehensive analysis of the contribution of germline MYH variation to early-onset colorectal cancer*. Int J Cancer, 2004. **109**(4): p. 554-8.
40. Sampson, J.R. and N. Jones, *MUTYH-associated polyposis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2009. **23**(2): p. 209-18.
41. Farrington, S.M., et al., *Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(1): p. 112-9.

42. Lynch, H.T., et al., *Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications*. Clin Genet, 2009. **76**(1): p. 1-18.
43. Peltomaki, P., *Lynch syndrome genes*. Fam Cancer, 2005. **4**(3): p. 227-32.
44. Lynch, H.T., et al., *Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management*. Fam Cancer, 2008. **7**(1): p. 27-39.
45. Ponti, G. and M. Ponz de Leon, *Muir-Torre syndrome*. Lancet Oncol, 2005. **6**(12): p. 980-7.
46. Hendriks, Y.M., et al., *Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 17-25.
47. Boland, C.R., et al., *The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside*. Fam Cancer, 2008. **7**(1): p. 41-52.
48. Vasen, H.F., et al., *The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)*. Dis Colon Rectum, 1991. **34**(5): p. 424-5.
49. Vasen, H.F., et al., *New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC*. Gastroenterology, 1999. **116**(6): p. 1453-6.
50. Rodriguez-Bigas, M.A., et al., *A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(23): p. 1758-62.
51. Umar, A., et al., *Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(4): p. 261-8.
52. Vasen, H.F., et al., *Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer)*. J Med Genet, 2007. **44**(6): p. 353-62.
53. Boland, C.R., et al., *A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5248-57.

54. Kane, M.F., et al., *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines*. *Cancer Res*, 1997. **57**(5): p. 808-11.
55. Lindor, N.M., et al., *Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(4): p. 1043-8.
56. Caldes, T., et al., *Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer*. *Oncol Rep*, 2004. **12**(3): p. 621-9.
57. Albuquerque, C., et al., *Colorectal cancers show distinct mutation spectra in members of the canonical WNT signaling pathway according to their anatomical location and type of genetic instability*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010. **49**(8): p. 746-59.
58. Lindor, N.M., et al., *Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X*. *Jama*, 2005. **293**(16): p. 1979-85.
59. Mueller-Koch, Y., et al., *Hereditary non-polyposis colorectal cancer: clinical and molecular evidence for a new entity of hereditary colorectal cancer*. *Gut*, 2005. **54**(12): p. 1733-40.
60. Llor, X., et al., *Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(20): p. 7304-10.
61. Valle, L., et al., *Clinicopathologic and pedigree differences in amsterdam I-positive hereditary nonpolyposis colorectal cancer families according to tumor microsatellite instability status*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(7): p. 781-6.
62. Abdel-Rahman, W.M., et al., *Comprehensive characterization of HNPCC-related colorectal cancers reveals striking molecular features in families with no germline mismatch repair gene mutations*. *Oncogene*, 2005. **24**(9): p. 1542-51.
63. Sanchez-de-Abajo, A., et al., *Molecular analysis of colorectal cancer tumors from patients with mismatch repair proficient hereditary nonpolyposis colorectal cancer suggests novel carcinogenic pathways*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(19): p. 5729-35.
64. Goel, A., et al., *Aberrant DNA methylation in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(5): p. 1854-62.

65. Beggs, A.D., et al., *Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management*. Gut, 2010. **59**(7): p. 975-86.
66. Brosens, L.A., et al., *Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis*. Gut, 2007. **56**(7): p. 965-7.
67. Chen, H.M. and J.Y. Fang, *Genetics of the hamartomatous polyposis syndromes: a molecular review*. Int J Colorectal Dis, 2009. **24**(8): p. 865-74.
68. Farooq, A., et al., *Cowden syndrome*. Cancer Treat Rev, 2010. **36**(8): p. 577-83.
69. Klaunig, J.E. and L.M. Kamendulis, *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004. **44**: p. 239-67.
70. Maynard, S., et al., *Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging*. Carcinogenesis, 2009. **30**(1): p. 2-10.
71. Feig, D.I., T.M. Reid, and L.A. Loeb, *Reactive oxygen species in tumorigenesis*. Cancer Res, 1994. **54**(7 Suppl): p. 1890s-1894s.
72. Kasai, H., et al., *Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(4): p. 2127-36.
73. Halliwell, B., *Oxidative stress and cancer: have we moved forward?* Biochem J, 2007. **401**(1): p. 1-11.
74. Kondo, S., et al., *Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(3-4): p. 401-10.
75. Oliva, M.R., et al., *Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community*. Mol Carcinog, 1997. **18**(4): p. 232-43.
76. Scharer, O.D., *Chemistry and biology of DNA repair*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(26): p. 2946-74.
77. Frosina, G., et al., *Two pathways for base excision repair in mammalian cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9573-8.
78. Robertson, A.B., et al., *DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 981-93.

79. Aburatani, H., et al., *Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue*. *Cancer Res*, 1997. **57**(11): p. 2151-6.
80. Slupska, M.M., et al., *Functional expression of hMYH, a human homolog of the Escherichia coli MutY protein*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(19): p. 6210-3.
81. Fortini, P., et al., *8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways*. *Mutat Res*, 2003. **531**(1-2): p. 127-39.
82. Nakabeppu, Y., *Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1*. *Mutat Res*, 2001. **477**(1-2): p. 59-70.
83. Arai, K., et al., *Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage*. *Oncogene*, 1997. **14**(23): p. 2857-61.
84. Yokota, J. and T. Sugimura, *Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes*. *Faseb J*, 1993. **7**(10): p. 920-5.
85. Eshleman, J.R., et al., *Increased transversions in a novel mutator colon cancer cell line*. *Oncogene*, 1998. **16**(9): p. 1125-30.
86. Parker, A.R., et al., *8-Hydroxyguanosine repair is defective in some microsatellite stable colorectal cancer cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(24): p. 7230-3.
87. Al-Tassan, N., et al., *Inherited variants in MYH are unlikely to contribute to the risk of lung carcinoma*. *Hum Genet*, 2004. **114**(2): p. 207-10.
88. Audebert, M., et al., *Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney*. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4740-4.
89. Blons, H., et al., *Frequent allelic loss at chromosome 3p distinct from genetic alterations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 gene in head and neck cancer*. *Mol Carcinog*, 1999. **26**(4): p. 254-60.
90. Gorgens, H., et al., *Analysis of the base excision repair genes MTH1, OGG1 and MUTYH in patients with squamous oral carcinomas*. *Oral Oncol*, 2007. **43**(8): p. 791-5.
91. Habib, S.L., et al., *Genetic polymorphisms in OGG1 and their association with angiomyolipoma, a benign kidney tumor in patients with tuberous sclerosis*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(1): p. 23-7.

92. Kohno, T., et al., *Association of polymorphisms in the MTH1 gene with small cell lung carcinoma risk*. Carcinogenesis, 2006. **27**(12): p. 2448-54.
93. Le Marchand, L., et al., *Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. **11**(4): p. 409-12.
94. Xing, D.Y., et al., *Ser326Cys polymorphism in hOGG1 gene and risk of esophageal cancer in a Chinese population*. Int J Cancer, 2001. **95**(3): p. 140-3.
95. Xu, J., et al., *Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility*. Cancer Res, 2002. **62**(8): p. 2253-7.
96. Kohno, T., et al., *Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA*. Oncogene, 1998. **16**(25): p. 3219-25.
97. Kohno, T., et al., *Contribution of the TP53, OGG1, CHRNA3, and HLA-DQA1 genes to the risk for lung squamous cell carcinoma*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(4): p. 813-7.
98. Janik, J., et al., *8-Oxoguanine incision activity is impaired in lung tissues of NSCLC patients with the polymorphism of OGG1 and XRCC1 genes*. Mutat Res, 2011. **709-710**: p. 21-31.
99. Hansen, R., et al., *GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer*. Cancer Lett, 2005. **229**(1): p. 85-91.
100. Kim, J.I., et al., *hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(5): p. 956-60.
101. Moreno, V., et al., *Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(7 Pt 1): p. 2101-8.
102. Pardini, B., et al., *DNA repair genetic polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Czech Republic*. Mutat Res, 2008. **638**(1-2): p. 146-53.
103. Sliwinski, T., et al., *Common polymorphisms in the XPD and hOGG1 genes are not associated with the risk of colorectal cancer in a Polish population*. Tohoku J Exp Med, 2009. **218**(3): p. 185-91.
104. Obtulowicz, T., et al., *Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients*. Mutagenesis, 2010. **25**(5): p. 463-71.

105. Zhang, Y., et al., *Association of OGG1 Ser326Cys polymorphism with colorectal cancer risk: a meta-analysis*. Int J Colorectal Dis, 2011.
106. Zhang, J., et al., *Genomewide distribution of high-frequency, completely mismatching SNP haplotype pairs observed to be common across human populations*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(5): p. 1073-81.
107. Curtis, D. and A.E. Vine, *Yin yang haplotypes revisited - long, disparate haplotypes observed in European populations in regions of increased homozygosity*. Hum Hered, 2010. **69**(3): p. 184-92.
108. Consortium, T.I.H., *A haplotype map of the human genome*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1299-320.
109. Frazer, K.A., et al., *A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 851-61.
110. Ribas, G., et al., *Haplotype patterns in cancer-related genes with long-range linkage disequilibrium: no evidence of association with breast cancer or positive selection*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**(2): p. 252-60.
111. Caldes, T., et al., *Prevalence of germline mutations of MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from Spain*. Int J Cancer, 2002. **98**(5): p. 774-9.
112. Sanchez de Abajo, A., et al., *Low prevalence of germline hMSH6 mutations in colorectal cancer families from Spain*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(37): p. 5770-6.
113. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.
114. de La Hoya, M., E. Diaz-Rubio, and T. Caldes, *Denaturing gradient gel electrophoresis-based analysis of loss of heterozygosity distinguishes nonobvious, deleterious BRCA1 variants from nonpathogenic polymorphisms*. Clin Chem, 1999. **45**(11): p. 2028-30.
115. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
116. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.

117. Sunyaev, S., V. Ramensky, and P. Bork, *Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms*. Trends Genet, 2000. **16**(5): p. 198-200.
118. Ng, P.C. and S. Henikoff, *Predicting deleterious amino acid substitutions*. Genome Res, 2001. **11**(5): p. 863-74.
119. Desmet, F.O., et al., *Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(9): p. e67.
120. *The International HapMap Project*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 789-96.
121. Parker, A.R., et al., *Cells with pathogenic biallelic mutations in the human MUTYH gene are defective in DNA damage binding and repair*. Carcinogenesis, 2005. **26**(11): p. 2010-8.
122. Jones, S., et al., *Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(23): p. 2961-7.
123. Sampson, J.R., et al., *Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH*. Lancet, 2003. **362**(9377): p. 39-41.
124. Cleary, S.P., et al., *Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study*. Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1251-60.
125. Win, A.K., et al., *Cancer risks for monoallelic MUTYH mutation carriers with a family history of colorectal cancer*. Int J Cancer, 2010.
126. Peterlongo, P., et al., *Increased frequency of disease-causing MYH mutations in colon cancer families*. Carcinogenesis, 2006. **27**(11): p. 2243-9.
127. Wikman, H., et al., *hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population*. Int J Cancer, 2000. **88**(6): p. 932-7.
128. Audebert, M., J.P. Radicella, and M. Dizdaroglu, *Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(14): p. 2672-8.
129. Kim, S.R., et al., *Suppression of chemically induced and spontaneously occurring oxidative mutagenesis by three alleles of human OGG1 gene encoding 8-hydroxyguanine DNA glycosylase*. Mutat Res, 2004. **554**(1-2): p. 365-74.

130. Anderson, P.C. and V. Daggett, *The R46Q, R131Q and R154H polymorphs of human DNA glycosylase/beta-lyase hOgg1 severely distort the active site and DNA recognition site but do not cause unfolding*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(27): p. 9506-15.
131. Garre, P., et al., *Analysis of the oxidative damage repair genes NUDT1, OGG1, and MUTYH in patients from mismatch repair proficient HNPCC families (MSS-HNPCC)*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(7): p. 1701-12.
132. Morak, M., et al., *First evidence for digenic inheritance in hereditary colorectal cancer by mutations in the base excision repair genes*. Eur J Cancer. **47**(7): p. 1046-55.
133. Wu, C., et al., *Polymorphisms and probable lack of mutation in a human mutT homolog, hMTH1, in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**(3): p. 1239-45.
134. Yamane, A., et al., *Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo*. Carcinogenesis, 2004. **25**(9): p. 1689-94.
135. Kohno, T., et al., *Association of the OGG1-Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk*. Cancer Sci, 2006. **97**(8): p. 724-8.
136. Janik, J., et al., *8-Oxoguanine incision activity is impaired in lung tissues of NSCLC patients with the polymorphism of OGG1 and XRCC1 genes*. Mutat Res. **709-710**: p. 21-31.
137. Lan, Q., et al., *Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions*. Carcinogenesis, 2004. **25**(11): p. 2177-81.
138. Xie, Y., et al., *Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3096-102.
139. Lipton, L., et al., *Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway*. Cancer Res, 2003. **63**(22): p. 7595-9.
140. Deng, G., et al., *BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(1 Pt 1): p. 191-5.

141. Wang, L., et al., *BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair*. *Cancer Res*, 2003. **63**(17): p. 5209-12.
142. Oliveira, C., et al., *Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(19): p. 2303-11.
143. Balaz, P., et al., *TCF-3, 4 protein expression correlates with beta-catenin expression in MSS and MSI-H colorectal cancer from HNPCC patients but not in sporadic colorectal cancers*. *Int J Colorectal Dis*. **25**(8): p. 931-9.
144. Lugli, A., et al., *Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis*. *Histopathology*, 2007. **50**(4): p. 453-64.
145. Musgrove, E.A., *Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation*. *Growth Factors*, 2006. **24**(1): p. 13-9.
146. Kim, J.K. and J.A. Diehl, *Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer*. *J Cell Physiol*, 2009. **220**(2): p. 292-6.
147. Soucek, L. and G.I. Evan, *The ups and downs of Myc biology*. *Curr Opin Genet Dev*. **20**(1): p. 91-5.
148. Essers, M.A., et al., *Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling*. *Science*, 2005. **308**(5725): p. 1181-4.
149. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers*. *Nature*, 1997. **386**(6627): p. 761, 763.
150. Garre, P., et al., *APC Yin-Yang haplotype associated with colorectal cancer risk*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2010. **1**: p. 879-883.

URLs

GLOBOCAN:	http://globocan.iarc.fr (27/06/2011)
Primer3:	http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm
ClustalW2:	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2
Polyphen:	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph
SIFT:	http://sift.jcvi.org/www/SIFT_ajigned_seqs_submit.html
HSF:	http://www.umd.be/HSF
HapMap:	http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/
Pubmed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
COSMIC:	http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic

ANEXOS

Anexo 1: Familias HNPCC-X

FAM.	C.C.	HNPCC	CG	ENF.	EDADm Dx	EDADp Dx	MSI test	MMR exp	MMR mut
7	AMS I	4	0	4	53	42	N(m)	POS	NEG
17	AMS I	5	0	4	62	49	N	POS	NEG
19	AMS I	6	0	5	63	50	N	POS	NEG
26	AR	7	0	7	53	53			NEG
27	AR	2	5	7	61	48	N	POS	NEG
28	AMS I	6	0	6	51	41	N(m)	POS	NEG
32	AR	2	1	3	56	55	N(m)	POS	MLH1 (vsc) c.1959 G>T (p.Leu653Leu) rs1800146
40	AR	4	0	4	65	52	N	POS	MSH2 (vsc) c.1511-9 T>A rs12998837
43	AR	4	1	5	64	51	N(m)	POS	NEG
81	AMS I	5	1	6	54	50	N(m)	POS	NEG
89	AMS I	3	0	3	58	47	N		NEG
108	AMS I	5	0	4	52	32	N	POS	NEG
111	AR	3	0	3	65	52	N(m)	POS	NEG
122	AMS I	3	0	3	54	28	N(m)	POS	NEG
142	AMS I	5	0	5	59	41	N(m)	POS	NEG
143	AMS I	3	0	3	51	42	N(m)	POS	NEG
160	AR	4	0	4	60	55			NEG
170	AMS I	4	0	4	55	40	N	POS	NEG
184	AMS I	5	0	5	57	45	N(m)	POS	
190	AMS II	3	0	3	48	40	N	POS	NEG
198	AMS I	4	0	4	52	42	N	POS	NEG
262	AR	3	0	3	57	54	N(m)	POS	
282	AR	5	0	5	55	32	N(m)	POS	
284	AMS II	3	0	3	68	50	N	POS	NEG
298	AR	5	0	5	54	44	N(m)		NEG
318	AMS I	5	0	5	64	46	N(m)	POS	NEG
322	AMS II	3	0	3	55	45	N		NEG
350	AMS I	3	0	3	60	47	N	POS	NEG
368	AMS I	4	0	4	66	45	N		NEG
401	AMS I	9	0	9	61	30	N	POS	
406	AMS II	4	0	4	51	47	N(m)	POS	
421	AMS I	5	0	5	59	47	N		NEG

FAM.	C.C.	HNPCC	CG	ENF.	EDADm Dx	EDADp Dx	MSI test	MMR exp	MMR mut
440	AR	5	2	6	63	51	N	POS	NEG
466	AMS I	3	0	3	55	42	N	POS	
483	AMS I	4	0	4	61	40	N	POS	
525	AR	4	0	3	58	51	N	POS	
CH-1	AR	9	1	6	40	29	N		NEG
CH-2	AMS I	4	0	4	48	40	N		NEG
CH-3	AMS I	6	0	6	63	43	N		NEG
CH-4	AMS I	3	0	3	51	49	N		NEG
CH-5	AMS II	3	0	3	41	40	N		NEG
CH-6	AMS I	3	0	3	59	33	N		NEG

FAM.: familia, C.C.: criterios clínicos de selección (AMS: Amsterdam, AR: alto riesgo), HNPCC: número de tumores colorrectales o asociados al Síndrome de Lynch que presenta la familia, CG: número de tumores gástricos que presenta la familia, ENF.: número de individuos afectados de cáncer, EDADm Dx: edad media de diagnóstico de cáncer, EDADp Dx: edad de diagnóstico del cáncer más temprano en la familia, MSI test: inestabilidad a microsatélites (N: no), MMR exp: expresión de proteínas Mlh1, Msh2, Msh6 y Pms2 en tumor (POS: todas positivas), MMR mut: resultado del estudio genético de los genes MMR. En algunas familias se han realizado estudios de inestabilidad en varios tumores ("m").

Anexo 2: Familiares HNPCC-X participantes

FAM.	SANGRE ID	SEXO	GRUPO	TUMORES	EDAD Dx	TUMOR ID	TIPO	POS TMA
7	275	F	AFECTO	CCR	42	98/3704	CCR	1-A1
7	284	M	AFECTO	CR	47			
7	2197	F	AFECTO	CO, CR, CCR	72, 73, 74			
7	2587	F	SANO					
7	2588	M	SANO					
17	334	F	AFECTO	CCR	49	98/16009	CCR	1-A3
17		M	AFECTO	CG, CCR	84, 91	89/6879	CG	
17	2658	M	SANO					
17	2671	F	SANO					
17	2672	F	SANO					
19	337	F	AFECTO	CCR	80	98/001B	CCR	1-A4
19	338	F	AFECTO	CCR	61			
19	339	F	SANO					
19	2814	M	AFECTO	CCR, CR	50, 55	06/2674	CCR	1-A5
19	2828	F	SANO					
26	387	F	AFECTO	CCR	53			
26	427	F	AFECTO	CR	68			
26	2610	M	SANO					
26	2611	F	SANO					
27	436	M	AFECTO	CCR	68	99/09797	CCR	1-B4
27	437	F	SANO					
27	480	F	AFECTO	CG	61			
27	2713	M	AFECTO	CG	67			
28		F	AFECTO	CCR	41	94/6428	CCR	
28	448	M	AFECTO	CCR	48	98/5114	CCR	1-B5
28	2225	F	AFECTO	CE	50			
28	2226	F	AFECTO	CCR	67			
28	3185	F	SANO					
28	3194	F	SANO					
32	457	M	AFECTO	CCR	56	99/02709	CCR	1-C2
32	517	M	AFECTO	CCR	56	68/985	CCR	
32	2690	M	SANO					
32	2691	M	SANO					
32	2712	M	SANO					
40	496	F	SANO					
40	497	F	SANO					
40	498	F	SANO					
40	510	M	AFECTO	CCR	52	98/957A3	CCR	1-C3
40	511	M	AFECTO	CV	72			
43	527	M	AFECTO	CCR	76			
43	528	M	AFECTO	CCR	51	99/7971	CCR	1-D1
43	529	F	AFECTO	CCR	77	98/25469	CCR	1-C5
43	2600	F	SANO	POL				
43	2601	F	SANO					
81	749	F	AFECTO	CCR	50	91/05563	CCR	1-F3
81	750	F	AFECTO	CCR	66	98/06049	CCR	1-F4
81	757	F	AFECTO	CCR	61	99/03673	CCR	1-F5
89	772	F	AFECTO	CCR	52	01/5759	CCR	1-G1
89	948	M	AFECTO	CCR	47			
89	2644	M	SANO					
89	2645	M	SANO					
108	972	F	AFECTO	CCR, CCR	37, 44	98/4365	CCR	1-H3
108	2609	F	SANO					

FAM.	SANGRE ID	SEXO	GRUPO	TUMORES	EDAD Dx	TUMOR ID	TIPO	POS TMA
108	2614	M	AFECTO	POL A	32			
108	2654	F	SANO					
108	2656	F	SANO					
111	978	M	AFECTO	CCR	52			
111	2617	M	SANO					
111	2670	F	SANO					
111	2680	M	AFECTO	CCR	61	02/1949	CCR	1-11
122	1042	F	AFECTO	CCR	52	00/4680	CCR	2-A4
122	1043	F	AFECTO	CCR	28	01/2921	CCR	
122	1044	F	SANO					
142	1188	F	AFECTO	CCR	60	01/1220	CCR	
142	1189	F	AFECTO	CCR	67	01/0657	CCR	2-B3
142		F	AFECTO	CCR	41	99/1479	CCR	
142	1190	F	SANO				CCR	
143	1215	F	AFECTO	CCR	42	99/12423	CCR	
143	1216	M	AFECTO	CCR	68	98/2243	CCR	2-B4
160	1311	M	AFECTO	CCR	60			
170	1391	M	AFECTO	CCR	40			
170	2734	F	SANO					
184	1522	F	AFECTO	CCR	52	00/17165	CCR	2-D3
184	1523	M	AFECTO	CCR	57			
190	1564	M	AFECTO	CCR	57	04/1033	CCR	2-E1
190	2629	F	SANO					
190	2630	M	SANO					
198	1690	M	AFECTO	CCR	53	03/6060	CCR	2-E3
198	1825	M	AFECTO	CCR	57			
198	2758	F	SANO	POL				
198	3663	M	SANO	POL				
198	3666	M	SANO					
198	3667	F	SANO					
198	3668	M	SANO					
262	1753	M	AFECTO	CCR	54	05/017719	CCR	2-F1
262	2692	F	SANO					
262	2693	M	SANO					
262	2697	M	SANO					
262	2698	F	AFECTO	CCR	56			
282	1485	F	AFECTO	CCR	77	05/4370	CCR	2-F3
282	1802	F	AFECTO	CCR	57			
282	1811	F	AFECTO	CCR	32	70/0579	CCR	2-F2
282	2647	F	SANO					
282	2648	M	SANO					
282	2649	M	SANO					
282		F	AFECTO	CCR	72	05/032142	CCR	2-F4
284	1803	M	AFECTO	CCR	79	03/0077	CCR	2-F5
298	1860	M	AFECTO	CCR	57	05/04994	CCR	2-G2
298	2781	M	SANO					
298	2782	F	SANO					
298	2783	F	AFECTO	POL A	44			
298	2811	M	SANO					
298	2816	M	SANO					
298	2817	F	SANO					
298	2957	F	SANO					
298	2958	M	SANO					
298	3661	M	SANO					

FAM.	SANGRE ID	SEXO	GRUPO	TUMORES	EDAD Dx	TUMOR ID	TIPO	POS TMA
298		F	AFECTO	CCR	49	02/13693	CCR	2-G1
318	1921	F	AFECTO	CCR	46			
318	2463	M	AFECTO	CCR	74	04/14940	CCR	2-G4
318	2464	F	AFECTO	CCR	72			
318	2659	F	SANO					
318	2660	F	SANO					
322	1901	M	AFECTO	CCR	45			
322	2624	M	SANO					
322	2625	M	SANO					
322	2626	M	SANO					
322	3680	F	SANO					
350	2037	F	SANO					
350	2042	M	AFECTO	CCR	47	05/209542	CCR	2-G5
350	2059	F	SANO					
350	2216	M	SANO					
350	2484	M	AFECTO	CCR	61			
368	2174	F	SANO	POL				
401	2235	M	AFECTO	CCR	52	05/3047	CCR	2-H3
406	2439	F	AFECTO	CCR	72			
406	2765	M	SANO					
406	2766	F	SANO					
406	2767	F	SANO					
406	2768	M	SANO					
406	2769	M	SANO					
406		M	AFECTO	CCR	47	02/1611	CCR	2-H4
421	2346	F	AFECTO	CCR	61	97/4802	CCR	2-H5
440	2310	F	AFECTO	CCR	51	06/02723	CCR	2-I1
466	2347	M	AFECTO	CCR	42	89/03294	CCR	2-I2
483	2496	F	AFECTO	CCR	40	07/05212	CCR	2-I3
525	2695	F	AFECTO	CCR	51	07/2168	CCR	2-I4
CH-1	1252	F	AFECTO	CCR	49			
CH-2	1524	M	AFECTO	CCR	40			
CH-3	1639	F	AFECTO	CCR	43			
CH-4	5653	F	AFECTO	CCR	54			
CH-5	7097	F	AFECTO	CCR	43			
CH-6	11071	F	AFECTO	CCR	67			

Anexo 3: Familias HNPCC-MSI

FAM.	C.C.	HNPCC	CG	ENF.	EDAD Dx(m)	EDAD Dx(p)	MSI test	MMR exp	MMR Mut
8	AMS I	8	0	7	55	34	MSI	MLh1 –	MLH1 IVS5 c.453+2 T>C
13	AMS I	7	1	6	42	34	MSI		MSH2 ex14 c.2239_2240 delAT (p.Ile747Arg fsX2)
21	AMS I	4	0	4	54	45	MSI	Msh2 Msh6–	MSH2 del ex1_7
22	AMS I	7	0	6	43	27	MSI		MLH1 ex8 c.1420delC (p.Arg474 fsX17)
25	AMS I	5	0	5	55	34	MSI	Msh2 – Msh6 –	MSH2 ex11 c.1737 A>G (p.Lys579Lys) rs61756467
29	AMS I	4	0	4	38	24	MSI		MLH1 ex13 c.1459 C>T (p.Arg487X) rs63749795
42	AMS I	4	1	4	37	27	MSI	MLh1 –	MLH1 ex11 c.955 G>T (p.Glu319X) rs63750796
44	AMS I	7	0	6	45	37	MSI	MLh1 – Pms2 –	MLH1 ex16 c.1865 T>A (p.Leu622His) rs63750693
48	AMS I	7	0	6	47	23	MSI	MLh1 – Pms2 –	MLH1 IVS17 c.1990-1 G>A
49	AMS I	16	0	15	51	30	MSI	MLh1 –	MLH1 ex9 c.717 C>A (p.Glu227Ser fsX42)
51	AMS I	3	0	3	35	29	MSI	MLh1 – Pms2 –	MLH1 ex18 c.2050 T>G (p.Tyr684Asp)
53	AR	4	1	3	41	27	MSI	Msh2 – Msh6 –	MSH2 ex7 c.1165C>T (p.Arg389X)
54	AMS I	5	1	5	52	43	MSI	MLh1 – Pms2 –	MLH1 ex18 c.2059 C>T (p.Arg687Try)
56	AMS I	12	0	10	40	28	MSI	MLh1 – Pms2 –	MLH1 ex1 c.23-38 del16 (p.Ile8Arg fsX4)
61	AR	4	0	4	48	39	MSI	Msh2 – Msh6 –	MSH2 ex12 c.1979_1980 delAT (p.Asp660Glu fsX15)
64	AMS I	8	0	7	48	29	MSI		MSH2 ex11 c.1704_1705 delAG (p.Glu569Asn fsX2)
65	AMS I	7	0	6	41	15	MSI	Msh2 – Msh6 –	MSH2 del ex7_12
71	AMS I	4	0	4	54	36	MSI	Msh2 – Msh6 –	MSH2 del PROM

FAM.	C.C.	HNPCC	CG	ENF.	EDAD Dx(m)	EDAD Dx(p)	MSI test	MMR exp	MMR Mut
73	AMS I	5	1	4	42	29	MSI	Msh6 –	MSH6 ex4 c.2633 T>C (p.Val878Ala)
76	AMS I	6	2	6	57	33	MSI*	Mlh1 – Pms2 –	MLH1 ex8 c.676 C>T (p.Arg226X)
77	AMS II	6	1	4	44	39	MSI		MSH2 ex10 c.1627 del G (p.Asp543Ile fsX7)
92	AMS I	14	1	15	48	27	MSI	Msh2 – Msh6 –	MSH2 ex12 c.2003_2014 delCTGGCCCAATA (p.Thr668_671Asn del)
94	AMS II	5	0	5	58	45	MSI	Msh6 –	MSH6 ex4 c.2633 T>C (p.V878A) rs2020912
104	AMS I	11	0	7	47	38	MSI	Msh2 – Msh6 –	MSH2 del ex7
106	AMS I	4	0	4	42	38	MSI		MSH2 ex5 c.812_813 delCT (p.Ser271Cys fsX12)
107	AMS I	8	0	7	53	42	MSI		MLH1 ex8 c.677+3 A>G (p.Gln197_Arg226 fsX8)
110	AMS II	6	1	5	49	33	MSI		MLH1 IVS12 c.1410-2_1411 delAGAA (p.Arg470Arg fsX8)
114	AR	4	1	4	50	40	MSI		MLH1 ex8 c.676 C>T (p.Arg226X)
118	AMS I	5	0	3	31	28	MSI		MLH1 ex8 c.676 C>T (p.Arg226X)
126	AMS I	8	0	6	35	26	MSI		MLH1 ex11 c.1015_1016 delTC (p.Ser361Leu fsX22)
134	AMS I	15	0	14	45	35	MSI	Mlh1 – Pms2 –	MLH1 ex19 c.2146 G>A (p.V716M) rs35831931
141	AMS I	4	0	4		19	MSI	Msh2 – Msh6 –	MSH2 del ex11_16
147	AMS I	3	0	3	43	30	MSI		MLH1 IVS9 c.790+1 G>A
150	AMS I	11	0	7	46	42	MSI	Msh6 –	MSH2 ex4 c.760 delA (p.Asn254Ile fsX20)
156	AMS I	9	0	5	48	25	MSI	Mlh1 – Pms2 –	MLH1 ex18 c.2078_2079 delAG (p.Glu693GlyfsX10)

FAM.	C.C.	HNPCC	CG	ENF.	EDAD Dx(m)	EDAD Dx(p)	MSI test	MMR exp	MMR Mut
164	AMS I	5	0	4	51	36	MSI	Msh2 – Msh6 –	MSH2 ex13 c.2194_2196delACT (p.Thr732 del)
181	AMS I	4	0	3	41	39	MSI		MSH2 ex13 c.2034 T>A (p.Tyr678X)
183	AMS II	5	0	5	43	33	MSI		MLH1 ex3 c.290 insA (p.Tyr97X)
186	AR	3	0	3	42	36	MSI	Msh2 – Msh6 –	
188	AMS I	5	0	5	45	37	MSI		MSH2 ex7 c.1165 C>T (p.Arg389X) rs63751481
191	AR	5	1	4	48	40	MSI		MLH1 ex16 c.1783_1784 delAG (p.Ser595Trp fsX14) rs63750035
209	AMS I	4	0	4	40	18	MSI		MLH1 IVS8 c.677+1 G>T
221	AMS I	5	1	5	45	39	MSI	Msh2 – Msh6 –	MSH2 ex3 c.388 C>T (p.Asn130X)
236	AMS II	3	1	3	58	42	MSI		MLH1 ex13 c.1459 C>T (p.Arg487X)
312	AMS II	6	0	4	49	45	MSI		MLH1 ex8 c.677 G>A (p.Arg226Gln)
317	AMS II	5	0	5	53	40	MSI	Mlh1 – Pms2 –	MLH1 ex16 c.1865 T>A (p.Leu622His)
372	AMS I	13	1	13	46	21	MSI	Mlh1 – Pms2 –	MLH1 IVS1 c.117-1 G>T
386	AMS I	17	0	16	42	22	MSI	Mlh1 –	MLH1 ex13 c.1420 delC (p.Arg474Gly fsX17)

FAM.: familia, C.C.: criterios clínicos de selección (AMS: Amsterdam, AR: alto riesgo), HNPCC: número de tumores colorrectales o asociados al Síndrome de Lynch que presenta la familia, CG: número de tumores gástricos que presenta la familia, ENF.: número de individuos afectados de cáncer, EDADm Dx: edad media de diagnóstico de cáncer, EDADp Dx: edad de diagnóstico del cáncer más temprano en la familia, MSI test: inestabilidad a microsatélites, MMR exp: expresión de proteínas Mlh1, Msh2, Msh6 y Pms2 en tumor (-: negativo), MMR mut: resultado del estudio genético de los genes MMR. En algunas familias se han realizado estudios de inestabilidad en varios tumores ("m"). * En La familia 76 los estudios de inestabilidad e inmunohistoquímica se han llevado a cabo en un tumor gástrico por ser el único tumor disponible.

Anexo 4: Familiares HNPCC-MSI participantes

FAM	SANGRE ID	SEXO	GRUPO	TUMORES	EDAD Dx	TUMOR ID	TIPO	POS TMA
8	276	M	AFECTO	CCR,CCR	55,65	00/10002	CCR(65)	1-A2
8	516	M	AFECTO	CCR	36			
13	303	M	AFECTO	CCR,CU,CU	35,42,50			
13	304	F	AFECTO	CCR	34			
21	362	M	AFECTO	CCR	45	98/1219	CCR	1-B1
22	363	F	AFECTO	CCR	27			
22	551	F	SANO					
22	552	F	SANO					
22	628	F	AFECTO	CCR,CE	43,43			
22	629	F	AFECTO	CE	40			
25	115	F	SANO					
25	199	F	SANO					
25	377	F	SANO					
25	378	M	AFECTO	CCR	75	89/8646	CCR	1-B2
25	379	F	AFECTO	CCR	43			
25		M	AFECTO	CCR	34	94/12343	CCR	1-B3
29	447	M	AFECTO	CCR	24	95/2322	CCR	1-C1
42	500	M	AFECTO	CCR	41	99/17659	CCR	1-C4
42	519	F	AFECTO	CCR	41			
42	1167	M	SANO					
44	534	F	AFECTO	CCR	38			
44	687	F	AFECTO	CE,CCR	53,65	00/3733	CCR	1-D2
44	688	F	AFECTO	CE	55			
44	731	M	SANO					
44	732	F	SANO					
44	733	F	SANO					
44	762	F	SANO					
48	546	M	SANO					
48	566	M	AFECTO	CCR	23	00MP393	CCR	1-D3
48	570	M	AFECTO	CCR	35			
48	571	F	AFECTO	CCR	54			
48	593	M	SANO					
49	549	F	AFECTO	CU,CE	48,52			
49	1049	M	SANO					
49	1050	M	AFECTO	CCR	30			
49	1051	M	SANO					
51	555	F	AFECTO	CCR	35	99/9802	CCR	1-D4
51	1656	M	SANO					
53	561	F	AFECTO	CE,CCR,CR	52,59,62			
53	562	M	AFECTO	CCR	37			
53	623	M	SANO					
54	579	M	AFECTO	CCR	43	94/B540	CCR	1-D5
54	639	M	AFECTO	CCR	70	93/01842	CCR	1-E1
54	640	M	AFECTO	CCR,CCR	49,70	92184710	CCR(70)	1-E2
56	597	M	AFECTO	CCR,CCR	30,48	00/1674	CCR(48)	1-E3
56	1813	M	AFECTO	CCR	28			
56	1814	F	SANO					
61	618	M	AFECTO	CCR	62	9912B142	CCR	1-E4
61	619	M	AFECTO	CCR	43			
61	621	F	AFECTO	CE	39			
61	699	M	SANO					
64	616	M	AFECTO	CCR	29			
64	725	M	SANO					

FAM	SANGRE ID	SEXO	GRUPO	TUMORES	EDAD Dx	TUMOR ID	TIPO	POS TMA
64	728	F	SANO					
64	729	M	AFECTO	CCR	38			
64	747	M	SANO					
64	758	M	SANO					
64	759	M	SANO					
64	760	M	SANO					
65	625	M	AFECTO	CCR	48	00/11284	CCR	1-E5
65	635	F	AFECTO	CCR	45			
65	665	M	AFECTO	CCR	15			
71	771	F	AFECTO	CCR	50	06/15278	CCR	1-F1
73	526	M	AFECTO	CCR	23			
73	1364	F	AFECTO	CCR	48			
76	737	M	AFECTO	CCR,CCR,CG	45,50,68	00/8364	CG	1-F2
76	739	M	SANO					
77	734	F	AFECTO	CE	42			
92	821	M	AFECTO	CCR	64	93/4219	CCR	1-G2
92	822	M	AFECTO	CCR	27	87/5044	CCR	1-G3
92	983	M	AFECTO	CCR	44			
92	984	F	SANO					
92	985	F	SANO					
92	1055	M	SANO					
92	1077	M	SANO					
94	854	M	AFECTO	CCR	55	00/5245	CCR	1-G4
94	855	F	AFECTO	CE	45			
94	1032	M	SANO					
94	1033	M	SANO					
104	943	F	AFECTO	CU,CCR,CE,CU	65,65,70,76	90/17181	CCR	1-G5
104	1163	F	AFECTO	CCR,CCR	40,40	02/1102	CCR	1-H1
104	1650	M	SANO					
104	1651	M	SANO					
106	967	F	AFECTO	CCR	42	01/1744	CCR	1-H2
107	977	F	AFECTO	CE	50			
107	1235	F	SANO					
110	989	M	AFECTO	CCR,CCR	33,55	02/11314	CCR(55)	1-H4
110	1201	M	AFECTO	CCR,CCR	41,49	01/1309	CCR(49)	1-H5
110	1204	F	SANO					
114	998	F	AFECTO	CCR,CE	50,55	01/20433	CCR	2-A1
114	1016	F	SANO					
114	1017	F	AFECTO	CCR	40	99/57483	CCR	2-A2
114	1249	M	SANO					
114	1250	F	SANO					
114	1386	M	SANO					
118	1026	F	AFECTO	CCR,CCR,CCR	32,45,47	97/9100	CCR(47)	2-A3
118	1345	M	SANO					
126	1101	F	AFECTO	CCR	36	97/16069	CCR	2-A5
126	1355	M	SANO					
126	1486	F	SANO					
126	1531	M	SANO					
134	1144	M	AFECTO	CCR,CCR	45,46	01/6826	CCR(45)	2-B1
141	1162	F	AFECTO	CCR	19	90/B6	CCR	2-B2
147	1238	M	AFECTO	CCR	41	03/05481	CCR	2-B5
150	1246	F	AFECTO	CCR	43	03/10745	CCR	2-C1
150		F	AFECTO	CR,CE,CCR	42,47,54	05/760	CE	2-C2
156	1295	F	AFECTO	CCR,CE,CCR	33,43,49			

FAM	SANGRE ID	SEXO	GRUPO	TUMORES	EDAD Dx	TUMOR ID	TIPO	POS TMA
156	1296	F	AFECTO	CCR	25	03/5101	CCR	2-C3
164	1363	M	AFECTO	CCR	36	04/1891	CCR	2-C5
164	1599	F	AFECTO	CCR,CE	43,55	91/745	CCR	2-C4
164	1944	M	SANO					
164	1945	M	SANO					
181	1484	F	AFECTO	CCR	39	95/4574	CCR	2-D1
183	1504	F	AFECTO	CCR	61	03/16948	CCR	2-D2
186		M	AFECTO	CCR	36	94/8050	CCR	2-D4
188	1323	M	AFECTO	CCR	37	98/1688	CCR	2-D5
191	1563	F	AFECTO	CE,CCR	40,50	05/01312	CCR	2-E2
209	1603	F	AFECTO	CCR	18	97/3144	CCR	2-E4
209	2313	M	AFECTO	CCR	52			
209	2314	M	AFECTO	CCR	45			
221	1685	F	AFECTO	CCR	45	05/5399	CCR	2-E5
221	2160	F	SANO					
221	2161	M	SANO					
221	2162	F	SANO					
236	1717	M	AFECTO	CCR,CG	42,46			
236	1841	F	SANO					
236	2287	F	SANO					
236	2292	M	SANO					
312	1653	F	AFECTO	CE,CCR	46,48	05/18432	CCR	2-G3
312	2217	F	SANO					
312	2218	M	SANO					
317	1884	M	AFECTO	CCR	59			
317	2445	F	SANO					
372	2126	M	AFECTO	CCR,CG	45,53	99/7581	CCR	2-H1
386	2172	F	AFECTO	CCR	49	05/5180	CCR	2-H2

Anexo 5: Pacientes escoceses portadores de mutación germinal en *MUTYH*.

ID-T	ID-S	SEXO	Dx	MAP	VARIANTES MUTYH			VARIANTES BER
					c.536 A>G* p.Tyr179Cys rs34612342	c.1187 G>A* p.Gly396Asp rs36053993	OTRAS	
SF1		F	59	SI	GG	GG		
SF2		F	64	NO	AA	GA		
SF3	3044	F	56	SI	AA	AA		
SF4	2630	F	36	NO	AG	GA		
SF5		M	57	NO	AA	GA	c.379 G>A p.Ala127Tyr OGG1 ex2 c.253 G>T p.Ala85Ser rs52835497	
SF6	1184	M	32	NO	AA	GA		
SF7		M	63	NO	AA	GA	c.1014 A>G p.Gln338His rs3219489 MTH1 ex1 c.161 G>A p.Gln54Arg	
SF8	2256	M	50	SI	AG	GA		
SF9	1299	F	55	SI	GG	GG		
SF10		M	54	NO	AA	GA		
SF11		M	57	NO	AA	GA	OGG1 ex4 c.589 A>T p.Arg197Trp	
SF12	2574	F	48	SI	AA	AA		
SF13		M	56	NO	AG	GA		
SF14		F	44	NO	AA	GA	c.1014 A>G p.Gln338His rs3219489	
SF15		M	56	SI	AA	AA		
SF16		M	53	SI	AA	AA		
SF17	1960	M	43	SI	AG	GG	c.1214 C>T* p.Pro405Leu MTH1 ex1 c.161 G>A p.Gln54Arg	
SF19	2650	F	52	SI	AA	AA		
SF20	2734	F	47	?	AA	AA		
SF21		M	39	SI	AG	GA		
SF22		F	49	SI	AA	AA		
	1010	M	43	SI	GG	GG		
	2395	M	51	SI	AG	GA		
	2519	F	40	NO	AA	GA		
	2564	M	20	NO	AA	GA		
	2596	F	37	NO	AA	GA		
	3412	F	77	NO	AG	GG		
	3474	F	70	NO	AG	GG		
	3680	F	78	NO	AA	GA	MTH1 ex3 c.366 G>C p.Asp122Asp	

ID-T: identificación del DNA de tumor, ID-S: identificación del DNA de sangre, Dx: edad de diagnóstico CCR, * Variantes descritas como patogénicas y responsables de la "Poliposis Adenomatosa Familiar" cuando se presentan en homocigosis o en combinación bialélica.

Anexo 6: Pares de cebadores utilizados para el estudio de los genes *OGG1*, *MTH1* y *MUTYH*.

GEN	EXON	CEBADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLICÓN (pb)
<i>OGG1</i>	1	DIRECTO	5'-GAGGCCTGGTTCTGGGTAG-3'	214
		REVERSO	5'-GGCTTCTCAGGCTCAGTCAC-3'	
<i>OGG1</i>	2	DIRECTO	5'-AATTGAGTGCCAGGGTTGTC-3'	313
		REVERSO	5'-CTAACCCAGCCAGGTC-3'	
<i>OGG1</i>	3	DIRECTO	5'-CTCCTACCCCTGCATTCT-3'	230
		REVERSO	5'-GCAGGGGACCCACCTACT-3'	
<i>OGG1</i>	4	DIRECTO	5'-TTGAAGATGCCTGATGCTTG-3'	289
		REVERSO	5'-GGCTCATTTCTGCTCTCC-3'	
<i>OGG1</i>	5	DIRECTO	5'-CTTCTTCCACAAGGGCTCAT-3'	234
		REVERSO	5'-TCTACCATCCCAGCCCACT-3'	
<i>OGG1</i>	6	DIRECTO	5'-TGTTGATGGGTCACAGAAGG-3'	207
		REVERSO	5'-GGCTGGAGAGTCCTTTAGGG-3'	
<i>OGG1</i>	7	DIRECTO	5'-CACACAGACTCCACCCTCCT-3'	151
		REVERSO	5'-AGGTGCTTGGGGAATTTCTT-3'	
<i>OGG1</i>	8a	DIRECTO	5'-TTGTGCAGGACAGCAATCTC-3'	228
		REVERSO	5'-TCCAGCAGTGGTCACAGAAC-3'	
<i>OGG1</i>	8b	DIRECTO	5'-AGCCTCTCCTCCATTCCCTA-3'	215
		REVERSO	5'-CCAGCTCAACAGGAGACTCA-3'	
<i>MTH1</i>	1	DIRECTO	5'-TGGAGCAATCAGATCACACG-3'	233
		REVERSO	5'-GTCAAGAGGACGTGGAAAGC-3'	
<i>MTH1</i>	2	DIRECTO	5'-TGACTCTGCCCTCTCACCTT-3'	224
		REVERSO	5'-CGGTTCTATGGCCAGACCT-3'	
<i>MTH1</i>	3	DIRECTO	5'-TGTGTGTAGATGCCAGCTC-3'	289
		REVERSO	5'-GAGATGGGACCCGCATAGT-3'	
<i>MTH1</i>	4	DIRECTO	5'-CCTCTCTTCCCCATTG-3'	244
		REVERSO	5'-CTGTTCAGCAGCCACGTCT-3'	
<i>MUTYH</i>	1	DIRECTO	5'-GAGCCTCTAGAACTATGAGC-3'	328
		REVERSO	5'-CAGGCCAATAGGCAATTAGC-3'	
<i>MUTYH</i>	2	DIRECTO	5'-GCAGCCAGCCAAGAGTAAAC-3'	394
		REVERSO	5'-GCACCTGGCCCTTAGTAAGTC-3'	
<i>MUTYH</i>	3	DIRECTO	5'-TCTGACTCCAGCTCCAAAGC-3'	437
		REVERSO	5'-TCTCAGGAGATGTAAGTACC-3'	
<i>MUTYH</i>	4+5	DIRECTO	5'-CTGCTAAGCTGGTACGACC-3'	496
		REVERSO	5'-ACAGGCAGGCAGAAAGAGAC-3'	
<i>MUTYH</i>	6+7	DIRECTO	5'-GGAAGGGTCATGGGTCAGAC-3'	440
		REVERSO	5'-TGCAGGGTCTCTGCTGTACG-3'	
<i>MUTYH</i>	8	DIRECTO	5'-TGAATCAACTCTGGGCTGG-3'	371
		REVERSO	5'-GCTACGTTGCCATCCACCAC-3'	
<i>MUTYH</i>	9	DIRECTO	5'-ACATGCCACGTACAGCAGAG-3'	416
		REVERSO	5'-CATGGCTGCTTGTTGAAATC-3'	
<i>MUTYH</i>	10	DIRECTO	5'-TTGTTTCCAGCAGCTCTGG-3'	350
		REVERSO	5'-TGAGGCTAAGAGCTGTTCC-3'	
<i>MUTYH</i>	11	DIRECTO	5'-CCTGTGGAGAGCCTGTG-3'	319
		REVERSO	5'-AGCCAAGAGGGCTTTAGG-3'	
<i>MUTYH</i>	12	DIRECTO	5'-CCAGTTCTCCTCTAACCTG-3'	419
		REVERSO	5'-TGCCAGCAGACCTGAGAGG-3'	
<i>MUTYH</i>	13	DIRECTO	5'-AGGGAATCGGCAGCTGAG-3'	209
		REVERSO	5'-GCTATTCCGCTGCTCACTTA-3'	

GEN	EXON	CEBADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLICÓN (pb)
MUTYH	14	DIRECTO	5'-CAGGAACACAGCGTTGG-3'	458
		REVERSO	5'-TTGCAGTCAACCGAGATAGC-3'	
MUTYH	15	DIRECTO	5'-AAAAAGTGCCAGCCCTCAC-3'	192
		REVERSO	5'-AGTGAAGCCTGGAGTGGAGA-3'	
MUTYH	16	DIRECTO	5'-GGCAGATACTTGAGGCAGG-3'	390
		REVERSO	5'-AACATAGCGAGACCCCATCTC-3'	

pb: pares de bases

Anexo 7: Parejas de cebadores utilizados para el estudio de los transcritos del gen *OGG1* procedentes de portadores de la variante R46Q.

GEN	LOC. <i>OGG1</i>	CEBADOR	SECUENCIA	AMP. cDNA-N (pb)	AMP. cDNA-A (pb)
<i>OGG1</i>	EXON 1	DIRECTO	5'-ACGAGGCCTGGTTCTGGGTAG -3'	643	1164
	EXON 4	REVERSO	5'-GAGATGAGCCTCCACCTCTG-3'		
<i>OGG1</i>	EXON 1	DIRECTO	5'-(6FAM)ATGGGGCATCGTACTCTAGC-3'	482	1003
	EXON 3	REVERSO	5'-CTTTTGGACCTCGGCTCAT-3'		
<i>OGG1</i>	EXON 1	DIRECTO	5'-(6FAM)ATGGGGCATCGTACTCTAGC-3'	NA	131
	INTRON 1	REVERSO	5'-GGCTTCTCAGGCTCAGTCAC-3'		

LOC.: localización, AMP.:amplicón, cDNA-N: cDNA correspondiente al transcrito normal, cDNA-A: cDNA correspondiente al transcrito aberrante.

Anexo 8: Parejas de cebadores para la amplificación y secuenciación de los codones 12, 13, 61 y 146 del gen *KRAS* y el codón 600 del gen *BRAF*.

GEN	EXÓN	CEBADOR	SECUENCIA	AMPLICIÓN (pb)
K-RAS	2	DIRECTO	5'-GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA-3'	214
		REVERSO	5'-GAATGGTCCTGCACCAGTAA-3'	
K-RAS	3	DIRECTO	5'-TCAAGTCCTTTGCCCATTTT-3'	375
		REVERSO	5'-TGCATGGCATTAGCAAAGAC-3'	
K-RAS	4	DIRECTO	5'-TGACAAAAGTTGTGGACAGGT-3'	390
		REVERSO	5'-AAGAAGCAATGCCCTCTCAA-3'	
B-RAF	15	DIRECTO	5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3'	228
		REVERSO	5'-AGCATCTCAGGGCAAAAAT-3'	

pb: pares de bases

Anexo 9: Análisis de mutaciones de los genes *OGG1*, *MUTYH* y *MTH1* en casos índice (CI) de familias HNPCC-X.

FAM.	CI	Dx	<i>OGG1</i>	<i>MTH1</i>	<i>MUTYH</i>
7	275	42	WT	WT	WT
17	334	49	WT	c.316 G>A (p.Val106Met) c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.1014 G>C (p.Gln338His) c.504+35 G>A
19	337	80	c.285 C>T (p.Ala95Ala)	WT	c.1187 G>A (p.Gly396Asp) c.1014 G>C (p.Gln338His)
26	387	53	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.1014 G>C (p.Gln338His)
27	436	68	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	WT	c.1014 G>C (p.Gln338His)
28	448	48	WT	WT	c.1014 G>C (p.Gln338His)
32	457	56	c.977 C>G (p.Ser326Cys)	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.1014 G>C (p.Gln338His)
40	510	52	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.504+35 G>A
43	528	51	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.504+35 G>A
81	749	50	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	WT	WT
89	948	47	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	WT	c.1014 G>C (p.Gln338His)
108	972	37	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
111	978	52	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
122	1043	28	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	WT	c.504+35 G>A
142	1189	67	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	c.366 C>T (p.Asp122Asp)	c.1014 G>C (p.Gln338His)
143	1215	42	WT	WT	WT
160	1311	60	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.504+35 G>A
170	1391	40	c.748-15 C>G c.977 C>G p.Ser326Cys)	WT	c.504+35 G>A
184	1522	52	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
190	1564	57	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.1014 G>C (p.Gln338His) c.504+35 G>A
198	1690	53	WT	WT	c.1187-27 C>T

FAM.	CI	Dx	OGG1	MTH1	MUTYH
262	1753	54	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	WT	c.1014 G>C (p.Gln338His)
282	1811	21	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
284	1803	79	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
298	1860	57	c.137 G>A (p.Arg46Gln)	WT	c.504+35 G>A
318	1921	46	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	WT	c.1014 G>C (p.Gln338His)
322	1901	45	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.504+35 G>A
350	2042	47	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.690+21 C>A
368	2174	24	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	WT	WT
401	2235	54	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	WT	c.1014 G>C (p.Gln338His) c.504+35 G>A
406	2439	72	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.1014 G>C (p.Gln338His)
421	2346	61	WT	WT	c.1014 G>C (p.Gln338His)
440	2310	51	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	WT	c.1014 G>C (p.Gln338His)
466	2347	42	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
483	2496	40	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
525	2695	51	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
CH-1	1252	49	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.504+35 G>A
CH-2	1524	40	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
CH-3	1639	43	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
CH-4	5653	54	c.748-15 C>G c.977 C>G (p.Ser326Cys)	c.366 C>T (p.Asp122Asp) c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
CH-5	7097	43	WT	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	WT
CH-6	11074	67	c.923 G>A (p.Gly308Glu)	c.426 C>T (p.Asp142Asp)	c.1014 G>C (p.Gln338His)

Anexo 10: Resultado del análisis del espectro de mutaciones del gen *KRAS* en DNA de tumores colorrectales de pacientes HNPCC-X.

ID TUMOR	FAMILIA	EDAD DX	KRAS (exones 2, 3 y 4)	
98/3704	7	42	wt	
98/16009	17	49	c.175 G>T (p.Ala59Ser)	
98/001B	19	80	c.35 G>C (p.Gly12Ala) rs121913529	
06/2674	19	50	c.38 G>A (p.Gly13Asp) rs11244544	
99/09797	27	68	c.35 G>A (p.Gly12Asp) rs121913531	
94/6428	28	41	wt	
98/5114	28	48	wt	
68/985	32	56	c.35 G>A (p.Gly12Asp) rs121913531	
99/02709	32	56	wt	
98/957A3	40	52	c.35 G>T (p.Gly12Val) rs121913534	
99/7971F	43	51	c.34 G>A (p.Gly12Ser) rs121913530	c.39 C>T (p.Gly13Gly)
98/25469	43	77	wt	
91/5563	81	50	wt	
99/3673	81	61	c.35 G>T (p.Gly12Val) rs121913534	
0/5759	89	52	wt	
02/019490	111	61	c.34 G>C (p.Gly12Arg) rs121913530	
01/2921	122	28	wt	
00/4680	122	52	c.35 G>A (p.Gly12Asp) rs121913531	
01/1220	142	60	c.38 G>A (p.Gly13Asp) rs112445441	
99/1479	142	41	c.149 C>T (p.Thr50Ile)	
01/0657	142	67	c.38 G>A (p.Gly13Asp) rs112445441	
99/12423	143	42	c.38 G>A (p.Gly13Asp) rs112445441	
98/2243	143	68	c.38 G>A (p.Gly13Asp) rs112445441	
00/17165	184	52	c.35 G>A (p.Gly12Asp) rs121913531	
04/1033	190	57	c.35 G>C (p.Gly12Ala) rs121913529	
03/6060	198	53	wt	
5B/017719	262	54	wt	
05/32142	282	72	c.35 G>A (p.Gly12Asp) rs121913531	
05/4370	282	77	c.34 G>T (p.Gly12Cys)	c.149 C>T (p.Thr50Ile)
70/0579	282	32	c.34 G>T (p.Gly12Cys)	
03/0077	284	79	c.34 G>T (p.Gly12Cys)	c.35 G>A (p.Gly12Asp) rs121913531
05/4994	298	57	wt	
05/209542	350	47	wt	
05/3047	401	52	wt	
02/1611	406	47	wt	

ID TUMOR	FAMILIA	EDAD DX	KRAS (exones 2, 3 y 4)
97/4802	421	61	wt
06/02723	440	51	c.35 G>A (p.Gly12Asp) rs121913531
89/03294	466	42	c.35 G>A (p.Gly12Asp) rs121913531
07/05212	483	40	c.35 G>C (p.Gly12Ala) rs121913529
07/2168	525	51	wt

En azul se muestran las variantes no descritas en las bases de datos *pubmed* y *COSMIC* (catalogue of somatic mutations in cancer).

Anexo 11: Resultado del análisis del espectro de mutaciones del gen *KRAS* en DNA de tumores colorrectales de pacientes MUTYH.

-ID TUMOR	mut <i>MUTYH</i>	EDAD DX	<i>KRAS</i> exones 2, 3 y 4
1010	BI	43	c.437 C>T (p.Ala146Val)
1184	MONO	32	wt
1299	BI	55	c.34 G>T (p.Gly12Cys)
1960	MONO	43	wt
2256	BI	50	c.34 G>T (p.Gly12Cys)
2395	BI	51	c.34 G>T (p.Gly12Cys)
2519	MONO	40	wt
2564	MONO	20	wt
2574	BI	48	c.34 G>T (p.Gly12Cys)
2596	MONO	37	wt
2630	BI	36	wt
2650	BI	52	c.34 G>T (p.Gly12Cys)
2734	BI	47	c.34 G>T (p.Gly12Cys)
3044	BI	56	c.34 G>T (p.Gly12Cys)
3412	MONO	77	wt
3474	MONO	70	wt
3680	MONO	78	wt

En azul se muestran las variantes no descritas en las bases de datos *pubmed* y *COSMIC* (catalogue of somatic mutations in cancer).

Anexo 12: Porcentaje de núcleos positivos para el nucleósido 8-OHdG en células de muestras tumorales de pacientes HNPCC-X.

FAM.	DNA	TUMOR	Dx	MORF.	NÚMERO			PORCENTAJE	
					TOTAL	NEG.	POS.	NEG.	POS.
7	275	98/3704	42	normal	182	182	0	100,0	0,0
7	275	98/3704	42	tumor	132	132	0	100,0	0,0
17	334	98/16009	49	tumor	106	83	23	78,3	21,7
19	337	98/001B	80	tumor	107	106	1	99,1	0,9
19	2814	06/2674	50	normal	168	109	59	64,9	35,1
19	2814	06/2674	50	tumor	151	109	42	72,2	27,8
27	436	99/09797	68	tumor	119	51	68	42,9	57,1
28	448	98/5114	48	tumor	116	26	90	22,4	77,6
32	457	99/02709	56	tumor	131	53	78	40,5	59,5
40	510	98/957A3	52	tumor	115	70	45	60,9	39,1
43	529	98/25469	77	tumor	118	51	67	43,2	56,8
43	528	99/7971	51	normal	166	21	145	12,7	87,3
81	749	91/05563	50	tumor	138	17	121	12,3	87,7
81	750	98/06049	66	tumor	100	18	82	18,0	82,0
108	972	98/4365	37	tumor	156	2	154	1,3	98,7
111	2680	02/1949	61	tumor	107	16	91	14,9	85,1
122	1042	00/4680	52	tumor	158	15	143	9,5	90,5
122	1042	00/4680	52	indiferenciado	174	15	159	8,6	91,4
142	1189	01/0657	67	tumor	165	12	153	7,3	92,7
143	1216	98/2243	68	indiferenciado	179	3	176	1,7	98,3
184	1522	00/17165	52	tumor	149	7	142	4,7	95,3
190	1564	04/1033	57	tumor	238	15	223	6,3	93,7
198	1690	03/6060	53	tumor	155	4	151	2,6	97,4
262	1753	05/017719	54	tumor	135	7	128	5,2	94,8
282	1811	70/0579	32	tumor	111	1	110	0,9	99,1
282	no	05/032142	72	tumor	81	2	79	2,5	97,5
282	1485	05/4370	77	indiferenciado	145	5	140	3,4	96,6
284	1803	03/0077	79	tumor	152	17	135	11,9	88,8
298	no	02/13693	49	tumor	139	5	134	3,6	96,4
298	1860	05/4994	57	tumor	123	11	112	8,9	91,1
318	2463	04/14940	74	tumor	133	2	131	1,5	98,5
350	2042	05/209542	47	tumor	197	28	169	14,2	85,8
401	2235	05/3047	52	tumor	131	4	127	3,1	96,9
406	no	02/1611	47	tumor	130	24	106	18,5	81,5
421	2346	97/4802	61	tumor	103	6	97	5,8	94,2
440	2310	06/2723	51	tumor	147	19	128	12,9	87,1
466	2347	89/03294	42	tumor	364	3	361	0,8	99,2
483	2496	07/05212	40	tumor	276	9	267	3,3	96,7
525	2695	07/2168	51	tumor	233	11	222	4,7	95,3

FAM.: familia, Dx: edad de diagnóstico, MORF.: área morfológica analizada, NEG.: células con núcleos negativos para la detección de 8OHdG, POS.: células con núcleos con detección positiva para 8OHdG.

Anexo 13: Porcentaje de núcleos positivos para el nucleósido 8-OHdG en células de muestras tumorales de pacientes HNPCC-MSI.

FAM.	DNA	TUMOR	Dx	MORF.	NÚMERO			PORCENTAJE	
					TOTAL	NEG.	POS.	NEG.	POS.
8	276	00/1002	65	normal	140	137	3	97,9	2,1
8	276	00/1002	65	tumor	102	89	13	87,2	12,8
21	362	98/1219	45	indiferenciado	233	27	206	11,6	88,4
25	no	94/12343	34	tumor	118	87	31	73,7	26,3
25	378	89/8646	75	normal	125	125	0	100,0	0,0
25	378	89/8646	75	indiferenciado	273	0	273	0,0	100,0
29	447	95/2322	24	tumor	106	18	88	16,0	83,0
44	687	00/3733	65	indiferenciado	202	37	165	18,3	81,7
48	566	00/MP393	23	tumor	168	25	143	14,9	85,1
51	555	99/9802	35	tumor	110	19	91	17,3	82,7
54	579	94/B540	43	indiferenciado	208	36	172	17,3	82,7
54	639	93/01842	70	tumor	150	46	104	30,7	69,3
54	640	92/184710	70	tumor	186	56	130	30,1	69,9
61	618	99/12B142	62	tumor	123	14	109	11,4	88,6
65	625	00/11284	48	tumor	110	37	73	33,6	66,4
71	771	06/15278	50	tumor	100	26	74	26,0	74,0
94	854	00/5245	55	tumor	169	21	148	12,4	87,6
104	943	90/1718	65	tumor	125	36	89	28,8	71,2
104	1163	02/1102	40	tumor	124	3	121	2,4	97,6
106	967	01/1744	42	indiferenciado	259	103	156	39,8	60,2
106	967	01/1744	42	tumor	113	53	60	46,9	53,1
110	989	02/11314	55	tumor	125	6	119	4,8	95,2
110	1201	01/1309	49	indiferenciado	300	78	222	26,0	74,0
114	998	01/20433	50	tumor	117	15	102	12,8	87,2
114	1017	99/57483	40	tumor	126	20	106	15,9	84,1
118	1026	97/9100	47	tumor	117	68	49	58,1	41,9
118	1026	97/9100	47	indiferenciado	173	13	160	7,5	92,5
126	1101	97/16069	36	indiferenciado	264	0	264	0,0	100,0
134	1144	01/6826	45	tumor	88	48	40	54,5	45,5
141	1162	90/B6	19	tumor	147	7	140	4,8	95,2
147	1238	03/5481	41	tumor	111	6	105	5,4	94,6
150	1246	03/10745	43	tumor	182	24	158	13,2	86,8
164	1599	91/745	43	tumor	119	11	108	9,2	90,8
164	1363	04/1891	36	tumor	173	21	152	12,1	87,9
181	1484	95/4574	39	tumor	126	26	100	20,6	79,4
183	1504	03/16948	61	tumor	138	13	125	9,4	90,6
188	1323	98/1688	37	tumor	110	1	109	0,9	99,1
191	1563	05/01312	50	tumor	132	10	122	7,6	92,4
209	1603	97/3144	18	tumor	250	9	241	3,6	96,4
221	1685	05/5399	45	tumor	128	6	122	4,7	95,3
312	1653	05/18432	48	tumor	127	8	119	6,3	93,7
372	2126	99/7581	45	tumor	141	16	125	11,3	88,7
386	2172	05/5180	49	tumor	107	8	99	7,5	92,5

FAM.: familia, Dx: edad de diagnóstico, MORF.: área morfológica analizada, NEG.: células con núcleos negativos para la detección de 8OHdG, POS.: células con núcleos con detección positiva para 8OHdG.

Anexo 14: Porcentaje de núcleos positivos para el nucleósido 8OHdG en células de muestras tumorales de pacientes MUTYH y CCR esporádico-SC (WW).

MUTYH	DNA	TUMOR	Dx	MORF.	NÚMERO			PORCENTAJE	
					TOTAL	NEG.	POS.	NEG.	POS.
BI	no	SF01	59	normal	121	49	72	40,5	59,5
BI	no	SF01	59	tumor	176	52	124	29,5	70,5
BI	no	SF01	59	indiferenciado	286	4	282	1,4	98,6
MONO	no	SF02	64	normal	83	64	19	77,1	22,9
MONO	no	SF02	64	tumor	147	15	132	10,2	89,8
MONO	no	SF02	64	indiferenciado	200	14	186	7,0	93,0
BI	3044	SF03	56	normal	135	122	13	90,4	9,6
BI	3044	SF03	56	tumor	184	124	60	67,4	32,6
BI	3044	SF03	56	indiferenciado	225	71	154	31,6	68,4
BI	2630	SF04	36	normal	105	82	23	78,1	21,9
BI	2630	SF04	36	tumor	133	6	127	4,5	95,5
BI	2630	SF04	36	indiferenciado	195	8	187	4,1	95,9
MONO	no	SF05	57	normal	142	86	56	60,6	39,4
MONO	no	SF05	57	tumor	169	34	135	20,1	79,9
MONO	no	SF05	57	indiferenciado	252	20	232	7,9	92,1
MONO	1184	SF06	32	normal	94	65	29	69,1	30,9
MONO	1184	SF06	32	tumor	111	23	88	20,7	79,3
MONO	no	SF07	63	normal	128	36	92	28,1	71,9
MONO	no	SF07	63	indiferenciado	159	4	155	2,5	97,5
BI	2256	SF08	50	normal	111	107	4	96,4	3,6
BI	2256	SF08	50	tumor	206	45	161	21,8	78,2
BI	2256	SF08	50	indiferenciado	228	51	177	22,4	77,6
BI	1299	SF09	55	tumor	128	7	121	5,5	94,5
BI	1299	SF09	55	indiferenciado	151	6	145	3,0	96,0
MONO	no	SF10	54	normal	111	60	51	54,1	45,9
MONO	no	SF10	54	tumor	109	21	88	19,3	80,7
MONO	no	SF10	54	indiferenciado	240	47	193	19,6	80,4
MONO	no	SF11	57	normal	107	36	71	33,6	66,4
MONO	no	SF11	57	indiferenciado	189	5	184	2,6	97,4
BI	2574	SF12	48	normal	130	39	91	30,0	70,0
BI	2574	SF12	48	tumor	134	16	118	11,9	88,1
BI	2574	SF12	48	indiferenciado	221	6	215	2,7	97,3
BI	no	SF13	56	normal	127	96	31	75,6	24,4
BI	no	SF13	56	indiferenciado	325	6	319	1,8	98,2
MONO	no	SF14	44	normal	119	111	8	93,3	6,7
MONO	no	SF14	44	tumor	162	92	70	56,8	43,2
MONO	no	SF14	44	indiferenciado	163	17	146	10,4	89,6
BI	no	SF15	56	tumor	131	23	108	17,6	82,4
BI	no	SF15	56	indiferenciado	173	26	147	15,0	84,0
BI	no	SF16	53	normal	112	53	59	47,3	52,7
BI	no	SF16	53	tumor	101	37	64	36,6	63,4
BI	no	SF16	53	indiferenciado	207	16	191	7,7	92,3
BI	1960	SF17	43	normal	114	76	38	66,7	33,3
BI	1960	SF17	43	tumor	173	38	135	21,0	78,0
BI	1960	SF17	43	indiferenciado	251	31	220	12,4	87,6
BI	2650	SF19	52	normal	65	65	0	100,0	0,0
BI	2650	SF19	52	tumor	136	47	89	34,6	65,4
BI	2734	SF20	47	normal	101	33	68	32,7	67,3
BI	2734	SF20	47	indiferenciado	152	7	145	4,6	95,4
BI	no	SF21	39	normal	142	64	78	45,1	54,9
BI	no	SF21	39	tumor	105	22	83	20,0	79,0

MUTYH	DNA	TUMOR	Dx	MORF.	NÚMERO			PORCENTAJE	
					TOTAL	NEG.	POS.	NEG.	POS.
BI	no	SF21	39	indiferenciado	104	29	75	27,9	72,1
BI	no	SF22	49	normal	123	83	40	67,5	32,5
BI	no	SF22	49	tumor	135	7	128	5,2	94,8
BI	no	SF22	49	indiferenciado	209	18	191	8,6	91,4
WW	no	SF23		indiferenciado	139	22	117	15,8	84,2
WW	no	SF24		tumor	127	10	117	7,9	92,1
WW	no	SF24		indiferenciado	182	11	171	6,0	93,0
WW	no	SF25		tumor	137	23	114	16,8	83,2
WW	no	SF25		indiferenciado	191	11	180	5,8	94,2
WW	no	SF26		tumor	130	20	110	15,4	84,6
WW	no	SF27		normal	128	121	7	94,5	5,5
WW	no	SF27		tumor	123	15	108	12,2	87,8
WW	no	SF27		indiferenciado	145	25	120	17,2	82,8

MUTYH: mutación germinal en MUTYH, MONO: monoalélica, BI: bialélica, WW: silvestre (CCR esporádico), Dx: edad de diagnóstico, MORF.: área morfológica analizada, NEG.: células con núcleos negativos para la detección de 8OHdG, POS.: células con núcleos con detección positiva para 8OHdG.

Anexo 15: Análisis de la expresión de proteínas implicadas en la vía Wnt en tumores HNPCC-X.

FAMILIA	DNA	TUMOR	EDAD Dx	β -catenina	ciclina-D1	c-myc	foxO-3a
7	275	98/3704	42	NEG	NEG	NEG	NEG
17	334	98/16009	49	NEG	NEG	NEG	NEG
19	337	98/001B	80	NEG	NEG	POS	NEG
19	2814	06/2674	50	POS	NEG	POS	NEG
27	436	99/09797	68	NEG	POS	POS	NEG
28	448	98/5114	48	POS	POS	POS	POS
32	457	99/02709	56	NEG	NEG	POS	NEG
40	510	98/957A3	52	NEG	POS	NEG	NEG
43	529	98/25469	77	NEG	NEG	POS	POS
43	528	99/7971	51	POS	nv	nv	POS
81	749	91/05563	50	NEG	NEG	POS	NEG
81	750	98/06049	66	POS	NEG	POS	NEG
81	757	99/36317	61	NEG	NEG	POS	nv
89	772	01/5759	52	NEG	nv	POS	NEG
108	972	98/4365	37	POS	POS	NEG	POS
111	2680	02/1949	61	NEG	NEG	POS	NEG
122	1042	00/4680	52	NEG	NEG	NEG	POS
142	1189	01/0657	67	POS	NEG	POS	NEG
143	1216	98/2243	68	NEG	NEG	NEG	NEG
184	1522	00/17165	52	POS	POS	NEG	NEG
190	1564	04/1033	57	NEG	NEG	POS	NEG
198	1690	03/6060	53	NEG	POS	POS	NEG
262	1753	05/017719	54	NEG	NEG	NEG	NEG
282	1811	70/0579	32	POS	POS	POS	NEG
282	1485	05/4370	77	NEG	nv	NEG	NEG
282	no	05/032142	72	NEG	POS	NEG	NEG
284	1803	03/0077	79	NEG	NEG	POS	NEG
298	no	02/13693	49	POS	NEG	NEG	NEG
298	1860	05/4994	57	POS	POS	POS	NEG
318	2463	04/14940	74	NEG	NEG	NEG	NEG
350	2042	05/209542	47	NEG	POS	NEG	NEG
401	2235	05/3047	52	NEG	NEG	POS	NEG
406	no	02/1611	47	NEG	nv	POS	NEG
421	2346	97/4802	61	NEG	NEG	POS	NEG
440	2310	06/2723	51	POS	POS	POS	NEG
466	2347	89/03294	42	NEG	NEG	POS	NEG
483	2496	07/05212	40	POS	POS	NEG	POS
525	2695	07/2168	51	POS	POS	POS	NEG
TOTAL		38	38	38	34	37	37

NEG: tinción negativa; POS: tinción positiva; nv: no valorable

Anexo 16: Análisis de la expresión de proteínas implicadas en la vía Wnt en tumores HNPCC-MSI.

FAMILIA	DNA	TUMOR	EDAD Dx	β -catenina	ciclina-D1	c-myc	foxO-3a
8	276	00/1002	65	NEG	POS	POS	NEG
21	362	98/1219	45	NEG	nv	POS	NEG
25	378	89/8646	75	NEG	POS	POS	NEG
25	no	94/12343	34	NEG	POS	POS	NEG
29	447	95/2322	24	NEG	nv	POS	NEG
42	500	99/17659	41	NEG	nv	POS	nv
44	687	00/3733	65	NEG	POS	NEG	NEG
48	566	00/MP393	23	POS	POS	POS	POS
51	555	99/9802	35	NEG	POS	NEG	NEG
54	579	94/B540	43	POS	NEG	POS	NEG
54	639	93/01842	70	NEG	NEG	NEG	NEG
54	640	92/184710	70	NEG	POS	NEG	NEG
61	618	99/12B142	62	NEG	POS	POS	NEG
65	625	00/11284	48	NEG	NEG	POS	NEG
71	771	06/15278	50	NEG	POS	POS	NEG
92	821	93/4219	64	nv	nv	nv	nv
92	822	87/5044	27	NEG	POS	POS	NEG
94	854	00/5245	55	NEG	POS	NEG	NEG
104	943	90/1718	65	nv	NEG	POS	nv
104	1163	02/1102	40	NEG	POS	POS	NEG
106	967	01/1744	42	nv	POS	POS	NEG
110	989	02/11314	55	POS	NEG	POS	NEG
110	1201	01/1309	49	nv	nv	nv	nv
114	998	01/20433	50	nv	POS	POS	NEG
114	1017	99/57483	40	NEG	POS	POS	NEG
118	1026	97/9100	47	NEG	NEG	POS	NEG
126	1101	97/16069	36	nv	nv	nv	nv
134	1144	01/6826	45	NEG	NEG	NEG	NEG
141	1162	90/B6	19	POS	POS	POS	NEG
147	1238	03/5481	41	NEG	POS	POS	NEG
150	1246	03/10745	43	NEG	NEG	NEG	NEG
156	1296	03/5101	25	NEG	POS	POS	NEG
164	1599	91/745	43	NEG	NEG	POS	NEG
164	1363	04/1891	36	NEG	POS	NEG	NEG
181	1484	95/4574	39	NEG	NEG	NEG	NEG
183	1504	03/16948	61	NEG	NEG	POS	NEG
188	1323	98/1688	37	NEG	POS	NEG	NEG
191	1563	05/01312	50	POS	POS	POS	NEG
209	1603	97/3144	18	NEG	POS	POS	NEG
221	1685	05/5399	45	NEG	POS	NEG	NEG
312	1653	05/18432	48	NEG	NEG	NEG	NEG
372	2126	99/7581	45	NEG	NEG	POS	NEG
TOTAL		43	43	37	37	40	38

NEG: tinción negativa; POS: tinción positiva; nv: no valorable