



DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO

Trinidad Caldés Llopis

Jefe del Laboratorio de Oncología Molecular
Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

El cáncer colorrectal es la segunda enfermedad maligna diagnosticada más frecuentemente, y constituye la segunda causa más común de muerte por cáncer en el mundo occidental. Según la Sociedad Americana de Oncología Clínica entre el 65-85% de los tumores son de origen esporádico, en el 10-30% existe una agregación familiar. Dentro de los síndromes hereditarios está la Poliposis Familiar Adenomatosa (FAP) que representa aproximadamente el 1% y el Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (HNPCC) que representa entre el 1-5%, según los diferentes estudios hechos en distintas poblaciones ya que parece ser que hay diferentes frecuencias dependientes de la localización geográfica. La causa de esta variación no está clara pero podría explicarse por la diferente expresión fenotípica de las mutaciones en los genes implicados o bien por las interacciones entre el genotipo y los factores medioambientales. Las frecuencias españolas no se conocen por el momento.

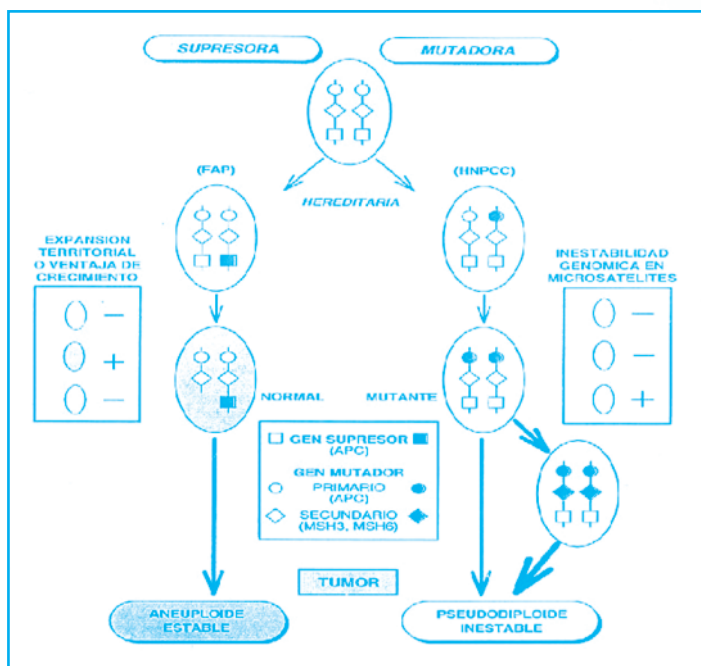
SÍNDROMES GENÉTICOS HEREDITARIOS

Se han identificado alteraciones genéticas para los dos síndromes de carácter hereditario más importantes del cáncer colorrectal, a saber, la poliposis familiar adenomatosa (FAP) y el cáncer colorrectal no polipósico hereditario (HNPCC). Ambos síndromes son considerados como enfermedades genéticas con herencia autosómica dominante. El gen responsable de la FAP es el gen APC y se ha visto que el 80% de las familias con FAP tienen mutaciones en este gen. En el síndrome HNPCC están implicados varios genes, el MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 y PMS2, estos genes están implicados en los mecanismos de reparación del ADN y se conocen como MMR. El 50% de las familias con este síndrome tienen mutaciones en estos genes y las mutaciones están localizadas mayoritariamente en los genes MLH1 y MSH2. Las mutaciones encontradas en el resto de los genes reparadores representan solo el 1% del total de las mutaciones encontradas. Otros genes como MSH3 y MLH3 se ha visto que son genes secundarios en el proceso del HNPCC.

Modelo Molecular de la carcinogénesis colorrectal

El cáncer colorrectal puede inducirse a través de dos vías moleculares, la vía supresora y la vía mutadora (Fig. 1). Cada vía presenta una inestabilidad genómica característica. A la vía supresora, le acompaña una inestabilidad cromosómica que va acompañada de mutaciones en oncogenes, genes supresores y pérdidas de heterozigosidad (LOH) en muchos locus cromosómicos, pertenecen a esta vía el 85% de los tumores esporádicos. La vía mutadora se caracteriza por una inestabilidad a microsatélites, perteneciendo a esta vía la mayoría de los tumores HNPCC y un 15% de los tumores esporádicos. La inestabilidad a microsatélites se vio que era una consecuencia de mutaciones en otros genes necesarios para mantener la fidelidad de replicación del ADN, es decir los genes implicados en el mecanismo de reparación. El por qué un 15% de los tumores colorrectales esporádicos tienen inestabilidad a microsatélites no se conoce hasta el momento. Sin embargo en los tumores HNPCC, las mutaciones en los genes MLH1, MSH2 principalmente son las responsables de la inestabilidad a microsatélites en los tumores de estos pacientes. Tanto una vía como otra son muy similares, ya que las dos siguen la teoría de Knudson y es que para que se manifieste el cáncer deben estar mutados los dos alelos del mismo gen. Por lo tanto el fenotipo mutador de microsatélites tiene una predisposición hereditaria, relacionándose este como la manifestación molecular del síndrome de cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC), y se utiliza hoy en día como criterio diagnóstico y de selección para el estudio de mutaciones en los genes reparadores en el HNPCC. El fenotipo mutador de microsatélites se va manifestando poco a poco

Figura 1



en un proceso en el que se va ejecutando la inactivación sucesiva de genes mutadores. Esto se debe a la existencia de secuencias repetitivas en la zona codificante de otros genes mutadores como MSH6 y MSH3. Por ejemplo una mutación en MLH1 genera un nivel de inestabilidad que conduce a mutaciones secundarias en MSH3 o en MSH6.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CÁNCER DE COLON HEREDITARIO EN LA CLÍNICA

El conocimiento de las bases hereditarias del cáncer colorrectal familiar tiene importantes implicaciones para los pacientes. Aunque algunos de los genes implicados son conocidos, el desarrollo de métodos fiables para detectar mutaciones germinales en estos genes no es fácil, ya que por un lado son genes muy grandes como el APC y por otro las mutaciones están repartidas por todo el genoma, con lo cual hay que estudiar los genes completos.

Lo primero que se debe hacer es un buen diagnóstico clínico y una selección correcta de las familias. Este se debe llevar a cabo en una consulta de consejo genético, en la cual se recopilarán la historia y todos los informes clínicos de los pacientes.

La poliposis familiar adenomatosa se caracteriza por la presencia de miles de pólipos, pero también hay formas más atenuadas en las cuales la cantidad de pólipos es menor. El gen implicado es el APC. La mayoría de las mutaciones en este gen producen un truncamiento de la proteína, con lo cual el estudio de este gen se podría llevar a cabo por la técnica de truncamiento de proteína (PTT), en la cuál la presencia de una proteína de menor tamaño nos indicaría que existe una alteración.

La selección de las familias con síndrome HNPCC se debe llevar a cabo siguiendo los criterios de Amsterdam, Amsterdam modificado y los guías de Bethesda. Estas guías tienen unos criterios mucho más amplios, pero debido a que en el síndrome HNPCC una de las características de los tumores de los pacientes es la presencia de inestabilidad a microsatélites, se puede usar esta prueba como cribaje para seleccionar que pacientes son susceptibles de tener una mutación en los genes reparadores. Por otro lado recientemente se han publicado estudios de la expresión de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, como método de selección para estudiar las alteraciones genéticas. Esto añade una segunda aproximación molecular que nos indica que gen debemos estudiar primero.

A la vista de los resultados publicados la estrategia a seguir sería:

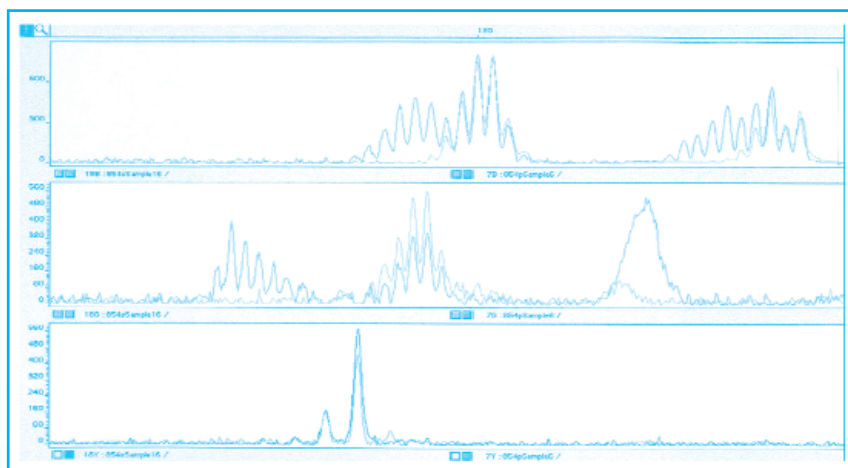
1. Selección de las familias por criterios clínicos.

Esta selección se lleva a cabo en la consulta de Consejo Genético. Previamente se cita al caso índice interesado en el estudio y se lleva a cabo una entrevista donde se hace el árbol familiar y se le informa en que consiste el estudio, implicaciones y consecuencias. Una vez que el paciente decide seguir adelante, firma un consentimiento informado y se procede a la extracción de un tubo con 10 ml de sangre recogida con EDTA, y se manda al laboratorio para el estudio de los genes implicados.

2. Estudio de la inestabilidad a microsatélites

Se estudian los 5 microsatélites consenso de Bethesda (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 y D17S250) y se consideran tumores altamente inestables aquellos que presentan inestabilidad al menos en dos locus, en caso de no poderse llevar a cabo el estudio de los 5 microsatélites por no disponer de ADN normal del paciente y sólo tener tumor, se podría hacer BAT26 sólo en el tumor, ya que es un microsatélites cuasi monomórfico, y hay varios trabajos que validan su estudio único y que consideran que el ser inestable a este microsatélite se puede considerar la muestra como de alta inestabilidad (Fig. 2).

Figura 2:
Diagnóstico molecular
del (HNPCC).
Microsatélites
consenso de Bethesda



3. Estudio de la expresión de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 por inmunohistoquímica

Los resultados obtenidos en este estudio nos indicarían que gen deberíamos estudiar primero, y en el caso de encontrar una alteración en el gen indicado supondría la no necesidad de estudiar los otros genes reparadores (Fig. 3).

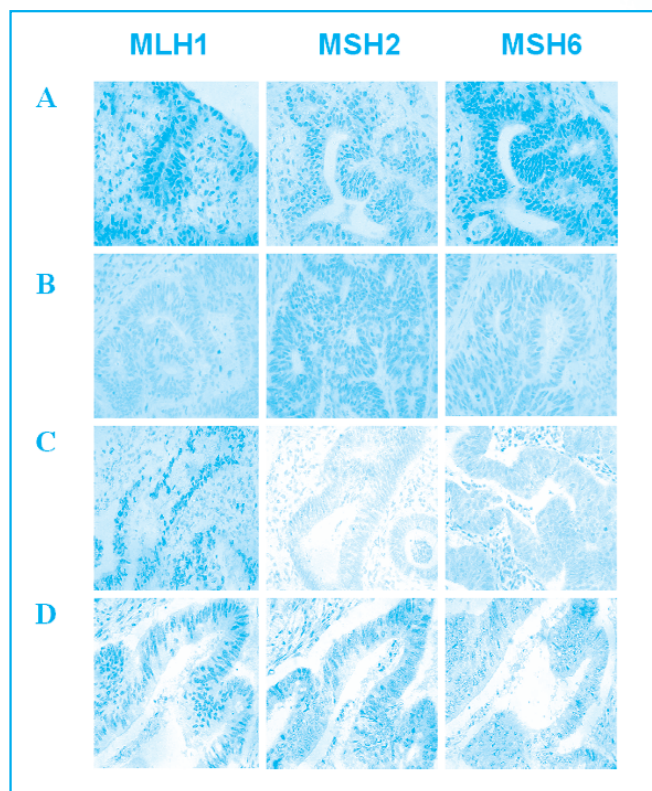
4. Estudio de las mutaciones o variantes en los genes reparadores

Este estudio se debe llevar a cabo en todas las familias seleccionadas por los criterios de Amsterdam, Amsterdam modificado o por las guías de Bethesda que presenten alta inestabilidad a microsatélites en los tumores, y se empezará a estudiar el gen en el cuál la proteína no se exprese en el tumor.

Estudio de familias HNPCC llevado a cabo en el Laboratorio de Oncología Molecular del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico San Carlos.

Se han estudiado las mutaciones en MLH1, MSH2 y MSH6 en 71 probandos procedentes de 71 familias seleccionadas por la consulta de Consejo Genético de nuestro hospital. Las familias fueron clasificadas por los criterios clínicos resultando 31 familias con criterios de Amsterdam, 7 familias Amsterdam modificado, 20 familias Bethesda y 17 familias que no cumplían ninguno de los criterios anteriores pero en las que había una agregación de cáncer colorrectal y que se denominaron como asociación familiar de cáncer colorrectal. El

Figura 3



estudio de mutaciones en los genes reparadores dio un 53% en familias de Amsterdam I y II un 27% en familias con criterios de Bethesda. La **Figura 4** muestra un ejemplo del estudio genético en una familia.

El estudio de inestabilidad a microsatélites llevado a cabo en todos los pacientes en los que se pudo obtener pieza tumoral, dio como resultado que el 80% de las familias de Amsterdam, el 60% de Amsterdam modificado y el 50% de las seleccionadas por criterios de Bethesda, tienen tumores con alta inestabilidad. Sin embargo todos los tumores del grupo de asociación familiar no presentaron inestabilidad a microsatélites.

Figura 4: Síndrome de Muir Torre familia 13. Mutación del AT en posición 2239 gen hMSH2.
(Caldes T et al AJG; 95:2389-90, 2000).

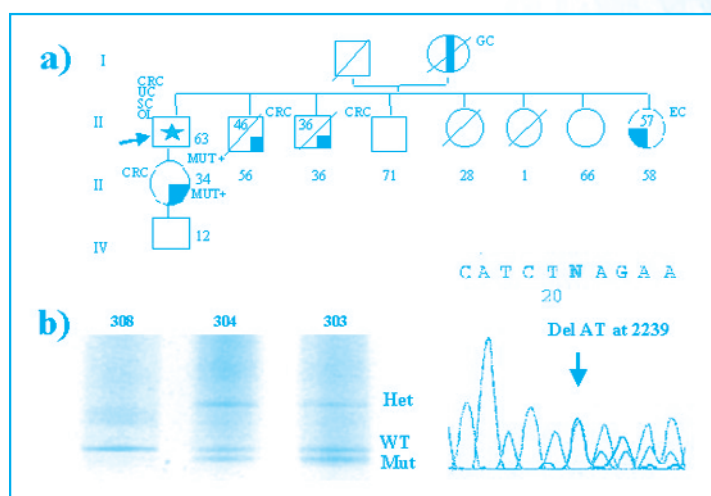


Figura 5

Figura 5 BENEFICIOS Y LIMITACIONES DE LAS PRUEBAS GENÉTICAS PARA EL HNPCC ASCO	
Beneficios	Limitaciones
Identifica a los portadores de mutaciones	Las pruebas actuales no identifican a todos los portadores de mutaciones (sensibilidad clínica limitada)
Identifica a los no portadores en familias con mutaciones conocidas	Los no portadores continúan teniendo un riesgo de CRC esporádico
Se ha demostrado que la vigilancia colónica en individuos con riesgo reduce la mortalidad	No se conoce la eficacia de la vigilancia de otros cánceres (p. ej., de ovario)

Recientemente se ha llevado a cabo un estudio de la expresión de las proteínas MLH1, MSH2 y MSH6 por inmunohistoquímica (Fig. 3). Este estudio se ha llevado a cabo en 44 pacientes de los que se pudo conseguir bloque de parafina de los tumores. Estos pacientes habían sido estudiados previamente para la inestabilidad a microsatélites y para las mutaciones en los genes reparadores MLH1, MSH2, y MSH6. La idea del trabajo fue comparar la eficacia de los dos estudios la inmunohistoquímica y la inestabilidad para seleccionar pacientes de alto riesgo de ser portadores de una mutación, la (tabla 1) nos muestra la sensibilidad y la especificidad de ambas técnicas para predecir una mutación. La concordancia entre ambas fue del 75%, pero como podemos ver, el estudio de inestabilidad es más sensible pero menos específico que el estudio de expresión de las proteínas. Desde un punto de vista clínico se optaría por hacer primero el estudio de inestabilidad y en segundo lugar en todos los pacientes con alta inestabilidad hacer el estudio de expresión de las proteínas, con el fin de dirigir el estudio genético hacia un determinado gen.

5. Cita en la consulta de Consejo genético para comunicar y entregar un informe con el resultado.

Si el resultado es positivo se debe extender el análisis a otros miembros de la familia. En el caso de que sea negativo, persiste el riesgo de una mutación familiar no identificada. También se debe proponer en la consulta de Consejo Genético el seguimiento y la profilaxis. Las ventajas e inconvenientes del test genético están mostradas en la Fig. 5.

BIBLIOGRAFÍA

1. Loeb LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. Cancer Res 1994; 54:5059.
2. Perucho M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. Nature Medicine 1996;2:630
3. Vasen H.F.A, Mecklin J.P, Meera-Khan P. M, Lynch H. A. T. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). Dis Colon Rectum 1991; 34:424-425.
4. Vasen H.F, Watson P, Mecklin J.P, Lynch H.T. New clinical criteria for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. Gastroenterology 1999; 116:1453-1456.
5. Rodríguez-Bigas M.A, Boland C.R, Hamilton S.R, Henson D.E, Jass J.R, Khan P.M, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivasta S. National Cancer Institute workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Syndrome: Meeting highlights and Bethesda guidelines. J Nat Cancer Inst 1997; 89:1758-1762.
6. Terdiman J.P, Gum J.R, Conrad P.G, Miller G.A, Weinberg V, Suzanne C.C, Levin T.R, Reeves C, Schmitt A, Hepburn M, Sleisenger M.H, Kim Y.S. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumour microsatellite instability before germline genetic testing. Gastroenterology 2001;120:21-30.

7. Stone J. G, Robertson D, Houlston R. S, Immunohistochemistry for MSH2 and MLH1: a method for identifying mismatch repair deficient colorectal cancer. *J. Clin. Patol* 2001;54:484-487.
8. Lindor M. N, Burgart L. J, Leontovich O, Goldberg R. M, Cunningham J. M, Sargent D. J, Walsh-Vockley C, Petersen G. M, Walsh M. D, Leggett B. A, Young J. P, Barker M. A, Jass J. R, Hopper J, Gallinger s, Bapat B, Redston M, Thibodeau S. N. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J. Clin. Oncol* 2002;20:1043-1048.
9. Wahlberg S.S, Schmeits J, Thomas G, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner R.D, Fox E. Evaluation of microsatellite instability and immunochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* 2002; 62:3485-3492.
10. Caldes T, Godino J, de la Hoya M, Garcia-Carbonero I, Perez-Segura P, Eng C, Benito M, Diaz-Rubio E. Prevalence of germline mutations of MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from Spain. *Int. J. Cancer* 2002;98:774-779.