



**CARACTERITZACIÓ I IDENTIFICACIÓ DE LES FORMES HEREDITÀRIES
DE CÀNCER COLORECTAL**

**Tesi presentada per Francesc Balaguer Prunés per optar al grau de
Doctor en Medicina**

Directors:

Antoni Castells i Garangou

Sergi Castellví Bel

Barcelona, 2008

AUTORITZACIÓ DEL DIRECTOR DE TESI

EL DR. ANTONI CASTELLS I GARANGOU, CAP DE SERVEI DE GASTROENTEROLOGIA DE L'HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA,

CERTIFICA:

Que la memòria que du per títol "CARACTERITZACIÓ I IDENTIFICACIÓ DE LES FORMES HEREDITÀRIES DE CÀNCER COLORECTAL", presentada per Francesc Balaguer Prunés per optar al grau de Doctor en Medicina, ha sigut realitzada sota la meva direcció. Un cop finalitzada autoritzo la seva presentació per a ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per a que quedi constància als efectes oportuns, firmo la present a Barcelona, a febrer de 2008.

Dr. Antoni Castells i Garangou

AUTORITZACIÓ DEL DIRECTOR DE TESI

EL DR. SERGI CASTELLVÍ BEL, INVESTIGADOR SENIOR DE L'INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES AUGUST PÍ I SUNYER (IDIBAPS) DE BARCELONA,

CERTIFICA:

Que la memòria que du per títol “CARACTERITZACIÓ I IDENTIFICACIÓ DE LES FORMES HEREDITÀRIES DE CÀNCER COLORECTAL”, presentada per Francesc Balaguer Prunés per optar al grau de Doctor en Medicina, ha sigut realitzada sota la meua direcció. Un cop finalitzada autoritzo la seva presentació per a ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per a que quedi constància als efectes oportuns, firmo la present a Barcelona, a febrer de 2008.

Dr. Sergi Castellví Bel

Dedicada al meu avi

ÍNDIX

Agraïments.....	13
Presentació.....	19
Ajuts al grup d'investigació.....	21
Abreviatures.....	25
Antecedents del tema.....	27
1. Epidemiologia del càncer colorectal.....	29
2. Formes de càncer colorectal hereditari.....	33
2.1. Síndrome de Lynch.....	34
2.1.1. Característiques clíniques.....	35
2.1.2. Característiques moleculars.....	35
2.1.3. Identificació de la síndrome de Lynch.....	40
2.1.4. Estratègies de cribratge.....	47
2.1.5. Tractament.....	50
2.1.6. Vigilància post-resecció.....	50
2.2. Càncer colorectal associat a <i>MYH</i>	52
2.2.1. <i>MYH</i> i el sistema per escisió de bases.....	52
2.2.2. <i>MYH</i> i càncer colorectal.....	55
3. El projecte EPICOLON.....	59
Justificació i objectius de la tesi.....	61
Justificació general.....	63
Justificació i objectius de l'estudi 1.....	67
Justificació i objectius de l'estudi 2.....	69

Publicacions derivades de la tesi doctoral.....	71
Comunicacions a congressos.....	73
Articles.....	77
<i>Article 1. Validation and extension of the PREMM_{1,2} model in a population-based cohort of colorectal cancer patients.</i>	
<i>Article 2. Clinical criteria for the identification of MYH mutation carriers in patients with newly diagnosed colorectal cancer: a prospective, multicenter, case-control, population-based study.</i>	
Discussió.....	83
Conclusions.....	93
Bibliografia.....	99

AGRAÏMENTS

A en Toni Castells, per la seva confiança, suport, optimisme i amistat. És un plaer formar part d'un grup liderat per tu.

A en Sergi Castellví, per la seva paciència, constància i insistència que tant m'han ajudat durant aquest temps.

A tots els membres del grup *EPICOLON* sense els quals aquesta tesi no existiria.

Als meus companys de despatx i amics, Teresa Ocaña, Victòria Gonzalo i María Dolores Giráldez, amb els que es fa més fàcil i agradable treballar.

A la resta de companys del Servei de Gastroenterologia, Faust Feu, Julià Panés, Salvador Navarro i Ignasi Elizalde.

A les infermeres, auxiliars i secretàries del Servei de Gastroenterologia, en especial a la Diana i la Mercè, per la seva constant ajuda.

A tots els companys d'endoscòpia, en especial a la Maria Pellisé i al Josep Llach, per ser les persones a través de les que vaig entrar al Servei de Gastroenterologia.

A totes les infermeres d'endoscòpia, tant del torn de matí com de la tarda, per l'ajuda i l'esforç en la recollida de mostres.

A en Francisco Rodríguez, per mostrar-me el camí.

Als meus companys de residència, Alex Forner i Montse Aceituno amb els que vaig compartir quatre anys molt intensos.

A la Jenifer Muñoz, per aguantar-me i ajudar-me tant i tant al laboratori.

A la Judith Balmaña i la Sapna Syngal, amb les que hem format un gran equip i espero es perllongui durant molt de temps.

A Josep Oriola, Cèlia Bàdenas, Joan Anton Puig, Roberto Mazzara i Yvonne Arce per ajudar-me en el reclutament del controls.

A en Javier Pérez Gisbert, sense el que no hauria pogut finalitzar el projecte del gen *MYH*.

A la resta de personal de l'Institut de Malalties Digestives, amb els que hem compartit tants moments durant els últims anys.

Al tot el grup de laboratori de malaltia inflamatòria intestinal, per ser un grup tan agradable.

A tots els companys de la Clínica d'Alt Risc de Càncer Colorectal, amb els que hem creat un gran equip i fem una feina tan interessant.

Al meu padrí, pels bons consells, reflexions i insistència interminable en fer les coses ben fetes.

A tota la meva família, en especial als meus pares, per sempre confiar en mí.

A la Laia i el Marc, que són la meva vida.

PRESENTACIÓ

La present Tesi Doctoral està estructurada seguint les directrius de la normativa per a la presentació de tesi doctorals com a compendi de publicacions, aprovada per el Consell del Departament de Medicina de la Universitat de Barcelona el 17 de maig de 1997, i els acords de la Comissió de Doctorat de la Facultat de Medicina del 19 d'abril de 2006.

Els estudis que formen aquesta Tesi Doctoral pertanyen a una mateixa línia d'investigació, dirigida a aprofundir en la caracterització i identificació de les formes hereditàries de càncer colorectal. Els resultats dels estudis han aportat informació rellevant i novedosa en aquest camp, i han sigut recollits en dos articles originals, publicats en revistes d'àmplia difusió internacional amb un factor d'impacte global de 12,45 punts.

AJUTS AL GRUP D'INVESTIGACIÓ

Els treballs que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han sigut efectuats amb el suport dels següents ajuts i beques personals i al grup d'investigació:

- **Premi fi de residència "Emili Letang"** de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona el Juliol de 2005 pel projecte d'investigació: "Implicació del gen *MYH* en les formes hereditàries, familiars i esporádiques del càncer colorectal".
- **Beca de formació de personal investigador** de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) per alumnes de tercer cicle de la Universitat de Barcelona obtinguda el Desembre de 2005.
- **Contracte post-formació sanitària especialitzada (post-MIR)** del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) de l'Instituto Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo) obtingut el Març de 2006 amb el número CM05/00011 amb una duració de 3 anys.
- **Beca** del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) de l'Instituto Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo) obtingut el Juny de 2001 amb el número FIS 01/0104-02 amb una duració de 3 anys per al projecte "*Utilidad del estudio del fenómeno de inestabilidad de microsatélites en el cribado del cáncer colorrectal hereditario*" (IP: Antoni Castells).
- **Beca** de Merck Sharp & Dhome obtinguda el Març de 2001 amb una duració de 4 anys per al projecte "*Cox-2 expression in colorectal cancer exhibiting altered DNA mismatch repair mechanism*" (IP: Antoni Castells).

- **Beca** del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) de l'Institut Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo) obtinguda el Desembre de 2004 amb el número FIS 05/0071 amb una duració de 3 anys per al projecte *“Polimorfismos en genes candidatos involucrados en cáncer colorrectal familiar: caracterización de componentes genéticos comunes y de baja penetrancia de susceptibilidad para el desarrollo y predicción de la respuesta al tratamiento del cancer colorrectal”* (IP: Sergi Castellví)

ABREVIATURES

CCR: càncer colorectal

CCHNP: càncer colorectal hereditari no poliposi

PAF: poliposi adenomatosa familiar

APC: *adenomatous polyposis coli*

DCC: *deleted in colorectal cancer*

ADN: àcid desoxiribonucleic

TGF-beta: factor de creixement tumoral beta

COX-2: ciclooxigenasa 2

IHQ: immunohistoquímica

IMS: inestabilitat de microsatèl·lits

ANTECEDENTS DEL TEMA

1. Epidemiologia del càncer colorectal

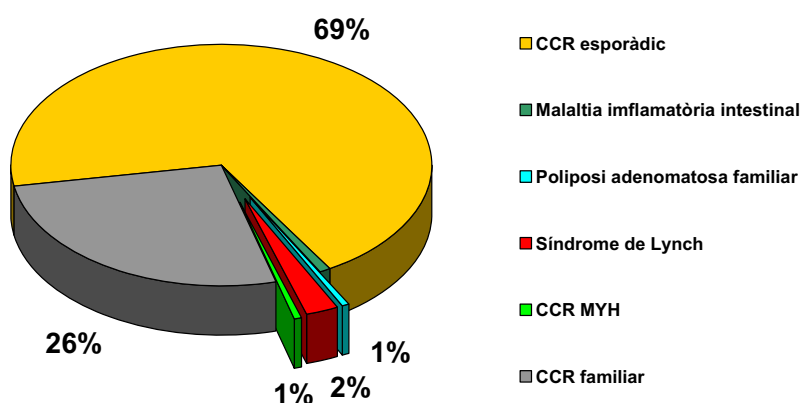
El càncer colorectal (CCR) és una de les neoplàsies més freqüents als països occidentals. Al nostre país, el CCR és la segona neoplàsia més freqüent en homes i dones darrera del càncer de pulmó i de mama, respectivament. Si es consideren ambdós sexes conjuntament ocupa el primer lloc en incidència, estimant-se en torn a 25.000 nous casos per any, i representa la segona causa de mort per càncer¹. La supervivència ha millorat en els últims anys, sent la supervivència mitjana als 5 anys comparable a la dels països europeus (49,5% per càncer de còlon i 43% per a càncer de recte)². Malgrat aquests avanços, a Espanya el CCR causa aproximadament l'11% de les defuncions per càncer en homes i el 15% en dones³. Les taxes brutes de mortalitat per càncer de còlon i recte l'any 2000 varen ser 24,50 (4.726 defuncions) i 8,93 (1.722 defuncions) per 100.000, respectivament, en homes, i 19,97 (4.029 defuncions) i 5,72 (1.155 defuncions) per 100.000, respectivament, en dones³.

Els factors dietètics, hereditaris i l'estil de vida són factors etiològics reconeguts en el desenvolupament de CCR. En quant a la dieta, les primeres evidències del seu efecte sobre el desenvolupament del CCR deriven de la observació d'importants diferències en la incidència d'aquesta neoplàsia entre diverses àrees geogràfiques (augment en relació amb la dieta occidental). Malgrat la constatació d'aquest fet des de fa dècades, encara no ha sigut possible determinar de manera inequívoca quins aliments o nutrients en són els principals responsables. Tanmateix, diversos estudis mostren una associació inversa entre el consum de fibra, vegetals i fruita, i el risc de CCR⁴⁻⁷, mentre que es detecta una relació directa amb el consum de carn vermella⁸

i greixos⁹. En quant a l'estil de vida s'estima que l'exercici físic regular redueix el risc de CCR en un 40%¹⁰, presentant el consum de tabac¹¹ i d'alcohol⁹ una relació directa amb el risc de desenvolupar CCR.

El paper dels factors hereditaris en el desenvolupament del CCR està força ben establert, de manera que sabem que aquests juguen un paper primordial en una part significativa dels CCR. Actualment diferenciem tres grans grups en funció dels antecedents familiars: el CCR esporàdic, definit per la absència d'antecedents familiars de CCR; el CCR familiar, definit com la presència d'antecedents familiars de CCR sense que es compleixin els criteris diagnòstics o moleculars de les formes hereditàries; i el CCR hereditari, en el que coneixem la causa genètica (**Figura 1**).

Figura 1. Classificació del CCR.



Així, en aproximadament el 3-5% dels casos, el CCR apareix en el context d'una malaltia hereditària¹²(**Taula 1**). Des d'un punt de vista clínic i pràctic, aquest grup es divideix en càncer hereditari polipòsic (ex: PAF,

síndrome de Peutz-Jeghers, poliposi juvenil) i no polipòsic (principalment la síndrome de Lynch, i recentment algunes formes de CCR associat al gen *MYH*). En un percentatge menor de casos (inferior a l'1%), el CCR complica una malaltia inflamatòria intestinal de llarga evolució. Per últim, en una proporció encara no ben definida (10-30% de tots els casos de CCR), existeixen diversos graus d'agregació familiar d'aquesta neoplàsia, sense arribar a complir els criteris establerts per a les formes hereditàries esmentades prèviament^{13, 14}, anomenant-se globalment CCR familiar. És ben conegut que l'edat de diagnòstic del CCR i el nombre de familiars afectes són les variables que s'han vist associades a un major risc de presentar un CCR en els diferents estudis¹⁵⁻¹⁹.

Taula 1. Principals síndromes hereditàries associades al càncer colorectal (CCR).

Síndrome	Gen causant	Risc de CCR
Poliposi adenomatosa familiar clàssica	<i>APC</i>	100% ²⁰
Poliposi adenomatosa familiar atenuada	<i>APC</i>	80% ²⁰
Poliposi i CCR associats al gen <i>MYH</i>	<i>MYH</i>	~100% ²¹
Síndrome de Lynch	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>	~80% ²²
Síndrome de Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>	~40% ²³
Poliposi juvenil	<i>SMAD4</i> <i>BMPR1A</i>	10-40% ²⁴

Malgrat que les síndromes hereditàries, especialment la PAF i la síndrome de Lynch, representen una proporció reduïda del total de neoplàsies colorectals, tenen una gran importància des d'un punt de vista fisiopatològic, clínic i terapèutic¹². En primer lloc, els coneixements adquirits en relació als factors que participen en el desenvolupament d'aquestes malalties hereditàries han permès conèixer els mecanismes implicats en el

CCR esporàdic, ja que alguns dels gens que es troben mutats a nivell germinal a la PAF i la síndrome de Lynch també tenen un paper clau en aquesta darrera situació²⁵. En segon lloc, la identificació dels gens responsables ha permès establir el diagnòstic presimptomàtic dels individus portadors de mutacions en aquests gens i, per tant, en risc de desenvolupar la malaltia, amb la conseqüent repercussió en les estratègies de cribratge²⁶. Per últim, el diagnòstic molecular de les formes hereditàries possibilita l'adopció de mesures terapèutiques més radicals, diferents de les emprades a les formes esporàdiques, la qual cosa hauria de tenir un impacte favorable en el pronòstic d'aquests malalts.

Independentment de la naturalesa hereditària o esporàdica, el desenvolupament del CCR contempla en la majoria dels casos la seqüència adenoma-carcinoma²⁵. Així, múltiples estudis epidemiològics i d'intervenció han permès caracteritzar la història natural d'aquesta neoplàsia, la qual s'origina a la majoria de casos a partir d'una lesió premaligna, l'adenoma o pòlip adenomatós²⁷. Des d'un punt de vista fisiopatològic, a la actualitat està ben establert que existeixen dues vies patogèniques ben diferenciades²⁸. La primera d'elles, coneguda com a via supressora o de inestabilitat cromosòmica, implicada en el desenvolupament de la majoria de tumors esporàdics, comporta l'activació de determinants oncogenes (*KRAS*) i la inhibició de gens supressors (*DCC*, *APC*, *SMAD4*, *TP53*)²⁵. L'acúmul d'aquestes alteracions moleculars, independentment de l'ordre en que s'han adquirit, és el responsable de la transformació neoplàstica. A banda d'aquesta via, existeix un segon mecanisme que consisteix en l'acúmul d'errors durant la replicació de l'ADN com a conseqüència de la presència de

mutacions en gens responsables de la seva reparació (*MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6*)¹². Aquests errors s'acumulen de manera predominant en fragments repetitius d'ADN (microsatèl·lits) repartits al llarg de tot el genoma, el que comporta l'aparició de mutacions en diversos gens diana. Aquesta via mutadora o d'instabilitat de microsatèl·lits està implicada en la síndrome de Lynch i en el 15-20% dels CCR¹². En relació amb aquesta última situació, recentment, s'ha descrit una tercera via de carcinogènesi en el CCR anomenada CIMP (*CpG island methylator phenotype*)^{29, 30}, caracteritzada per la hipermetilació del promotor de determinats gens (principalment gens supressors de tumors), amb la conseqüent silenciament transcripcional. Aquest fenotip metilador s'ha associat a una epidemiologia (més freqüent en dones), una histologia (la anomenada via aserrada) i unes característiques moleculars (més freqüència de mutacions somàtiques al gen *BRAF*) diferents. No obstant, encara existeix controvèrsia principalment en quant a la seva definició, donat que no existeix consens en quant al panell de marcadors moleculars a utilitzar.

2. Formes hereditàries de càncer colorectal no associat a poliposi.

Les formes hereditàries de CCR es divideixen en síndromes polipòsiques, entre les que es troben la PAF, la síndrome de Peutz-Jeghers, la poliposi juvenil, la poliposi hiperplàstica i les poliposis associades al gen *PTEN*, i síndromes no polipòsiques. Mentre que en les primeres el CCR sempre esdevé en el contexte d'una poliposi múltiple, ja sigui adenomatosa, hamartomatosa o hiperplàstica, en les síndromes no polipòsiques el CCR es desenvolupa en absència d'un contexte clínic de poliposi. Clàssicament, el

càncer colorectal hereditari no polipòsic ha sigut sinònim de síndrome de Lynch. No obstant, el millor coneixement d'aquesta síndrome, ha permès establir que no només existeix un risc augmentat de desenvolupar CCR, sinó també altres neoplàsies. Aquest fet, juntament amb el descobriment d'altres formes de càncer hereditari no polipòsic (com són algunes formes de CCR associat al gen *MYH*), han fet que es tendeixi a parlar més de síndrome de Lynch³¹.

Actualment estan establertes dues formes de càncer hereditari no associat a poliposi: la síndrome de Lynch i alguns casos de CCR associat al gen *MYH*.

2.1.Síndrome de Lynch o càncer colorectal hereditari no polipòsic (CCHNP)

El CCHNP o síndrome de Lynch és una malaltia hereditària amb patró autosòmic dominant deguda a mutacions germinals en els gens reparadors de l'ADN. Malgrat tractar-se de la forma de CCR hereditari més freqüent, en la actualitat s'accepta que aquesta entitat representa entre l'1% i el 5% del total de casos de CCR^{22, 32, 33}. S'ha de tenir present que existeixen importants variacions en relació a l'estimació de la seva incidència fruit del limitat nombre d'estudis poblacionals i, probablement, de diversitats geogràfiques. No obstant, el factor més determinant per a les discordances en quant a la seva freqüència de presentació és la dificultat per a establir-ne la seva definició i, conseqüentment, el seu diagnòstic.

2.1.1. Característiques clíniques

La síndrome de Lynch es caracteritza pel desenvolupament precoç de CCR, habitualment abans dels 50 anys d'edat, localitzar-se preferentment al còlon dret, i tenir una elevada tendència a presentar neoplàsies sincròniques o metacròniques, bé en el propi còlon, o en altres òrgans (endometri, estómac, sistema urinari, ovari, vies biliars, budell prim^{22, 34, 35}). Menys freqüentment, poden presentar-se tumors cerebrals (glioblastomes) o cutanis (queratoacantomes, adenomes sebàcics o adenocarcinomes sebàcics), combinacions que reben el nom de síndrome de Turcot i síndrome de Muir-Torre, respectivament, i constitueixen variants de la síndrome de Lynch³⁶.

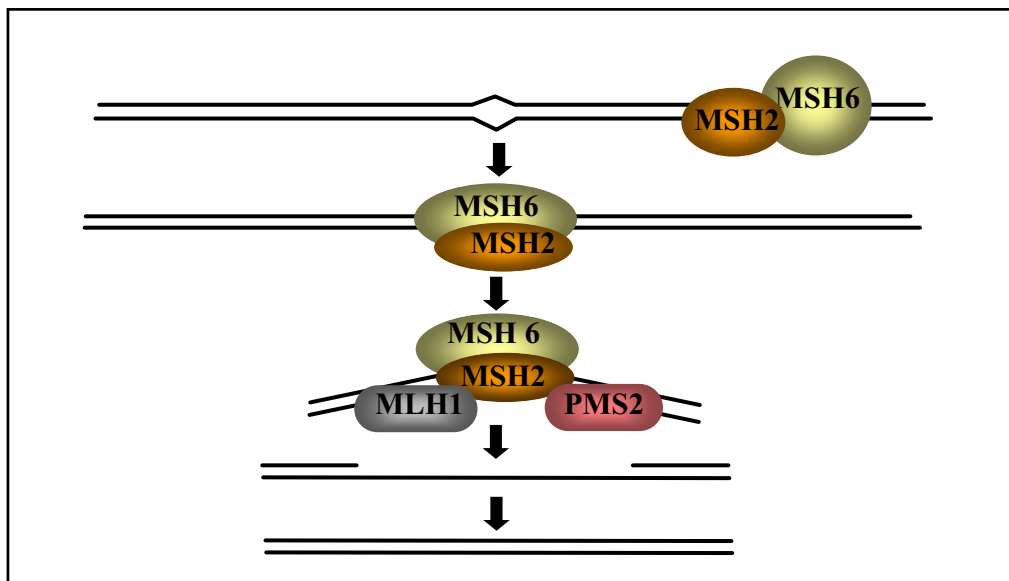
Histològicament, el CCR presenta unes característiques relativament constants i específiques com són la infiltració limfocitària, la presència de cèl·lules en anell de segell, una pobre diferenciació cel·lular o creixement medul·lar^{12, 37-39}.

2.1.2. Característiques moleculars

La causa de la síndrome de Lynch és la presència de mutacions germinals en els gens reparadors dels errors de replicació de l'ADN⁴⁰. Fins al moment actual es coneixen 5 gens que formen part d'aquesta maquinària reparadora: *MSH2* localitzat a la regió cromosòmica 2p16, *MLH1* localitzat a la regió cromosòmica 3p21, *PMS1* i *PMS2* localitzats a les regions cromosòmiques 2q31 i 7q11, respectivament, i *MSH6* localitzat a la regió cromosòmica 2p16. Es coneixen unes 300 mutacions germinals en aquests gens, de les quals un 59% és troben en el gen *MLH1* i un 38% en el gen *MSH2*, éssent rares les mutacions a la resta de gens^{34, 35, 41, 42}.

En condicions normals, la reparació d'aquests errors de replicació de l'ADN (errors d'aparellament i petites insercions o delecions d'una o dues bases) s'inicia per la unió d'heterodímers MSH2-MSH6 al fragment danyat (**Figura 2**)⁴⁰. Aquesta primera fase va seguida per un canvi conformacional d'aquestes molècules, el que facilita la unió del complex MLH1-PMS2. Posteriorment, és produeix l'escissió de la cadena d'ADN afecta i la síntesi d'una de nova. Quan s'han de reparar insercions/delecions més llargues, probablement intervé el complex MSH2-MSH3⁴³.

Figura 2. Mecanisme de reparació dels errors de replicació de l'ADN.

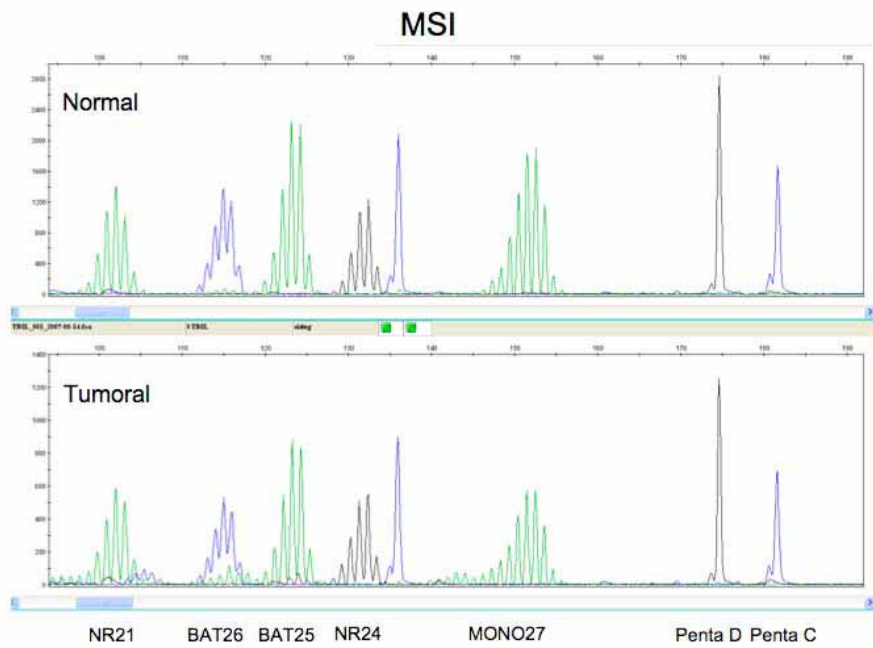


Les mutacions germinals als gens reparadors de l'ADN tenen dues conseqüències somàtiques detectables al si del tumor d'aquests pacients: la presència d'instabilitat de microsatèl·lits i la pèrdua d'expressió de la proteïna corresponent al gen mutat.

a) Inestabilitat de microsatèl·lits

Des del punt de vista molecular, el malfuncionament del sistema de reparació d'errors de replicació de l'ADN es tradueix en l'acúmulo de mutacions somàtiques a dos nivells. Per una banda, a nivell de microsatèl·lits, que són petits fragments repetitius d'ADN distribuïts al llarg de tot el genoma^{43, 44} i majoritàriament localitzats en ADN intrònic i que, per tant, la seva afectació presumiblement no té un significat patològic. El fenomen d'inestabilitat de microsatèl·lits (**Figura 3**) constitueix un marcador fenotípic de la síndrome de Lynch²⁶, estant present en més del 95% dels CCR en aquests pacients. No obstant això, no es tracta d'un biomarcador específic ja que fins un 15% dels CCR esporàdics poden presentar inestabilitat de microsatèl·lits degut a hipermetilació somàtica del promotor del gen *MLH1*, amb la consegüent silenciació gènica⁴⁵.

Figura 3. Anàlisi del fenomen d'inestabilitat de microsatèl·lits mitjançant l'estudi de 5 mononucleòtids. El cas que es presenta correspon a un tumor inestable.



Per altra banda, la segona conseqüència del malfuncionament del sistema de reparació d'errors de replicació de l'ADN és l'afectació d'unitats repetitives de l'ADN incloses dins els marcs de lectura de diferents gens (*TGF- β* , *IGFR1I*, *BAX*), alguns dels quals juguen papers fonamentals a la regulació del creixement, diferenciació o mort cel·lular^{38, 43} i, per tant, a l'oncogènesi.

b) Pèrdua d'expressió proteica

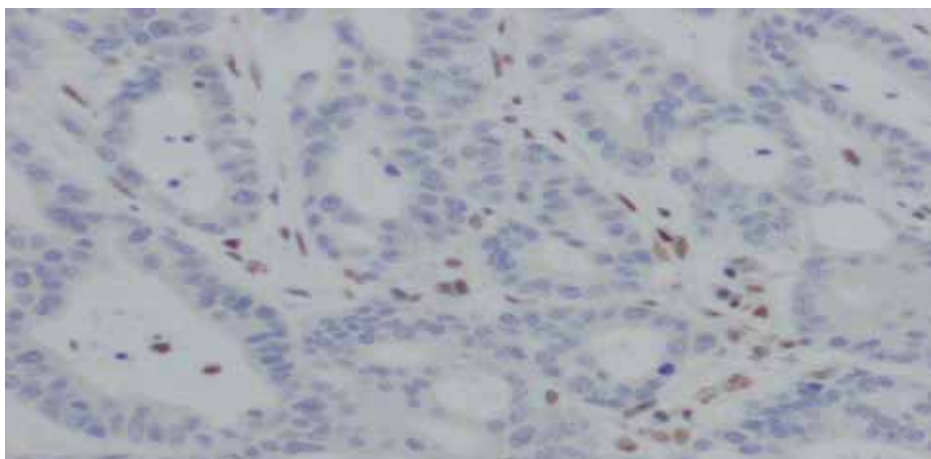
A banda de la inestabilitat de microsatèl·lits, els pacients amb síndrome de Lynch presenten característicament pèrdua d'expressió de la proteïna corresponent al gen mutat a nivell del tumor⁴⁶. Aquesta alteració pot ser detectada mitjançant immunohistoquímica, amb un patró característic en funció del gen mutat (**Taula 2**).

Taula 2. Possibles patrons immunohistoquímics

Gen mutat	Resultat immunohistoquímica			
	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2
<i>MLH1</i>	-	+	+	-
<i>MSH2</i>	+	-	-	+
<i>MSH6</i>	+	+	-	+
<i>PMS2</i>	+	+	+	-

La pèrdua d'expressió d'aquestes proteïnes a les cèl·lules tumorals és suggestiu de mutació germinal al gen corresponent (**Figura 4**). D'una forma similar a la inestabilitat de microsatèl·lits, la immunohistoquímica per les proteïnes del sistema de reparació de l'ADN ha demostrat ser una estratègia efectiva per a la detecció d'individus portadors de mutacions als gens reparadors de l'ADN^{46, 47}, amb l'avantatge de proporcionar informació sobre el gen potencialment mutat, i a més ser una tècnica més senzilla que la determinació d'inestabilitat de microsatèl·lits i, per tant, factible a la majoria de centres. La pèrdua d'expressió de MLH1 és un repte diagnòstic donat que, a banda de mutacions germinals, la metilació del promotor de *MLH1* i la seva conseqüent silenciament també n'és una causa, no existint alteració germinal en aquests casos. La detecció de mutacions somàtiques al gen *BRAF* pot ser d'ajuda per diferenciar les dues situacions⁴⁸⁻⁵⁰.

Figura 4. Estudi immunohistoquímic d'expressió de MLH1. El cas que es presenta s'observa pèrdua d'expressió de MLH1 en el tumor, amb expressió conservada en els limfòcits.



2.1.3. Identificació de la síndrome de Lynch

La identificació d'una mutació germinal dels gens reparadors de l'ADN permet confirmar el diagnòstic de síndrome de Lynch, i per tant, el diagnòstic presimptomàtic en els familiars en risc per així poder aplicar mesures preventives. De fet, es coneix que la colonoscòpia de vigilància en aquest pacients realitzada en intervals menors de 3 anys millora la supervivència⁵¹. Tanmateix, la heterogeneïtat d'aquesta síndrome fa que el diagnòstic a la pràctica clínica sigui un repte constant, donat que pot ser indistingible del CCR esporàdic. En paral·lel amb la dificultat en la identificació, els criteris diagnòstics han evolucionat amb la millor comprensió i caracterització d'aquesta malaltia. Així, la identificació de la síndrome de Lynch es pot fer mitjançant un cribratge molecular en el si del tumor amb l'anàlisi de la inestabilitat de microsatèl·lits i/o l'estudi de l'expressió de les proteïnes

corresponents per immunohistoquímica, en combinació o no amb criteris clínics (**Taula 3**).

Taula 3. Criteris clínics de la síndrome de Lynch

Criteris d'Amsterdam II⁵²

1. Mínim 3 individus amb CCR o tumor associat al CCHNP (endometri, intestí prim, urèter o pelvis renal), un dels familiars és de primer grau dels altres dos, i
2. Mínim dues generacions consecutives afectes, i
3. Mínim un cas diagnosticat abans dels 50 anys, i
4. Exclusió del diagnòstic de PAF, i
5. Confirmació dels diagnòstics amb informes anatomopatològics

Criteris revisats de Bethesda⁵³

1. CCR diagnosticat abans dels 50 anys, o
2. CCR sincrònic o metacrònic, o un altre tumor associat a CCHNP¹, independentment de l'edat de diagnòstic, o
3. CCR amb histologia de tumor amb IMS² diagnosticat abans dels 60 anys, o
4. CCR amb un o més familiars de primer grau amb un tumor associat a CCHNP¹, un dels càncers diagnosticats abans dels 50 anys, o
5. CCR amb 2 o més familiars de primer o segon grau amb un tumor associat a CCHNP¹, independentment de l'edat

¹Tumors associats a CCHNP: CCR, endometri, estómac, ovari, pàncrees, urèter i pelvis renal, tracte biliar, cerebral (glioblastoma), adenomes sebàcics i queratoacantomes, i intestí prim

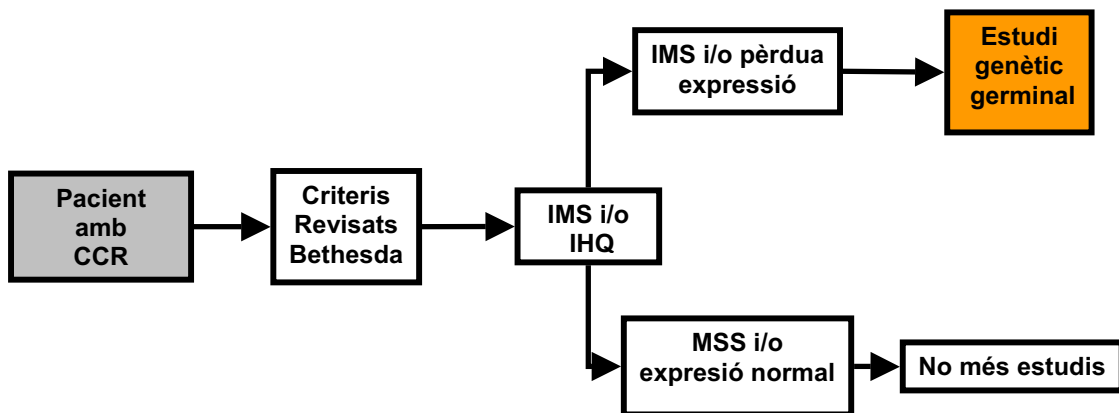
²Presència de limfòcits infiltrants de tumor, reacció Crohn-like, diferenciació mucinosa/anell de segell, o medul·lar

Des de la descripció per primera vegada de la síndrome de Lynch fins a la actualitat, els criteris diagnòstics han anat evolucionat juntament amb el millor coneixement del fenotip de la malaltia i la identificació dels gens causants, així com dels fenòmens moleculars que s'observen en el si del tumor (inestabilitat de microsatèl·lits i pèrdua d'expressió proteica). Així, els criteris clínics clàssics, els criteris d'Amsterdam⁵², fonamentals en el seu moment per identificar els gens causants, avui en dia es consideren ja una estratègia obsoleta com a eina per a la identificació. Això és degut a que

només un 45%-65% de les famílies que compleixen els criteris d'Amsterdam presenten mutacions germinals en alguns dels gens reparadors de l'ADN⁵⁴. A més, en una proporció no menyspreable de famílies que compleixen aquests criteris o que tenen una marcada història familiar de CCR no és possible identificar aquestes mutacions⁵⁵⁻⁵⁷. Contràriament, famílies que no compleixen els criteris d'Amsterdam poden presentar mutacions germinals en aquests gens^{58, 59}. Aquestes situacions indicarien que, per una banda, probablement existeixen altres gens responsables de corregir errors de replicació de l'ADN desconeguts fins el moment i que, per altra, els criteris clínics no són suficientment sensibles per a detectar totes les famílies amb síndrome de Lynch. Per aquest motiu, es van dissenyar els criteris de Bethesda⁶⁰, uns criteris més sensibles però menys específics, modificats el 1999 i revisats el 2004⁵³, amb la intenció d'identificar pacients amb una elevada probabilitat de ser portadors de mutacions als gens reparadors de l'ADN, als quals estaria indicat determinar la presència del fenomen d'inestabilitat de microsatèl·lits o immunohistoquímica per avaluar pèrdua d'expressió proteica en el si del tumor. En els pacients amb alteració del sistema de reparació de l'ADN al tumor (definit com presència d'inestabilitat de microsatèl·lits i/o pèrdua d'expressió), hauria d'investigar-se la presència de mutacions en els gens reparadors de l'ADN⁵³.

Aquesta estratègia ha permès millorar substancialment el diagnòstic de la síndrome⁶¹, i de fet, constitueix l'estratègia més acceptada actualment **(Figura 5)**.

Figura 5. Estratègia d'identificació de la síndrome de Lynch basada en els criteris revisats de Bethesda.



No obstant, aquests criteris han estat criticats degut a la seva complexitat, la seva baixa especificitat i la necessitat d'estudi molecular del tumor, el qual en ocasions no està disponible. Així, de forma similar amb el que va passar amb la síndrome del càncer de mama i ovari hereditari en el passat^{62, 63}, la identificació de la síndrome de Lynch es mou cap a algorismes més acurats i models predictius, que combinen informació clínica i molecular. En aquest sentit, recentment, diversos grups interessats en el CCR hereditari han dissenyat diferents models predictius per a la identificació d'individus amb mutació als gens reparadors de l'ADN⁶⁴⁻⁶⁶.

El primer model predictiu de mutacions a la síndrome de Lynch va aparèixer el 1998, anomenant-se model de Leiden⁶⁷. Es tracta d'un model de regressió logística basat en una població de pacients amb CCR atesos a una unitat d'alt risc de CCR, dissenyat per identificar portadors de mutacions germinals als gens *MLH1/MSH2*. Aquest ha estat l'únic model predictiu durant els últims anys. Les variables incloses en el model eren el compliment dels

criteris d'Amsterdam, l'edat mitjana dels diagnòstics de CCR, i la presència d'algún càncer d'endometri a la família. No obstant, aquest model encara incorpora variables complexes (criteris d'Amsterdam) i va ser desenvolupat en una població relativament petita d'individus d'alt risc. A més, no contemplava la realització d'estudis moleculars al si del tumor (inestabilitat de microsatèl·lits o immunohistoquímica).

Més recentment, han aparegut 3 nous models per a la identificació de portadors de mutacions als gens reparadors de l'ADN (**Taula 4**). El primer, anomenat PREMM_{1,2}, esdevé d'una anàlisi de regressió logística realitzat a una de les cohorts més grans publicades fins al moment d'individus en risc de tenir una síndrome de Lynch⁶⁵. Els autors d'aquest estudi van realitzar l'anàlisi mutacional de *MLH1/MSH2* a una cohort de 1914 pacients als que se'ls havia demanat l'estudi genètic en base a característiques clíniques als laboratoris Myriad Genetic Lab. a EE.UU. En base a característiques personals i familiars, es va dissenyar un model que va ser adequadament validat a l'estudi, i que es pot consultar a internet (<http://www.dfci.org/premm>). El model prediu la probabilitat de ser portador de mutacions als gens *MLH1/MSH2* amb una àrea sota la corba ROC (*receiver operating characteristic*) de 0,80 (interval de confiança del 95%: 0,76-0,84). No obstant, la validació d'aquest model en una població diferent a la que va ser dissenyat, especialment a pacients amb CCR, no s'ha realitzat fins ara.

Els altres dos models inclouen informació molecular per tal de refinar la predicció de la probabilitat de ser portador d'una mutació. El primer és tracta d'un model desenvolupat al Regne Unit a una gran cohort de pacients amb CCR de base poblacional amb una edat inferior a 55 anys⁶⁶. Aquest

model consisteix en dues fases: la primera es basa exclusivament en variables clíniques (edat, sexe, localització del tumor, presència de CCR sincrònic o metacrònic, història familiar de CCR o càncer d'endometri, i edat del familiar amb CCR més jove), disponible a internet (<http://www1.hgu.mrc.ac.uk/softdata/mmrpredict.php>); i la segona, basada en dades d'inestabilitat de microsatèl·lits o immunohistoquímica del tumor. L'àrea sota la corba ROC d'aquest model, que prediu mutacions germinals a *MLH1*, *MSH2* i també *MSH6*, va ser de 0,82 (IC 95%, 0,72-0,91). No obstant, la aplicació d'aquest model en una població major de 55 anys o en aquells amb altres neoplàsies associades a la síndrome de Lynch no ha estat avaluada. L'últim model és un model mendelià per tal de determinar la probabilitat de ser portador de mutacions germinals als gens *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* basat en dades clíniques, moleculars, i la prevalença i penetrança de les mutacions d'aquests gens a la població, segons els estudis epidemiològics disponibles⁶⁴. Aquest model bayesià, utilitza el software gratuït CaGene (<http://www3.utsouthwestern.edu/cancergene>) i permet establir la probabilitat de ser portador de mutació tant a pacients amb CCR com a familiars sans. L'àrea sota la corba ROC va ser de 0,83 (IC 95%, 0,78-0,88). La aplicabilitat d'aquest model a la pràctica clínica encara no s'ha avaluat.

Taula 4. Models predictius per a la identificació de la síndrome de Lynch

Model	Població	Gens	Tumors inclosos	Mètode	Resultats
Barnetson ⁶⁶	870 pacients amb CCR <55 anys de base poblacional	Mutacions puntuals a <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> i grans reordenaments a <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i>	Còlon i endometri	Model en dos fases: 1: Anàlisi de regressió logística multivariat. 2: Refinament de la predicció amb informació molecular del tumor (IMS i IHQ).	Predictors: Edat, sexe, localització del tumor, múltiples tumors, edat més jove de CCR a la família (dicotomitzada a 50 anys), presència de càncer d'endometri a familiars de primer grau. AUC= 0,82 (IC 95% 0,72-0,91)
PREMM _{1,2} ⁶⁵	1914 individus sotmesos a estudi genètic per sospita clínica de síndrome de Lynch	Mutacions puntuals i grans reordenaments a <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i>	Còlon, endometri, altres neoplàsies associades a la síndrome de Lynch, adenomas colònics	Anàlisi de regressió logística multivariat	Predictors: <u>Proband</u> : nombre de CRC, adenomes, càncer d'endometri, altres neoplàsies associades a la síndrome de Lynch, edat al diagnòstic del CCR, adenomas i cancer d'endometri. <u>Familiars</u> : CCR, cancer d'endometri, altres neoplàsies associades a la síndrome de Lynch, edat al diagnòstic del CCR i endometri als familiars de primer i segon grau AUC=0,80 (IC 95% 0,77-0,83)
MMRpro ⁶⁴	Validació a 279 individus de 226 famílies amb diagnòstic clínic	Mutacions puntuals i grans reordenaments a <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> i <i>MSH6</i>	Còlon i endometri	Anàlisi mendelià i bayesià incorporant la penetrança i prevalença de les mutacions, i els valors predictius de l'estudi molecular del tumor amb IMS o IHQ. Té en compte el nombre de familiars i els individus no afectes.	AUC de la validació=0,83 (IC 95% 0,78-0,88)

AUC: area sota la corba ROC; IMS: inestabilitat de microsatèl·lits; IHQ: immunohistoquímica.

2.1.4. Estratègia de cribratge

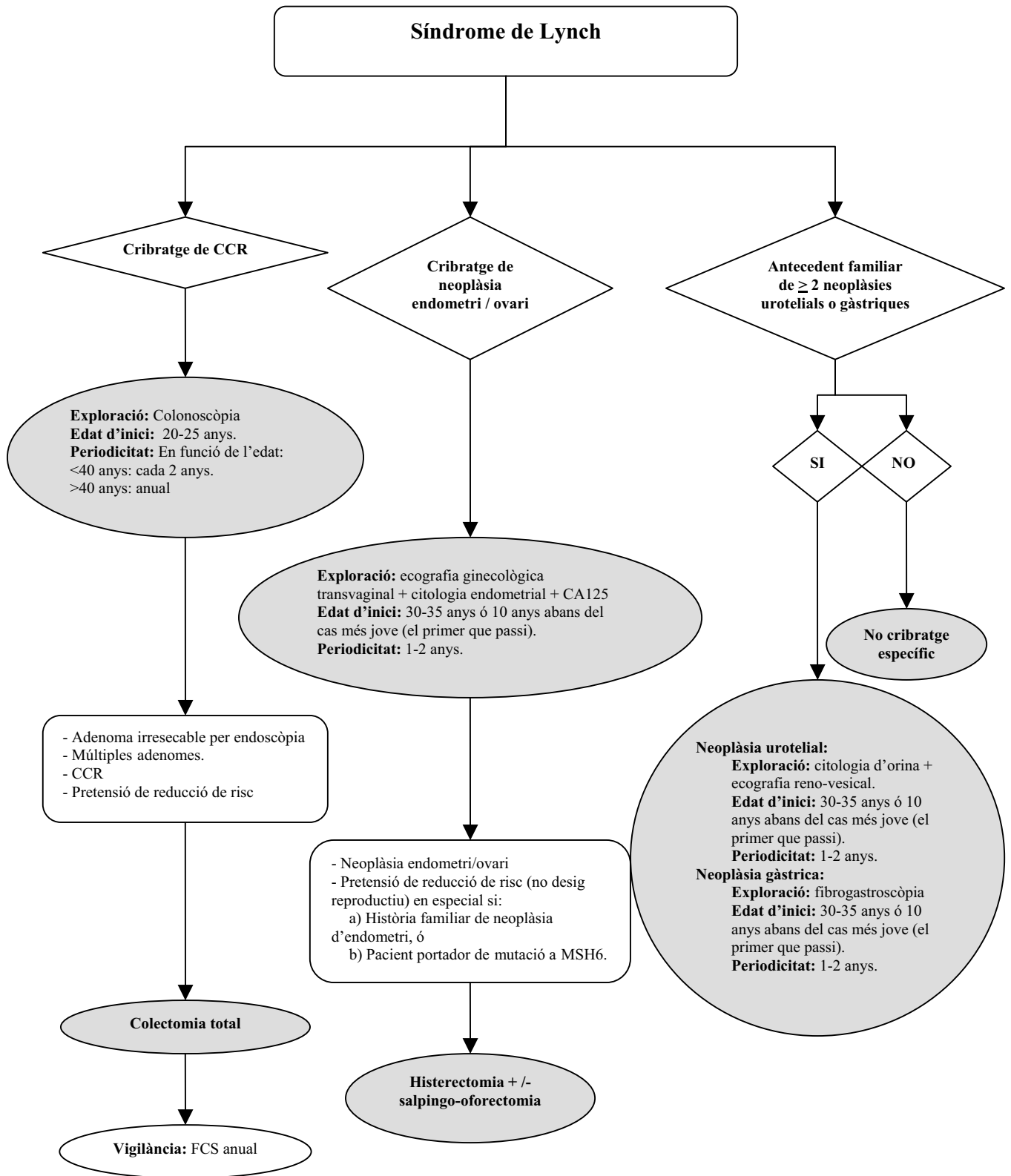
L'anàlisi genètic dels gens reparadors de l'ADN permet el diagnòstic presimptomàtic dels familiars en risc^{26, 68, 69}. Així, aquesta anàlisi mutacional hauria d'oferir-se als familiars de primer grau (pares, germans i fills) d'individus portadors d'una mutació germinal en alguns d'aquests gens. Amb aquesta estratègia s'aconsegueix optimitzar la relació cost-eficàcia del cribratge de la síndrome de Lynch⁷⁰, de manera que el seguiment endoscòpic pot centrar-se únicament en aquells membres portadors de mutacions.

El seguiment colonoscòpic està dirigit a la identificació i resecció de pòlips adenomatosos, així com a la detecció de carcinomes en fases inicials del seu desenvolupament⁷¹. En els darrers anys s'ha demostrat que la vigilància periòdica mitjançant colonoscòpies millora el pronòstic dels individus pertanyents a famílies amb aquesta síndrome, al haver-se demostrat que la realització en individus que pertanyen a famílies amb síndrome de Lynch d'una colonoscòpia cada 3 anys durant un període de 15 anys s'associa a una disminució del 62% en la incidència de CCR ($p=0,02$) i del 66% en la mortalitat global ($p=0,003$) en relació a la no realització de cribratge⁵¹. L'interval idoni entre exploracions no està ben establert, encara que el fet que alguns estudis hagin descrit l'aparició de CCR als dos o tres anys d'haver-se realitzat una colonoscòpia negativa^{51, 72, 73} i la més ràpida progressió des d'adenoma a carcinoma a la síndrome de Lynch³⁵ justificaria un interval d'1 ó 2 anys entre exploracions. Encara que sense evidències directes es recomana iniciar el cribratge endoscòpic a partir dels 20-25 anys o 10 anys abans de l'edat de diagnòstic del CCR en el familiar afecte més jove, escollint la opció més precoç^{26, 68, 74} (**Figura 6**).

En quant a les neoplàsies extracolòniques associades a la síndrome de Lynch en individus portadors de mutacions en els gens responsables, el registre de càncer de Finlàndia ha permès estimar la seva incidència: 60% per el càncer d'endometri, 13% per al d'estómac, 12% per al d'ovari, 4% per al de vies urinàries, 3,7% per al cerebral, 3,3% per al de pelvis renal, i 2% per al de vies biliars⁷⁵. Tant els individus que han desenvolupat CCR como els familiars en risc tenen una major probabilitat de presentar una neoplàsia extracolònica, el que podria justificar el cribratge de les mateixes⁷⁶. Malgrat tot, a diferència del que succeeix en relació amb el CCR, no està demostrada la eficàcia d'aquestes estratègies^{60, 77, 78}, encara que s'assumeix que el benefici podria ser major en aquelles famílies en les que existeix una major agregació d'una determinada neoplàsia extracolònica⁷⁶. Al ser el càncer d'endometri la neoplàsia extracolònica més freqüent, la majoria de grups recomanen la realització d'una ultrasonografia pèlvica anual o bienal a partir dels 25-35 anys d'edat^{76, 77, 79} (**Figura 6**).

En resum, les recomanacions actuals en els pacients pertanyents a famílies amb sospita de síndrome de Lynch contempnen fonamentalment la realització de l'anàlisi mutacional dels gens reparadors de l'ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*)^{26, 80}. En els individus portadors de mutacions o en aquells casos en els que no és possible determinar-ne la seva presència, estarà indicat el cribratge endoscòpic. A més, en funció del predomini de neoplàsies d'un altre origen en el si d'una determinada família, és convenient efectuar altres exploracions dirigides a descartar la seva presència.

Figura 6. Cribratge, vigilància i tractament de la síndrome de Lynch



2.1.5. Tractament

Donat que els pacients amb síndrome de Lynch presenten un risc incrementat de desenvolupar tumors metacrònics⁷¹, tenen una ràpida progressió des d'adenoma a carcinoma³⁵ i que en moltes ocasions el carcinoma s'origina en lesions planes difícils de tractar endoscòpicament⁸¹, alguns grups recomanen la realització d'una resecció extensa (colectomia total o proctocolectomia) per al tractament de les neoplàsies colorectals⁷⁶. L'edat, la presència de comorbiditat, la opinió del pacient, així com la localització del tumor són factors a tenir en compte en la decisió terapèutica⁷⁶ (**Figura 6**).

No existeixen dades que recomanin la realització d'una colectomia profilàctica en pacients en risc o en portadors de mutacions en els gens responsables de la síndrome de Lynch⁷⁶.

2.1.6. Vigilància post-resecció

Es ben conegut el fet que després del tractament quirúrgic del CCR en pacients amb la síndrome de Lynch existeix un elevat risc de lesions metacròniques, havent-se observat que la meitat dels pacients sotmesos a una ressecció colònica segmentaria presenten una segona neoplàsia colorectal als 10 anys³⁴. A més, el risc de desenvolupar un carcinoma de recte en els pacients tractats mitjançant colectomia total és del 12% després d'un període de seguiment de 12 anys⁸². Aquesta situació justifica la vigilància endoscòpica després de la cirurgia⁸².

Finalment, és important assenyalar que, a l'actualitat, no existeixen dades que demostrin la utilitat de les estratègies de quimioprofilaxi en aquesta síndrome^{34, 83}.

2.2. Càncer colorectal associat al gen *MYH*

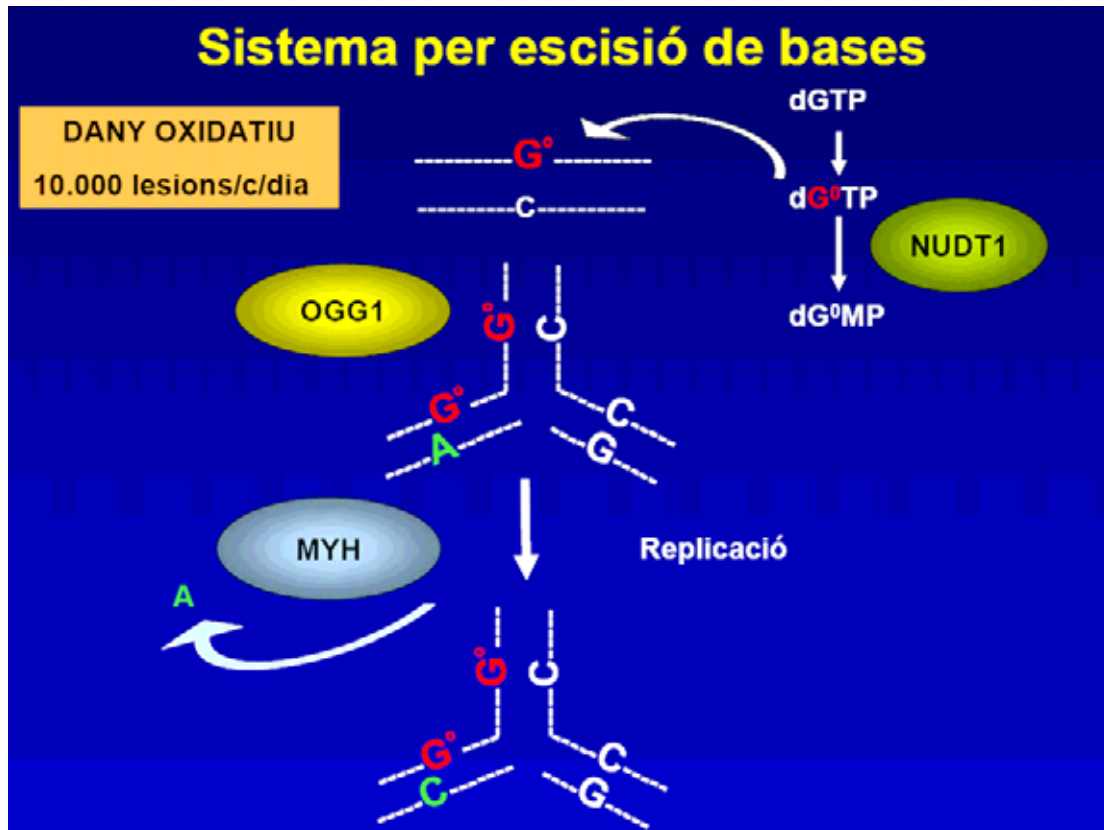
2.2.1. *MYH* i la via del sistema per escisió de bases

Al-Tassan i col·laboradors⁸⁴ van investigar una família britànica en la que tres germans presentaven adenomes colorectals múltiples i CCR. La seqüenciació total del gen *APC*, causant de la poliposi adenomatosa familiar, a l'ADN germinal de dos dels germans afectes junt amb l'anàlisi d'haplotips i d'expressió gènica van excloure un defecte gènic en aquest gen. L'anàlisi de la inestabilitat de microsatèl·lits a l'ADN extret d'onze neoplàsies d'aquesta família també va excloure un possible defecte en la reparació de l'ADN. No obstant, el patró de mutacions observades en els tumors d'aquests pacients va facilitar la identificació del gen causant. En aquest sentit, la seqüenciació completa d'*APC* a cada un dels 11 tumors va revelar 18 mutacions somàtiques, 15 de les quals eren transversions G:C→T:A. Aquest tipus de mutacions correspon només a un 10% de les identificades somàticament en el gen *APC*, essent les mutacions de pèrdua de pauta de lectura (*frameshift*) i la pèrdua d'heterozigositat (pèrdua al·lèlica) les que més freqüentment causen la inactivació somàtica del gen *APC* en els tumors colorectals. La comparació de les troballes en aquesta família britànica amb una base de dades amb més de 800 mutacions somàtiques al gen *APC* en pacients amb CCR esporàdic o associat a la PAF va confirmar l'increment altament significatiu de transversions G:C→T:A en aquesta família. Els compostos derivats de l'oxígen reactiu amb potencial lesiu per el ADN tenen un paper important en processos com l'envelliment, el càncer i les malalties neurodegeneratives. Als humans, s'estima que la freqüència del dany oxidatiu a l'ADN és de 10.000 lesions per cèl·lula i dia⁸⁵. La 8-oxo-7,8-

dihidro2'deoxiguanosina (8-oxodG) és un dels productes nocius més estables del dany oxidatiu a l'ADN i la seva concentració és alta en el càncer de mama, pulmó i ronyó. Aquest compost es mal aparella amb residus d'adenina provocant les mutacions G→T i C→A a la nova cadena en la replicació de l'ADN (**Figura 7**). La incorporació d'8-oxodG a l'ADN té lloc a través de l'oxidació directa dels residus de guanina en la cadena motlle o gràcies a la incorporació d'8-oxodG procedent del conjunt de nucleòtids lliures. Les mutacions apareixen després de la replicació de l'ADN degut a que les polimerases incorporen adenosines a 8-oxodG a un ritme molt major del que incorporen citosines.

A *Escherichia coli* existeixen tres enzims que ajuden a protegir la cèl·lula dels efectes mutagènics de la oxidació de la guanina. La glicosilasa d'ADN MutM elimina la base oxidada dels parells de base 8-oxodG:C a l'ADN de doble cadena, la glicosilasa d'ADN MutY escindeix les adenines incorporades per error i aparellades amb 8-oxodG durant la replicació, i la 8-oxodGTPasa MutT impideix la incorporació d'8-oxodGTP a la cadena naixent d'ADN durant la replicació. Els gens homòlegs de mutM, mutY y mutT als humans han estat identificats i es denominen *OGG1*⁸⁶, *MYH*⁸⁷ i *MTH1/NUDT1*⁸⁸, respectivament.

Figura 7. Esquema del sistema per escisió de bases.

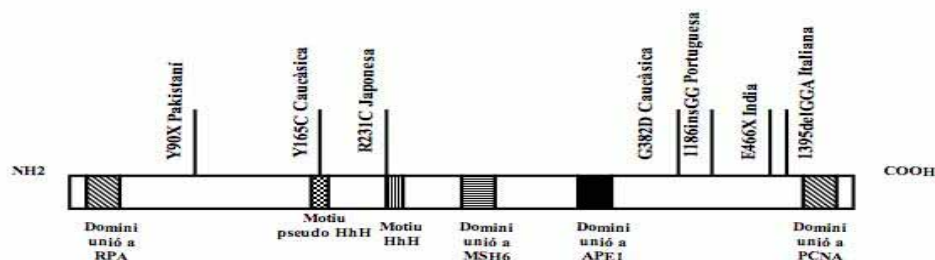


Per determinar si un defecte hereditat en la via de reparació d'8-oxodG era responsable del patró de mutacions somàtiques G:C→T:A a la família estudiada, Al-Tassan i col·laboradors van seqüenciar per complet els gens *OGG1*, *MYH* i *MTH1* a l'ADN extret de sang d'un dels familiars afectes. D'aquesta forma es van identificar dues mutacions que canvien de forma no conservativa dos aminoàcids del gen *MYH* (Y165C i G382D), essent la resta de germans afectes també heterocigots compostos per aquestes dues mutacions. La resta de familiars no afectes eren o bé heterocigots per una d'elles o no portadors, suggerint un patró d'herència autosòmic recessiu.

2.2. MYH i càncer colorectal

El gen *MYH* està localitzat en el braç curt del cromosoma 1 entre p32.1 i p34.3, té una longitud de 7.100 bases i conté 16 exons que codifiquen una proteïna de 535 aminoàcids amb un 41% d'homologia amb la proteïna homòloga MutY de l'*E. coli*⁸⁹. Els seus dominis funcionals han estat descrits previament i s'esquematitzen en la **Figura 8**.

Figura 8. Esquema de la proteïna MYH amb els dominis funcionals descrits fins el moment, i algunes de les mutacions ètniques més prevalents.



A l'estudi d'Al-Tassan i col·laboradors l'han seguit diversos estudis⁹⁰⁻⁹⁴ principalment focalitzats en pacients amb adenomes múltiples que han demostrat que les mutacions bial·lèliques germinals al gen *MYH* s'associen a una forma de poliposi adenomatosa familiar, amb un nombre de pòlips que oscil·la entre 5-100. De fet, s'ha observat que les mutacions germinals

bial·lèliques al gen *MYH* són la causa de entre el 25-60% de les poliposi amb fenotip atenuat (<100 pòlips) i fins un 10% de la poliposi adenomatosa clàssica (>100-1000 pòlips). Així, actualment la forma de poliposi adenomatosa causada per mutacions al gen *MYH* es coneix com Poliposi Associada al gen *MYH* (PAM), essent la primera forma de síndrome polipósica associada al CCR amb un patró d'herència recessiu.

Una altra qüestió important detectada pels estudis mencionats ha estat l'existència de mutacions ètniques o adscrites a un origen geogràfic concret (**Figura 8**). Així, les mutacions G382D i Y165C corresponen a les majoritàriament detectades a la població caucàsica, mentres que altres mutacions s'han descrit a poblacions com la pakistanesa⁹³, la indú⁹³, la italiana⁹⁴, la portuguesa⁹⁵ o la japonesa.

Per altra banda, estudis recents han demostrat que les mutacions bial·lèliques al gen *MYH* també predisposen al desenvolupament de CCR, seguint un patró d'herència recesiva, amb un risc de CCR associat de més de 93 vegades el de la població general²¹. Així, diversos estudi de base poblacional han mostrat que les mutacions en aquest són la causa de fins un 1% de tots els CCR, amb una penetrança del 100% als 60 años^{21, 96-98}. A la majoria dels casos, s'acompanya d'un nombre variable de pòlips sincrònics (5-100). No obstant, cal destacar que en més d'un 30% dels pacients amb mutacions bial·lèliques que han desenvolupat un CCR no presenten pòlips sincrònics, pel que la presència d'aquests com a possible aproximació per a la detecció de portadors de mutacions és poc sensible²¹. De fet, tot i que s'ha suggerit que la presència de pòlips sincrònics i una edat jove al diagnòstic de CCR podrien ser característiques útils per a la detecció dels pacients amb

CCR portadors de mutacions a *MYH*, no s'ha avaluat la seva eficàcia en una cohort de pacients amb CCR de base poblacional.

La predisposició al CCR en aquells individus portadors de mutacions monoal·lèliques a *MYH* és un tema actualment controvertit. S'ha suggerit un augment del risc de CCR seguint un patró autosòmic dominant en base a la detecció, en alguns estudis, d'una major agregació familiar de CCR en aquests individus⁹⁹. Estudis més recents han demostrat un augment del risc de CCR a edats avançades en relació amb la heterocigosi, recolçant la hipòtesi de que el gen *MYH* podria actuar com a gen de susceptibilitat per al CCR de baixa penetrança²¹. No obstant, cap dels estudis de casos i controls realitzats fins el moment ha pogut demostrar de forma individual un augment del risc en els individus amb mutació monoal·lèlica al gen *MYH* (**Taula 5**), i una meta-anàlisi recent ha demostrat un augment de risc no significatiu associat als heterocigots (risc relatiu de 1,3 (IC 95%: 1,0-1,7; p=0,09)¹⁰⁰. Totes aquestes discrepàncies posen de manifest un efecte lleu de les mutacions del gen en heterocigosi, pel que calen nous estudis amb aproximacions metodològiques adequades (meta-anàlisi, estudis de cohorts familiars) de tal d'esbrinar definitivament el risc associat en aquesta situació.

Taula 5. Estudis de casos i controls que han avaluat el risc associat a mutacions monoal·lèliques al gen *MYH*.

ESTUDI	CASOS		CONTROLS		OR (IC 95%)
	N	Monoal·lèlics (%)	N	Monoal·lèlics (%)	
Fleischmann i col.	358	5 (1,4)	354	1 (0,3)	5,0 (0,7-32)
Wang i col.	444	10 (2,3)	313	4 (1,3)	1,7 (0,5-5,0)
Peterlongo i col.	555	4 (0,7)	918	7 (0,8)	0,9 (0,2-3,0)
Enholm i col.	1042	5 (0,5)	424	0	-
Croitoru i col.	1238	29 (2,3)	1255	21 (1,7)	1,4 (0,8-2,5)
Farrington i col.	2239	45 (2,0)	1845	28 (1,5)	1,3 (0,8-2,1)

3. L'estudi *EPICOLON*

A finals de 1999 es va començar a gestar un dels projectes cooperatius més ambiciosos portats a terme a l'Estat Espanyol en els últims anys, anomenat EPICOLON. Es tractava d'un estudi epidemiològic, prospectiu i multicèntric d'àmbit estatal i de base poblacional, impulsat des de la *Asociación Española de Gastroenterología*, i en el que van participar més de 25 hospitals distribuïts per tota la geografia espanyola. La coordinació d'aquest estudi es va portar a terme pels grups d'oncologia digestiva de l'Hospital Clínic, a càrrec del Dr. Antoni Castells, i dels Hospitals del Mar, Germans Trias i Pujol de Badalona, i Hospital General Universitario de Alicante. En aquest projecte, des de novembre de 2000 fins octubre de 2001 es van enregistrar prop de 2000 pacients amb CCR, dels quals es va recollir una detallada història personal i familiar centrada en els antecedents neoplàstics, així com mostres de teixit tumoral i no tumoral de la majoria d'ells.

Aquest projecte ha realitzat aportacions rellevants al coneixement de la síndrome de Lynch i altres formes hereditàries de CCR, en especial pel que respecte a epidemiologia, diagnòstic, caracterització molecular i pronòstic⁴⁶,

61, 101-105

La Unitat de CCR de l'Hospital Clínic de Barcelona és dipositària de gran part de les mostres obtingudes en el si del projecte EPICOLON. Això permet disposar, de forma immediata, d'un gran nombre de mostres en el que poder realitzar estudis de recerca, dirigits a aprofundir en les caracterització de les formes hereditàries de CCR.

JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

Justificació general

El CCR és una de les neoplàsies més prevalents als països occidentals i un dels tumors on els factors genètics juguen un paper més fonamental en el seu desenvolupament. Així, el anomenat CCR hereditari, entès com aquelles formes degudes a l'alteració en gens d'alta penetrança, suposa entre el 3 i el 5% de tots els CCR¹⁰⁶. Tot i que suposen un percentatge baix de forma global, l'elevada prevalença del CCR i les conseqüències catastròfiques de les síndromes hereditàries converteixen el diagnòstic d'aquests individus en un objectiu-fonamental en la pràctica clínica, la qual cosa justifica l'existència de centres especialitzats en forma de clíniques d'alt risc de CCR. En aquest sentit, el diagnòstic d'una síndrome hereditària, a banda de l'interès científic, té importants conseqüències potencialment beneficioses. Per una banda, permet la vigilància estricta del pacient afecte, no només en relació al CCR sino també a altres neoplàsies associades a cada síndrome³⁴. Per altra banda, el diagnòstic genètic permet el diagnòstic presimptomàtic dels familiars portadors de la malaltia, i així focalitzar els recursos en aquests, lliurant-se del seguiment aquells que no tenen la mutació.

Per tant, el primer pas consisteix en identificar els individus o pacients que potencialment poden tenir una malaltia hereditària, per tal de realitzar en ells els estudi moleculars adients. Les síndromes hereditàries es divideixen des d'un punt de vista fenotípic i pràctic en síndromes polipòsiques, fonamentalment la poliposi adenomatosa familiar, la poliposi associada al gen *MYH*, la síndrome de Peutz-Jeghers i altres, i en síndromes no polipòsiques, encapçalades per la síndrome de Lynch i pel CCR associat al gen *MYH*.

Mentre que a la pràctica clínica el diagnòstic de les síndromes polipòsiques és senzill donada la seva expressivitat clínica, el diagnòstic de les formes no polipòsiques és un repte constant per al clínic, donat que en moltes ocasions pot ser indistingible del càncer esporàdic.

La síndrome de Lynch constitueix la forma més freqüent de càncer hereditari. La instauració dels criteris d'Amsterdam¹⁰⁷ va ser cabdals per a definir el CCHNP i identificar la seva base molecular. Posteriorment, aquests criteris varen ser modificats (criteris d'Amsterdam II) per considerar-se els originals massa restrictius⁵². Més tard, a l'any 1996, el *National Cancer Institute* va proposar els criteris de Bethesda, els quals tenien com objectiu identificar aquells pacients amb una major probabilitat de ser portadors de mutacions i que haurien de ser avaluats mitjançant estudi d'inestabilitat de microsatèl·lits⁶⁰. Aquests criteris van ser modificats el 1999 i finalment revisats el 2004, i actualment constitueixen l'estratègia més acceptada per tal d'identificar els pacients amb CCR portadors de mutacions als gens reparadors de l'ADN. Així, en els pacients amb CCR que compleixen algun dels 5 criteris revisats de Bethesda, està indicada la realització d'un cribratge molecular del tumor per tal de detectar evidència d'alteració del sistema de reparació de l'ADN (inestabilitat de microsatèl·lits i/o immunohistoquímica de les proteïnes corresponents). No obstant això, aquests criteris han estat criticats deguts a la seva complexitat i, conseqüentment, l'escassa aplicació que han tingut, la seva baixa especificitat i la necessitat d'estudi molecular del tumor, que en ocasions no és possible. Així, recentment han aparegut varios models predictius que, basats en anàlisis de regressió logística, permeten estimar la probabilitat de ser portador d'una mutació als gens reparadors,

amb combinació o no amb l'estudi de l'alteració de la reparació de l'ADN en el si del tumor⁶⁴⁻⁶⁶. Aquests models aporten diferents avantatges en relació als criteris revisats de Bethesda⁵³, principalment la facilitat d'ús (tots ells estan disponibles a la xarxa de forma gratuïta en un forma de fàcil ompliment) i, sobretot, la quantificació del risc, de forma que en funció de la magnitud del risc, l'actitud clínica preventiva i l'estratègia molecular podria ser diferent. L'eficàcia d'aquests models per a la detecció de la síndrome de Lynch en una població de pacients amb CCR de base poblacional no s'ha estudiat fins el moment.

Per altra banda, la identificació del CCR associat al gen *MYH* suposa un repte clínic encara més gran que a la síndrome de Lynch donat que es tracta d'una síndrome de recent descripció i en la que la informació sobre les manifestacions fenotípiques i el risc associat a la presència de mutacions en aquest gen és molt reduïda. Així, en relació amb el seu fenotip, s'ha descrit que en més d'un 30% dels portadors de mutacions bial·lèliques, el CCR es desenvolupa en absència de pòlips sincrònics i a una edat jove²¹. Per altra banda, el risc de CCR associat a la presència d'una mutació a un sol al·lel és controvertida. Per tot això, calen més estudis en poblacions de CCR no seleccionades per a caracteritzar millor la síndrome i establir el risc de CCR associat a la presència de mutacions.

L'estudi EPICOLON va suposar el recull de més de 1200 casos de CCR arreu de l'Estat Espanyol dels que es disposa d'informació clínica exhaustiva així com de mostres per a realitzar estudis moleculars a fi de caracteritzar i identificar les síndromes hereditàries, i representa el fonament d'aquesta Tesi Doctoral.

Justificació i objectius de l'estudi 1

Validation and extension of the PREMM_{1,2} model in a population-based cohort of colorectal cancer patients (Gastroenterology. 2008 Jan;134(1):39-46).

La síndrome de Lynch és la forma més freqüent de CCR hereditari, suposant entre l'1-5% del total de casos¹⁰⁸. Es caracteritza pel desenvolupament d'aquesta neoplàsia i d'altres (principalment, endometri) a edats joves. La síndrome té un patró d'herència dominant amb penetrança variable, i la seva causa és la presència d'una mutació germinal als gens reparadors de l'ADN, principalment *MLH1* i *MSH2* (>90% dels casos)¹⁰⁹ però també *MSH6*¹¹⁰ i *PMS2*⁴¹.

La heterogeneïtat de la síndrome fa que el diagnòstic suposi un repte per al clínic. Així, el diagnòstic es pot fer mitjançant criteris clínics, criteris moleculars (inestabilitat de microsatèl·lits i/o immunohistoquímica per a les proteïnes reparadores de l'ADN), o la combinació d'ambdós. Actualment, l'estratègia més acceptada és la realització d'estudis moleculars en aquells pacients amb CCR que compleixin algun dels criteris revisats de Bethesda^{46, 53}, i l'estudi genètic només en aquells que presenten evidència d'alteració del sistema de reparació de l'ADN amb les tècniques esmentades.

A l'igual del que va succeir amb la síndrome de mama i ovari hereditària, la identificació de la síndrome de Lynch està canviant cap el disseny de models predictius quantitius que permetin estimar la probabilitat de ser portador de mutacions germinals als gens reparadors de l'ADN. El model PREMM_{1,2}, recentment desenvolupat, permet predir la probabilitat de ser portador de mutació germinal als gens *MLH1* i *MSH2* en base a dades personals i a la història familiar⁶⁵. El model va ser desenvolupat utilitzant una

gran cohort d'individus sotmesos a estudi genètic de *MLH1/MSH2* en base a dades clíniques (personals i familiars). Mentre que el model discriminava de forma acurada els individus portadors de mutació en la cohort d'estudi, la seva eficàcia i utilitat en una població no seleccionada de pacients amb CCR era desconeguda. A més, l'eficàcia del model PREMM_{1,2} en combinació amb l'estudi molecular del tumor tampoc havia estat mai avaluada.

Per tant, utilitzant les dades del projecte EPICOLON, el primer estudi d'aquesta Tesi Doctoral va anar dirigit a avaluar l'eficàcia del model PREMM_{1,2} en una població no seleccionada de pacients amb CCR, en combinació o no amb l'estudi d'alteració del sistema de reparació de l'ADN en el si del tumor.

Justificació i objectius de l'estudi 2

Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer: a multicenter, case-control, population-based study (Clin Gastroenterol Hepatol 2007;5: 379-87).

Recentment s'ha demostrat la implicació del sistema per escisió de bases en la carcinogènesi colorectal⁸⁴. Així, està ben establert que les mutacions germinals bial·lèliques al gen *MYH* predisposen al desenvolupament d'adenomes múltiples i CCR, amb un patró d'herència recessiu^{84, 96-99, 111, 112}. No obstant, la influència sobre el risc de CCR de les mutacions monoal·lèliques és controvertit, havent-se suggerit un lleuger augment del risc amb un patró d'herència dominant, comportant-se com un gen de baixa penetrança en aquesta situació^{99, 113}.

Per altra banda, al tractar-se d'una síndrome de recent descripció, es desconeix encara amb precisió el fenotip de la malaltia. El CCR associat al gen *MYH* s'ha observat habitualment en el contexte d'una poliposi adenomatosa amb un fenotip atenuat. No obstant, en més dels 30% dels casos, el CCR es desenvolupa en absència de pòlips sincrònics²¹. Això fa que el diagnòstic d'aquesta forma de CCR hereditari suposi un repte diagnòstic, donat que no disposem d'uns criteris establerts per la seva identificació.

Per tot això, el segon estudi d'aquesta Tesi Doctoral va dirigir a avaluar la implicació de les mutacions al gen *MYH* en el CCR, utilitzant una cohort de pacients amb CCR de base poblacional com és EPICOLON.

Els objectius específics d'aquest estudi van ser:

1. Establir la prevalença de les mutacions germinals al gen *MYH* als pacients amb CCR a Espanya.
2. Avaluar la implicació de les mutacions monoal·lèliques al gen *MYH* en la agregació familiar d'aquesta neoplàsia i/o neoplàsies associades.
3. Establir el risc de CCR associat a la presència de mutacions al gen *MYH*.
4. Establir factors predictius per a la detecció de pacients amb CCR portadors de mutacions al gen *MYH*.

PUBLICACIONS ORIGINALS

Els resultats dels estudis que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han sigut recollits en les següents publicacions:

1. *“Validation and extension of the PREMM_{1,2} model in a population-based cohort of colorectal cancer patients”.*

Balaguer F, Balmaña J, Castellví-Bel S, Steyerberg EW, Andreu M, Llor X, Jover R, Syngal S, Castells A, for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association

Gastroenterology. 2008 Jan;134(1):39-46

Factor d'impacte: 12,457

2. *“Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer: a multicenter, case-control, population-based study”.*

Balaguer F, Castellví-Bel S, Castells A, Andreu M, Muñoz J, Gisbert JP, Llor X, Jover R, de Cid R, Gonzalo V, Bessa X, Xicola RM, Pons E, Alenda C, Payá A, Piqué JM, for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association.

Clinical Gastroenterology Hepatology. 2007 Mar;5(3):379-87.

Factor d'impacte: pendent d'assignació al juny de 2008

COMUNICACIONS A CONGRESSOS

Els resultats dels treballs que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han sigut presentats en els congressos internacionals que es relacionen a continuació:

1. Balaguer F, Castellví-Bel S, Gonzalo V, Castells A and the GI Oncology Group of the Spanish Gastroenterology Association.

“Biallelic and monoallelic germline *MYH* mutations and colorectal cancer: correlation with family history of CRC and related cancers”.

Annual Meeting of the American Gastroenterological Association (Digestive Disease Week), Maig de 2006.

2. Castellví-Bel S, Balaguer F, Gonzalo V, Castells A, for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterology Association.

“Biallelic and monoallelic *MYH* mutations and colorectal cancer”.

Human Genome Organisation’s 11th Human Genome Meeting. Helsinki, Juny de 2006.

3. Balaguer F, Balmaña J, Castellví-Bel S, Steyerberg EH, Stoffel EM, Andreu M, Gonzalo V, Ocaña T, Syngal S, Castells A.

“Clinical application of the PREMM_{1,2} model for identification of Lynch syndrome in colorectal cancer (CRC) patients”.

World Gastrointestinal Congress 2007. Barcelona, Juny de 2007.

ARTICLES

ARTICLE 1

“Validation and extension of the PREMM_{1,2} model in a population-based cohort of colorectal cancer patients”

Validation and Extension of the PREMM_{1,2} Model in a Population-Based Cohort of Colorectal Cancer Patients

FRANCESC BALAGUER,* JUDITH BALMAÑA,[†] SERGI CASTELLVÍ-BEL,* EWOUT W. STEYERBERG,[§] MONTSERRAT ANDREU,^{||} XAVIER LLOR,[¶] RODRIGO JOVER,[#] SAPNA SYNGAL,^{**} and ANTONI CASTELLS* for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association^{††}

*Department of Gastroenterology, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clínic, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain; [†]Department of Medical Oncology, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain; [§]Department of Public Health, Erasmus Medical Center–University MC Rotterdam, the Netherlands; ^{||}Department of Gastroenterology, Hospital del Mar, Barcelona, Catalonia, Spain; [¶]Department of Gastroenterology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Catalonia, Spain; [#]Department of Gastroenterology, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain; and the ^{**}Division of Gastroenterology, Brigham and Women's Hospital and Population Sciences Division, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts

Background & Aims: Early recognition of patients at risk for Lynch syndrome is critical but often difficult. Recently, a predictive algorithm—the PREMM_{1,2} model—has been developed to quantify the risk of carrying a germline mutation in the mismatch repair (MMR) genes *MLH1* and *MSH2*. However, the model's performance in an unselected, population-based colorectal cancer population as well as its performance in combination with tumor MMR testing are unknown. **Methods:** We included all colorectal cancer cases from the EPI-COLON study, a prospective, multicenter, population-based cohort (n = 1222). All patients underwent tumor microsatellite instability analysis and immunostaining for *MLH1* and *MSH2*, and those with MMR deficiency (n = 91) underwent tumor *BRAF* V600E mutation analysis and *MLH1/MSH2* germline testing. **Results:** The PREMM_{1,2} model with a $\geq 5\%$ cut-off had a sensitivity, specificity, and positive predictive value (PPV) of 100%, 68%, and 2%, respectively. The use of a higher PREMM_{1,2} cut-off provided a higher specificity and PPV, at expense of a lower sensitivity. The combination of a $\geq 5\%$ cut-off with tumor MMR testing maintained 100% sensitivity with an increased specificity (97%) and PPV (21%). The PPV of a PREMM_{1,2} score $\geq 20\%$ alone (16%) approached the PPV obtained with PREMM_{1,2} score $\geq 5\%$ combined with tumor MMR testing. In addition, a PREMM_{1,2} score of $< 5\%$ was associated with a high likelihood of a *BRAF* V600E mutation. **Conclusions:** The PREMM_{1,2} model is useful to identify *MLH1/MSH2* mutation carriers among unselected colorectal cancer patients. Quantitative assessment of the genetic risk might be useful to decide on subsequent tumor MMR and germline testing.

Lynch syndrome, also called hereditary nonpolyposis colorectal cancer, is the most common form of hereditary colorectal cancer (CRC), accounting for 1% to 5% of all colorectal malignancies.^{1–3} It is characterized by early onset of CRC and other adenocarcinomas, predominantly endometrial cancer. The syndrome is inherited in an autosomal dominant pattern with variable penetrance and occurs as a consequence of germline mutations in the mismatch repair (MMR) system,⁴ mainly in *MLH1* and *MSH2* ($>90\%$ of cases)¹ but also in *MSH6*⁵ and *PMS2*.⁶ The abnormal function of these genes leads to the accumulation of errors during DNA replication, particularly in repetitive sequences (microsatellites). As a result, tumors in patients with Lynch syndrome characteristically demonstrate microsatellite instability (MSI)⁷ as well as loss of protein expression corresponding to the mutated gene.⁸

The heterogeneity of Lynch syndrome complicates early recognition, which is critical and often not straightforward. The diagnostic criteria continue to evolve as understanding and characterization of this disorder improve. Indeed, identification of Lynch syndrome can be done by tumor MMR screening using MSI testing and/or immunostaining, in combination or not with clinical criteria. At present, the most widely accepted strategy relies on tumor molecular analysis in patients fulfilling the revised Bethesda guidelines.⁷ Nevertheless, as in hereditary breast-ovarian cancer syndrome in the past,^{9,10} Lynch syndrome identification is moving toward more refined algorithms and multivariable models that com-

Abbreviations used in this paper: CRC, colorectal cancer; MLPA, multiple ligation probe amplification; MMR, mismatch repair; MSI, microsatellite instability; PPV, positive predictive value.

© 2008 by the AGA Institute

0016-5085/08/\$34.00

doi:10.1053/j.gastro.2007.10.042

bine personal and familial data to obtain a quantitative estimation of the risk.¹¹⁻¹⁴

The PREMM_{1,2} model¹¹ is a recently developed Web-based logistic regression model that predicts the likelihood of germline mutations in the *MLH1* and *MSH2* genes on the basis of personal and family history of individuals. It was developed in a large and diverse cohort of probands undergoing genetic testing on the basis of their clinical history. Whereas the model accurately discriminates gene mutation carriers in this subset of individuals at moderate to high risk for Lynch syndrome,¹¹ its usefulness in an unselected CRC population is unknown. Furthermore, efficacy of the PREMM_{1,2} model in combination with tumor MMR testing has not yet been assessed.

Using data from the EPICOLON study^{15,16}—a prospective, multicenter, population-based cohort collected to establish the incidence and characteristics of hereditary and familial CRC forms in Spain—we assessed the efficacy of the PREMM_{1,2} model, in combination or not with tumor MMR testing, for the identification of *MLH1* and *MHS2* gene mutation carriers among unselected CRC patients.

Materials and Methods

Patients

Between November 2000 and October 2001, all newly diagnosed CRC patients in 25 hospitals were included in the EPICOLON study.^{15,16} Exclusion criteria were familial adenomatous polyposis, personal history of inflammatory bowel disease, and patient or family refusal to participate in the study. The study was approved by the institutional ethics committee of each participating hospital, and written informed consent was obtained from all patients.

Demographic, clinical, and tumor-related characteristics of probands, as well as a detailed family history were obtained using a pre-established questionnaire. Pedigrees were traced backward and laterally as far as possible, or at least up to second-degree relatives, in terms of cancer history. Age at cancer diagnosis, type, location, and tumor stage of the neoplasm and current status were recorded for each affected family member.^{15,16}

Tumor Microsatellite Instability Analysis and Immunostaining

Tissue samples from tumor and normal colonic mucosa were obtained from each patient, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C until use. In cases where no frozen tissue was available, formalin-fixed, paraffin-embedded samples were used. Genomic DNA was isolated using the QiaAmp Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Microsatellite instability testing and immunostaining for *MLH1* and *MSH2* were performed in all patients regardless of age, personal or family history, and tumor

characteristics. In addition, in those patients with a PREMM_{1,2} score $\geq 20\%$, immunostaining for *MSH6* and *PMS2* was also performed. Paraffin-embedded sections were immunostained with antibodies against mismatch repair proteins (anti-*MSH2*, Oncogene Research Products, Boston, MA; anti-*MLH1*, PharMingen, San Diego, CA; anti-*MSH6*, BD Transduction Laboratories; anti-*PMS2*, PharMingen), as described elsewhere.¹⁵ Tumor cells were judged to be negative for protein expression only if they lacked staining in a sample in which normal colonocytes and stroma cells were stained. If no immunostaining of normal tissue could be demonstrated, the results were considered ambiguous.

Microsatellite status was assessed using the 5-marker panel proposed by the National Cancer Institute, as described elsewhere.^{15,17,18} Tumors were classified as stable if none of the markers showed instability. Tumors with 2 or more unstable markers were classified as high level MSI (MSI-H) and tumors with 1 unstable marker were classified as low-level MSI (MSI-L).

Germline *MLH1/MSH2* Mutation Analysis

Patients found to have tumors with MMR deficiency (demonstrated by either MSI-H and/or lack of protein expression) underwent *MSH2/MLH1* germline genetic testing. Moreover, all patients with a PREMM_{1,2} score $\geq 20\%$ with MMR-proficient tumors also underwent genetic testing.

Germline mutational analysis was performed by both multiple ligation probe amplification (MLPA) analysis and sequencing, as described elsewhere.¹⁵

Tumor *BRAF V600E* Mutation Analysis

Tumor *BRAF V600E* mutation analysis was performed in all patients with MSI (high and low) and/or lack of *MLH1/MSH2* protein expression by direct sequencing in tumor DNA, as described elsewhere.¹⁹

Application of the PREMM_{1,2} Model

The PREMM_{1,2} model is a clinical model created to predict the likelihood of finding a *MLH1* or *MSH2* mutation in at-risk individuals.¹¹ The original study analyzed *MLH1/MSH2* mutation prevalence in a large cohort of patients undergoing genetic testing at Myriad Genetic Laboratories Inc (Salt Lake City, UT). A multivariable model using logistic regression and including variables related to the proband and relatives was developed. The prediction rule is available as a Web-based tool at the Dana-Farber Cancer Institute web site (<http://www.dfci.org/premm>). We calculated the PREMM_{1,2} score for each patient included in the study using the SPSS V11.0 software package (SPSS Inc, Chicago, IL).

Statistical Analysis

Sensitivity, specificity, and positive predictive value (PPV) of the PREMM_{1,2} model, either alone or in

Table 1. Clinical and Molecular Characteristics of Patients Included in the Study

Characteristics	Values
Age (y) ^a	70 ± 11
Men: no. (%)	731 (59.8)
Site of tumor: no. (%)	
Proximal to splenic flexure	357 (29.2)
Distal to splenic flexure	865 (70.8)
Tumor TNM stage: no. (%)	
I	161 (13.2)
II	510 (41.7)
III	337 (27.6)
IV	214 (17.5)
Degree of differentiation: no. (%)	
Well	292 (23.9)
Moderate	835 (68.3)
Poor	95 (7.8)
Mucinous carcinoma type: no. (%)	142 (11.6)
Synchronous colorectal cancer: no. (%)	71 (5.8)
Microsatellite instability, high: no. (%)	83 (6.8)
Microsatellite instability, low: no. (%)	28 (2.3)
Loss of MLH1/MSH2 protein expression: no. (%)	81 (6.6)
Tumor MMR deficiency ^b : no. (%)	91 (7.4)
Germline <i>MLH1</i> mutation: no. (%)	3 (0.25)
Germline <i>MSH2</i> mutation: no. (%)	5 (0.4)

MMR, mismatch repair.

^aExpressed as mean ± standard deviation.

^bTumor MMR deficiency demonstrated by either high microsatellite instability and/or loss of MLH1/MSH2 protein expression.

combination with tumor MMR testing, were calculated with respect to the presence of *MLH1/MSH2* germline mutations. These performance characteristics depend on the cut-off used for the predicted risk of mutation, and we therefore arbitrarily evaluated the following cut-off levels: <5%, ≥5%, ≥10%, ≥20%, and ≥40%. Ninety-five percent binomial confidence intervals were calculated on the basis of the Adjusted Wald method.²⁰

Continuous variables were expressed as mean ± standard deviation and compared by the Student *t* test. Categorical variables were compared by the χ^2 test, applying the Yates correction when needed.

All *P* values were two sided. A *P* value of less than .05 was considered to indicate a statistically significant difference. All calculations were performed using the 11.0 SPSS software package (SPSS Inc).

Results

Characteristics of the Patients

During the study period, 1222 patients with pathologically confirmed colorectal adenocarcinoma were diagnosed and included in the EPICOLON project. Demographic, clinical, and tumor-related characteristics of patients included in the study are summarized in Table 1.

One hundred eleven (9.1%) patients showed tumor MSI, 83 of them (6.8%) were MSI-H and 28 (2.3%) were MSI-L. Likewise, 81 (6.6%) patients had a tumor with loss of protein expression in either MLH1 (60 cases) or MSH2 (21 cases). No patients with tumors that were MSI-L had lack of MMR protein expression. However, expression of both proteins was retained in 10 tumors with MSI-H, whereas loss of MLH1 or MSH2 expression was found in 8 patients whose tumor did not show MSI. Overall, 91 (7.4%) patients were found to have a tumor demonstrating MMR deficiency (defined as MSI-H and/or loss of MLH1 or MSH2 expression).

BRAF V600E mutation was detected in 20 of 83 (24.1%) MSI-H tumors and in 18 of 60 (30%) tumors exhibiting loss of MLH1 expression. In addition, only 2 of 28 (7.1%) MSI-L tumors showed the *BRAF* V600E mutation, whereas it was not observed in any tumor with loss of MSH2 expression.

Germline genetic testing identified 8 (0.7%) unambiguous mutations in either *MSH2* (5 cases) or *MLH1* (3 cases) genes.

Efficacy of the PREMM_{1,2} Model for the Identification of *MLH1/MSH2* Gene Carriers

The distribution according to the PREMM_{1,2} predicted likelihood of carrying a *MLH1/MSH2* germline mutation in the cohort was: <5%, 826 (68%); 5–9%, 266 (22%); 10–19%, 98 (8%); 20–29%, 23 (2%); and >40%, 9 (0.7%).

We first evaluated the PREMM_{1,2} model for its ability to identify *MLH1/MSH2* mutation carriers within the large cohort of CRC patients. Performance characteristics of the PREMM_{1,2} model for the identification of *MLH1/MSH2* gene carriers depended on the cut-off used for the predicted risk of mutation (Table 2). Using a cut-off of

Table 2. Performance Characteristics of the PREMM_{1,2} Model for the Identification of *MLH1/MSH2* Gene Mutation Carriers

Strategy	Without tumor MMR test results ^a			With MSI-H or abnormal IHC tumor results ^a				
	No. (%)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Positive predictive value (95% CI)	No. (%)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Positive predictive value (95% CI)
PREMM _{1,2} ≥5%	396 (32.0)	100 (70.6-100)	68 (65.4-70.6)	2 (1.4)	39 (3.2)	100 (70.6-100)	97.4 (96.4-98.2)	20.5 (10.5-35.8)
PREMM _{1,2} ≥10%	130 (10.6)	75 (40-93.7)	89.8 (88-91.4)	4.6 (1.9-9.9)	21 (1.7)	75 (40-93.7)	98.8 (97.9-99.3)	28.6 (13.5-50.2)
PREMM _{1,2} ≥20%	32 (2.6)	62.5 (30.4-86.5)	97.7 (96.8-98.5)	15.6 (6.4-32.2)	14 (1.1)	62.5 (30.4-86.5)	99.3 (98.6-99.6)	35.7 (16.2-61.4)
PREMM _{1,2} ≥40%	9 (0.7)	25 (6.3-59.9)	99.4 (98.8-99.7)	22.2 (5.3-55.7)	7 (0.6)	25 (6.3-59.9)	99.6 (99-99.8)	28.6 (7.6-64.8)

MMR, mismatch repair; MSI-H, high microsatellite instability; IHC, immunohistochemistry; 95% CI, 95% confidence interval.

^aTumor MMR testing by either microsatellite instability or *MLH1/MSH2* immunostaining.

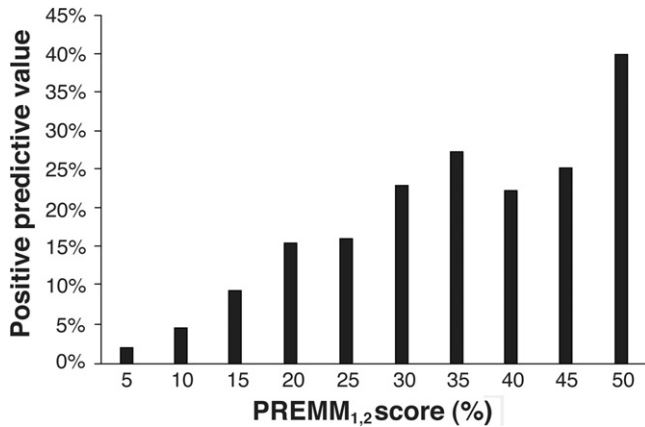


Figure 1. Positive predictive value for detecting germline *MLH1/MSH2* gene mutations according to the PREMM_{1,2} score.

≥5%, the model had a sensitivity of 100%; therefore, no mutation carriers would be missed if molecular evaluation was restricted to individuals with a PREMM_{1,2} score of ≥5%. Using higher cut-offs of 10%, 20%, and 40% led to a progressive loss of sensitivity (75%, 62.5%, and 25%, respectively). As expected, specificity increased with higher cut-offs and ranged from 68% with a 5% cut-off to 99.4% with a 40% cut-off. Positive predictive values of different cut-offs for the PREMM_{1,2} model are depicted in Figure 1.

Use of the PREMM_{1,2} Model in Combination With Tumor MMR Testing

The addition of tumor MMR testing, either by MSI analysis or immunostaining, to the PREMM_{1,2} model enhanced its performance by improving both specificity and PPV (Table 2). A PREMM_{1,2} score of ≥5% in combination with abnormal MMR testing was associated with a sensitivity of 100%, specificity of 97.4%, and PPV of 20.5%. The maximum PPV (36%) was achieved using a PREMM_{1,2} score of ≥20% in combination with an abnormal tumor MMR result. The incremental gain obtained by the addition of MSI/immunohistochemistry testing was less at higher PREMM_{1,2} cut-off values; at a PREMM_{1,2} cut-off of 40%, the addition of MSI/immunohistochemistry testing did not lead to an improvement in specificity.

Characteristics of Patients With Low PREMM_{1,2} Scores

The PREMM_{1,2} score correlated not only with the prevalence of germline mutations but also with the frequency of MMR deficiency (Table 3). Although 52 of 826 (6.3%) individuals with a PREMM_{1,2} score <5% had a MSI-H tumor or showed loss of *MLH1* and *MSH2* on immunohistochemistry, none of them carried a germline *MLH1/MSH2* mutation and 17 (33%) were associated with *BRAF* V600E mutation in the tumor (Table 3). Interestingly, in patients with abnormal MMR tests,

BRAF V600E mutation was significantly associated with a PREMM_{1,2} score <5% ($P = .009$). In fact, 17 of 20 (85%) patients with a MMR-deficient tumor associated with *BRAF* V600E mutation had a PREMM_{1,2} score <5%, whereas none of the 14 patients with a MMR-deficient tumor and PREMM_{1,2} score ≥20% showed this variant (Table 3). As recent data demonstrate that *BRAF* mutations are rare in Lynch syndrome tumors, the findings are consistent with the conclusion that a low PREMM_{1,2} score indicates a low likelihood that a patient with CRC has Lynch syndrome.

Characteristics of Patients With High PREMM_{1,2} Scores

When patients with a PREMM_{1,2} score ≥20% were stratified according to their MMR status (Table 4), patients with MMR deficiency in some clinical characteristics: they are more likely women ($P = .02$), have a lower prevalence of previous or synchronous adenomas ($P = .002$), a higher prevalence of endometrial cancer ($P = .003$), more first-degree relatives with CRC ($P = .01$), and more second-degree relatives with endometrial cancer ($P = .03$). Therefore, a high PREMM_{1,2} score in combination with MMR deficiency identified a significant group of families, recently characterized in our series, with a less penetrant cancer phenotype,¹⁸ in line with a similar group with Amsterdam I criteria recently described as familial CRC type X syndrome.²¹

We further examined potential etiologies of the CRC in the patients with high PREMM_{1,2} scores based on their MSI status. Five of 14 (36%) patients with PREMM_{1,2} score ≥20% and a MMR-deficient tumor carried a *MLH1/MSH2* germline mutation. We further investigated potential etiologies of the high PREMM_{1,2} scores for the 9 individuals who were not found to carry germline *MLH1/MSH2* mutations by performing supplemental analyses of *PMS2* and *MSH6* immunostaining, and *BRAF* mutation analysis. In these nonmutation carriers, no *BRAF*

Table 3. Prevalence of *MLH1/MSH2* Germline Mutations and Mismatch Repair Deficiency According to the PREMM_{1,2} Score

PREMM _{1,2} score	No.	<i>MLH1/MSH2</i> germline mutation (%) ^a	Tumor MMR deficiency ^b (%) [†]	Tumor MMR deficiency ^b associated with <i>BRAF</i> V600E mutation (%) ^a
<5%	826	– (–)	52 (6)	17 (2)
5–9%	266	2 (0.8)	18 (7)	2 (0.7)
10–19%	98	1 (1)	7 (7)	1 (1)
20–39%	23	3 (13)	7 (30)	– (–)
≥40%	9	2 (22)	7 (78)	– (–)
Total	1222	8	91	20

MMR, mismatch repair.

^aPercentages referred to each PREMM_{1,2} category.

^bTumor MMR deficiency demonstrated by either high microsatellite instability and/or loss of *MLH1/MSH2* expression.

Table 4. Personal and Familial Characteristics of Patients With PREMM_{1,2} Score $\geq 20\%$ According to the Mismatch Repair Status

	MMR proficiency (n = 18)	MMR deficiency (n = 14)	P value
Personal characteristics			
Age (y) ^a	66.0 \pm 15.5	60.7 \pm 19	.39
Female: no. (%)	4 (22.2)	9 (64.3)	.02
Previous CRC: no. (%)	6 (33.3)	2 (14.2)	.34
Synchronous CRC: no. (%)	7 (38.9)	3 (21.4)	.45
Previous or synchronous adenoma: no. (%)	11 (61.1)	1 (7.1)	.002
Endometrial cancer: no. (%)	– (–)	6 (42.9)	.003
Other Lynch-syndrome-associated cancers ^b : no. (%)	6 (33.3)	7 (50)	.34
Proximal CRC: no. (%)	7 (38.9)	6 (42.9)	.82
Familial characteristics			
Age of FDR with CRC (y) ^a	45.7 \pm 11.3	40.4 \pm 7.2	.13
FDR with CRC: no. (%)	6 (33.3)	11 (78.6)	.01
≥ 2 FDR with CRC: no. (%)	3 (16.7)	7 (50)	.06
FDR with endometrial cancer: no. (%)	7 (38.9)	3 (21.4)	.45
≥ 2 FDR with endometrial cancer: no. (%)	2 (11.1)	1 (7.1)	1.0 (9)
FDR with other Lynch-syndrome-associated cancers ^b : no. (%)	2 (11.1)	6 (42.9)	.09
Age of SDR with CRC (y) ^a	45.9 \pm 7.8	46.3 \pm 5.6	.84
SDR with CRC: no. (%)	1 (5.6)	4 (28.6)	.14
≥ 2 SDR with CRC: no. (%)	– (–)	2 (14.3)	.18
SDR with endometrial cancer: no. (%)	– (–)	4 (28.6)	.03
SDR with other Lynch-syndrome-associated cancers ² : no. (%)	1 (5.6)	2 (14.3)	.57
Amsterdam II criteria: no. (%)	4 (22.2)	10 (71.4)	.005

MMR, mismatch repair; CRC, colorectal cancer; FDR, first-degree relatives; SDR, second-degree relatives.

^aExpressed as mean \pm standard deviation.

^bStomach, ovaries, urinary tract, small intestine, pancreas, bile ducts, brain, or sebaceous glands.

mutation was found, and normal PMS2 and MSH6 protein expression was observed in all tumors.

To better characterize the subset of patients with a PREMM_{1,2} score $\geq 20\%$ and MMR-proficient tumors (n = 18), MSH6 and PMS2 immunostaining and *MLH1/MSH2* germline gene testing were performed in all of them. With respect to immunostaining, normal MSH6 and PMS2 protein expression was observed in all tumors. Furthermore, *MLH1/MSH2* gene testing did not show any deleterious mutations. Finally, we performed *MYH* analysis, and one patient was found to have a biallelic *MYH* mutation (G382D/Y165C) in a nested study performed in the EPICOLON cohort.²² The patient was a 49 year-old-man with 2 synchronous CRCs and 25 synchronous adenomas and no family history of any neoplasia.

Discussion

Extensive knowledge now available about the Lynch syndrome has encouraged researchers to look for a systematic, quantitative, and objective approach to identify these patients.^{11–13,23} We recently developed the Web-based PREMM_{1,2} model¹¹ on the basis of a logistic regression analysis from a large cohort of patients at risk for hereditary CRC who underwent genetic testing to quantify the relative importance of known clinical parameters in Lynch syndrome and predict the likelihood of carrying

a mutation in the *MLH1* and *MSH2* genes. Although the model performed well among individuals at moderate risk for Lynch syndrome, its usefulness and performance in a nonselected, population-based cohort of CRC patients, either alone or in combination with tumor MMR testing, was unknown.

Our study of 1222 population-based CRC cases demonstrates that the PREMM_{1,2} model constitutes a useful approach to identify *MLH1/MSH2* gene mutation carriers among patients with CRC, either alone or in combination with MMR tumor testing. The quantitative assessment of the genetic risk obtained with the PREMM_{1,2} model may drive subsequent decisions about molecular testing. Moreover, the combination with tumor MMR analysis identified a sizable subgroup of patients with a heterogeneous high CRC risk, potentially involving familial CRC type X syndrome, *MYH*-related cancer, and other, still unknown inherited disorders.

The first important finding is the demonstration that a PREMM_{1,2} cut-off of $\geq 5\%$ identified all *MLH1* and *MSH2* mutation carriers among unselected CRC patients. The use of a higher PREMM_{1,2} cut-off provided a higher specificity and PPV, at the expense of a lower sensitivity. The negative predictive value of a PREMM_{1,2} score $< 5\%$ was 100%, thus reinforcing the consistency of this cut-off point. Therefore, for the clinician in general practice, whose first decision point is to see if a patient with CRC

needs further molecular evaluation for Lynch Syndrome, a score of $<5\%$ indicates that no further referral is likely to be necessary, whereas a score of $\geq 5\%$ should lead to further molecular evaluation. The low specificity of a 5% cut-off for the presence of germline mutations necessitates further refinement of the likelihood of carrying a mutation prior to proceeding to genetic testing. Our data demonstrate that the combination of the $PREMM_{1,2}$ score with tumor MMR testing improved its specificity and PPV. Indeed, using a cut-off of $\geq 5\%$, the addition of an abnormal tumor MMR test result provided a specificity of 98% and a PPV of 21%.

An interesting finding was that the $PREMM_{1,2}$ model, in combination with tumor MMR testing, is able to identify a subset of patients resembling the recently described familial CRC type X syndrome,²¹ families who fulfill the Amsterdam I criteria without evidence of MMR deficiency. Individuals in such families have a lower incidence of CRC than those in families with Lynch syndrome, whereas incidence for other cancers may not be increased. The molecular etiology of this disorder remains unknown, with a probable heterogeneous genetic basis. In our study, patients with a $PREMM_{1,2}$ score $\geq 20\%$ with MMR-proficient tumors had features similar to those with familial CRC type X syndrome²¹: weaker family history of CRC and other malignancies and lower incidence of endometrial cancer. Interestingly, one patient with a high $PREMM_{1,2}$ score and no evidence of MMR deficiency carried biallelic *MYH* mutations (Y165C/G382D).

We are aware that our study has some limitations. First, the relatively low number of patients with *MLH1/MSH2* mutations may constitute a potential drawback of the analysis, thus restraining the reliability of performance features. Second, the model does not account for *MSH6* gene mutations, although it is certain that this gene is responsible for a small proportion of Lynch syndrome cases. Finally, genetic testing was mainly performed in those patients whose tumors showed MMR deficiency, even though it is unlikely that gene carriers were undetected when both MSI analysis and immunostaining were performed systematically. In addition, to exclude this possibility, patients with a $PREMM_{1,2}$ score $\geq 20\%$ also underwent genetic testing.

In the last few years, there has been much interest in establishing different strategies to improve the identification of patients with Lynch syndrome. These approaches range from using clinical criteria alone (ie, the Amsterdam criteria)²⁴ to universal tumor molecular testing (ie, immunostaining) in any given CRC patient.²⁵ The current most widely accepted recommendation, on the basis of combination of the revised Bethesda guidelines and tumor MMR testing,⁷ has been found to be an effective and efficient strategy for Lynch syndrome identification.¹⁵ However, these clinical criteria have been criticized because of the use of broad and complex vari-

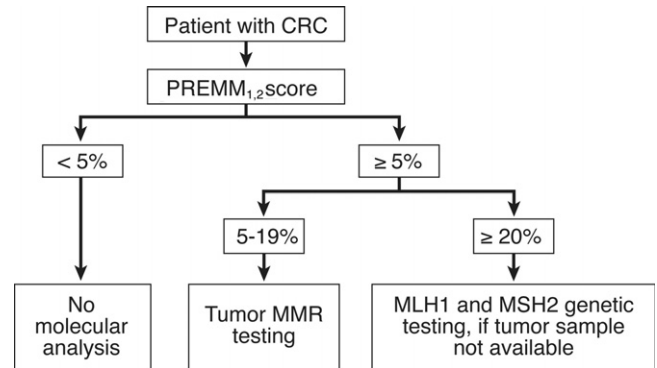


Figure 2. Proposed algorithm for the identification of *MLH1/MSH2* gene carriers among patients with colorectal cancer. CRC, colorectal cancer; MMR, mismatch repair.

ables, which make them difficult to remember for a general health care professional, their low specificity, their inability to establish the likelihood of carrying a mutation in a given patient, and the difficulty of obtaining tumor samples from affected relatives to perform the MMR analyses.²³ A potential advantage of the $PREMM_{1,2}$ model with respect to the revised Bethesda guidelines relies on its quantitative nature. In fact, the model demonstrated a reasonable ability to discriminate among risk groups for probability of mutation with respect to the prevalence of mutations observed in the *MLH1/MSH2* genes and the prevalence of MMR deficiency. The latter correlation was especially relevant given that a $PREMM_{1,2}$ score of $<5\%$ identified the subset of MMR-deficient tumors associated with the somatic *BRAF* V600E mutation, a circumstance consistent with what is seen in the sporadic CRC setting.²⁶⁻²⁸ Taking into account these results and the performance characteristics of the predicted model's risk groups, in combination or not with tumor MMR testing, we propose a strategy for *MLH1/MSH2* genetic testing in the clinical practice (Figure 2). According to this algorithm, a $PREMM_{1,2}$ score $<5\%$ could be considered a reliable cut-off to exclude those CRC patients who do not need further risk assessment because of its 100% negative predictive value for detecting germline *MLH1/MSH2* gene mutations. In patients reaching this cut-off, further decisions could also be made on the basis of $PREMM_{1,2}$ score. In patients with a score between 5% and 19%, tumor MMR testing should be performed to achieve a reasonable PPV. Finally, considering the PPV of a $PREMM_{1,2}$ score $\geq 20\%$ alone (16%) and the significant increase of the PPV at that point (Figure 1), it seems reasonable to pursue direct genetic testing in patients reaching such a score, particularly if a tumor sample is not available. It is important to note, however, that in addition to the risk estimate generated from the predictive model, other important factors (ie, accessibility to genetic services, timelines of genetic information, insurance coverage, and availability of tumor block) may help determine which strategy is the most

convenient in a given patient. In that sense, the PREMM_{1,2} model can be used by general health care providers to decide whether to refer a patient to a high-risk colorectal cancer clinic for appropriate genetic counseling, as well as by geneticists working in such units to decide on the proper molecular strategy. The use of the same algorithm in both clinical settings may contribute to a more rational referral and management approach of patients with suspected Lynch syndrome.

In conclusion, our study demonstrates that the PREMM_{1,2} model is useful to identify *MLH1/MSH2* mutation carriers among unselected CRC patients. The quantitative assessment of the genetic risk might be useful to decide subsequent molecular testing and contribute to identify other high-risk individuals who may benefit from genetic risk assessment.

Appendix

Following is a list of investigators from the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association who participated in the Epicolon study. Hospital 12 de Octubre, Madrid: Juan Diego Morillas (local coordinator), Raquel Muñoz, Marisa Manzano, Francisco Colina, Jose Díaz, Carolina Ibarrola, Guadalupe López, Alberto Ibáñez; Hospital Clínic, Barcelona: Antoni Castells (local coordinator), Virginia Piñol, Sergi Castellví-Bel, Francesc Balaguer, Victòria Gonzalo, Teresa Ocaña, María Dolores Giraldez, Maria Pellis, J. Ignasi Elizalde, Josep M. Piqué; Hospital Clínico Universitario, Zaragoza: Ángel Lanás (local coordinator), Javier Alcedo, Javier Ortego; Hospital Cristal-Piñor, Complejo Hospitalario de Ourense: Joaquín Cubiella (local coordinator), M^a Soledad Díez, Mercedes Salgado, Eloy Sánchez, Mariano Vega; Hospital del Mar, Barcelona: Montserrat Andreu (local coordinator), Xavier Bessa, Agustín Panadés, Asumpta Munné, Felipe Bory, Miguel Nieto, Agustín Seoane; Hospital Donosti, San Sebastián: Luis Bujanda (local coordinator), Juan Ignacio Arenas, Isabel Montalvo, Julio Torrado, Ángel Cosme; Hospital General Universitario de Alicante: Artemio Payá (local coordinator), Rodrigo Jover, Juan Carlos Penalva, Cristina Alenda; Hospital General de Granollers: Joaquim Rigau (local coordinator), Ángel Serrano, Anna Giménez; Hospital General de Vic: Joan Saló (local coordinator), Eduard Batiste-Alentorn, Josefina Autonell, Ramon Barniol; Hospital General Universitario de Guadalajara: Ana María García (local coordinator), Fernando Carballo, Antonio Bienvenido, Eduardo Sanz, Fernando González, Jaime Sánchez; Hospital General Universitario de Valencia: Enrique Medina (local coordinator), Jaime Cuquerella, Pilar Canelles, Miguel Martorell, José Ángel García, Francisco Quiles, Elisa Orti; Hospital do Meixoeiro, Vigo: Juan Clofent (local coordinator), Jaime Seoane, Antoni Tardío, Eugenia Sanchez; Hospital San Eloy, Baracaldo: Luis Bujanda (local coordinator), Carmen Muñoz, María del Mar Ramírez, Araceli Sánchez; Hospital Universitari

Germans Trias i Pujol, Badalona: Xavier Llor (local coordinator), Rosa M. Xicola, Marta Piñol, Mercè Rosinach, Anna Roca, Elisenda Pons, José M. Hernández, Miquel A. Gassull; Hospital Universitari Mútua de Terrassa: Fernando Fernández-Bañares (local coordinator), Josep M. Viver, Antonio Salas, Jorge Espinós, Montserrat Forné, Maria Esteve; Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida: Josep M. Reñé (local coordinator), Carmen Piñol, Juan Buenestado, Joan Viñas; Hospital Universitario de Canarias: Enrique Quintero (local coordinator), David Nicolás, Adolfo Parra, Antonio Martín; Hospital Universitario La Fe, Valencia: Lidia Argüello (local coordinator), Vicente Pons, Virginia Pertejo, Teresa Sala; Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba: Antonio Naranjo (local coordinator), María Dolores Giraldez, María del Valle García, Patricia López, Fernando López, Rosa Ortega, Javier Briceño, Javier Padillo; Fundació Hospital Son Llatzer, Palma de Mallorca: Àngels Vilella (local coordinator), Carlos Dolz, Hernan Andreu.

References

1. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polypoid colorectal cancer. *J Med Genet* 1999;36:801–818.
2. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 2001;121:198–213.
3. de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005;4:233–237.
4. Lynch HT, Boland CR, Gong G, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet* 2006;14:390–402.
5. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, et al. Germline mutation of *MSH6* as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17:271–272.
6. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, et al. Heterozygous mutations in *PMS2* cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006;130:312–322.
7. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261–268.
8. Stone JG, Robertson D, Houlston RS. Immunohistochemistry for *MSH2* and *MHL1*: a method for identifying mismatch repair deficient colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2001;54:484–487.
9. Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA, et al. *BRCA1* mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997;336:1409–1415.
10. Parmigiani G, Berry D, Aguilar O. Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes *BRCA1* and *BRCA2*. *Am J Hum Genet* 1998;62:145–158.
11. Balmana J, Stockwell DH, Steyerberg EW, et al. Prediction of *MLH1* and *MSH2* mutations in Lynch syndrome. *JAMA* 2006;296:1469–1478.
12. Barnetson RA, Tenesa A, Farrington SM, et al. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N Engl J Med* 2006;354:2751–2763.
13. Chen S, Wang W, Lee S, et al. Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. *JAMA* 2006;296:1479–1487.

14. Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, et al. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;339:511–518.
15. Pinol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 2005;293:1986–1994.
16. Pinol V, Andreu M, Castells A, et al. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicentre, prospective, nationwide study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:39–45.
17. Xicola RM, Llor X, Pons E, et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:244–252.
18. Llor X, Pons E, Xicola RM, et al. Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res* 2005;11:7304–7310.
19. Benlloch S, Paya A, Alenda C, et al. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagn* 2006;8:540–543.
20. Sauro J, Lewis J. Estimating completion rates from small samples using binomial confidence intervals: comparisons and recommendations. *Proceedings of the human factors and ergonomics society, 49th Annual Meeting* 2005:2100–2104.
21. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005;293:1979–1985.
22. Balaguer F, Castellvi-Bel S, Castells A, et al. Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer: a multicenter, case-control, population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:379–387.
23. Lipton LR, Johnson V, Cummings C, et al. Refining the Amsterdam Criteria and Bethesda Guidelines: testing algorithms for the prediction of mismatch repair mutation status in the familial cancer clinic. *J Clin Oncol* 2004;22:4934–4943.
24. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, et al. *Anticancer Res* 1994;14:1661–1664.
25. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005;352:1851–1860.
26. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787–793.
27. Loughrey MB, Waring PM, Tan A, et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer* 2007;6:301–310.
28. Minoo P, Moyer M, Jass J. Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumourigenesis. *J Pathol* 2007;212:124–133.

Received July 30, 2007. Accepted October 11, 2007.

Address requests for reprints to: Antoni Castells, MD, Department of Gastroenterology, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036-Barcelona, Catalonia, Spain. e-mail: castells@clinic.ub.es; fax: (34) 93 227 93 87.

Francesc Balaguer and Judith Balmaña contributed equally to this work.

All authors in the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association are listed in the Appendix.

Dr Llor's current address is Section of Digestive Diseases and Nutrition, University of Illinois, Chicago, Illinois.

Supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 01/0104, 03/0070, and 05/0071), the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 04-07190 and 07-64873), and the Asociación Española contra el Cáncer. Francesc Balaguer received a research grant from the Hospital Clínic and the Instituto de Salud Carlos III, and Sergi Castellví-Bel is supported by a contract from the Fondo de Investigación Sanitaria. Also supported by the US National Cancer Institute grant CA 113433 (Dr Syngal).

ARTICLE 2

“Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer: a multicenter, case-control, population-based study”

Identification of *MYH* Mutation Carriers in Colorectal Cancer: A Multicenter, Case-Control, Population-Based Study

FRANCESC BALAGUER,* SERGI CASTELLVÍ-BEL,* ANTONI CASTELLS,* MONTSERRAT ANDREU,‡ JENIFER MUÑOZ,* JAVIER P. GISBERT,§ XAVIER LLOR,|| RODRIGO JOVER,¶ RAFAEL DE CID,# VICTÒRIA GONZALO,* XAVIER BESSA,‡ ROSA M. XICOLA,|| ELISENDA PONS,¶ CRISTINA ALENDA,** ARTEMIO PAYÀ,** and JOSEP M. PIQUÉ,* FOR THE GASTROINTESTINAL ONCOLOGY GROUP OF THE SPANISH GASTROENTEROLOGICAL ASSOCIATION††

*Department of Gastroenterology, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clínic, Ciberehd, IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer), University of Barcelona, Barcelona, Catalonia; †Department of Gastroenterology, Hospital del Mar, Barcelona, Catalonia; ‡Department of Gastroenterology, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid; §Department of Gastroenterology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Catalonia; ¶Centre de Regulació Genòmica, Barcelona, Catalonia; ||Department of Gastroenterology and **Department of Pathology, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain. ††All authors are listed in the Appendix

Background & Aims: Whereas it has conclusively been demonstrated that biallelic *MutY human homolog (MYH)* mutations confer a significant risk for colorectal cancer (CRC), the influence of monoallelic mutations remains controversial. Characterization of *MYH*-associated CRC is critical to identify individuals who might benefit from preventive strategies. This prospective, multicenter, case-control, population-based study was aimed at (1) establishing the CRC risk associated with specific germline *MYH* mutations and (2) devising a set of clinical criteria to identify *MYH* carriers among newly diagnosed CRC. **Methods:** Genotyping for Y165C and G382D was performed by TaqMan technology. Single-stranded conformation polymorphism analysis was performed in heterozygotes to screen for mutations in the entire gene. All individuals were re-screened for any additional pathogenic variant. **Results:** Biallelic and monoallelic *MYH* mutations were found in 8 (0.7%) and 19 (1.7%) of 1116 CRC patients, respectively. None of the 934 control subjects carried biallelic mutations, whereas 22 (2.3%) of them were monoallelic carriers. In a meta-analysis including all previous case-control studies, monoallelic *MYH* carriers were not at increased risk for CRC (odds ratio, 1.11; 95% confidence interval, 0.90–1.37), although a significant association was found with the Y165C mutation in either homozygotes or heterozygotes (odds ratio, 1.67; 95% confidence interval, 1.17–2.40). Furthermore, presence of more than 15 synchronous colorectal adenomas or CRC diagnosed before the age of 50 years was the most effective set of criteria for the identification of biallelic *MYH* mutation carriers. **Conclusions:** This study proposes the first set of clinical criteria designed to identify CRC patients with biallelic *MYH* mutations, and it argues against an increased risk for monoallelic carriers.

Although it is assumed that up to 20%–25% of colorectal cancer (CRC) cases develop as a result of inherited genetic factors, known genes predisposing to this malignancy account for less than 5%.¹ Besides the *APC* gene causing familial adenomatous polyposis and the mismatch repair genes responsible for Lynch syndrome, recent studies have identified a new gene involved in hereditary CRC, *MutY human homolog (MYH)*, which encodes a member of the base excision repair system.² This

system is constituted by 3 enzymes (*MYH*, *OGG1*, and *MTH1*) that contribute to protect cells against the mutagenic effects of aerobic metabolism.³ *MYH* is a DNA glycosylase that acts at a third level of defense, being responsible for the removal of adenines mispaired with 8-oxoguanine, one of the most mutagenic DNA products of oxidative DNA damage. Failure to correct these mispairs leads to G:C→T:A transversions in target genes, including *APC*.² Up to now, pathogenic variants in the base excision repair system have been limited to the *MYH* gene, with no unambiguous mutations found in the *MTH1* and *OGG1* genes.^{2,4,5}

Since the first description of the association between the *MYH* gene and CRC in a British family by Al-Tassan et al,² biallelic *MYH* mutations have been consistently found to predispose to an attenuated form of familial adenomatous polyposis. Indeed, germline *MYH* mutations are responsible for as much as 40% of attenuated familial adenomatous polyposis without mutations in the *APC* gene, especially in those cases with a recessive family history.^{4,6} The 2 most common variants in the *MYH* gene are Y165C and G382D missense mutations, both accounting for more than 80% of all *MYH* variants reported in white populations.^{3–5} Other pathogenic variants have been found in different ethnic populations,^{6,7} thus being consistent with founder effects.

Recent studies have demonstrated that biallelic *MYH* gene mutations also predispose to CRC with an autosomal recessive pattern, accounting for up to 1% of these neoplasms.^{8–12} In this setting, biallelic *MYH* mutations have been found to be associated with a 93-fold excess risk of CRC, with an almost complete penetrance at 60 years of age.^{11,13} In contrast, the influence of monoallelic *MYH* mutations on CRC risk remains controversial. Although no single study has found statistically significant evidence,^{9–14} a recent meta-analysis of published data has demonstrated an almost significant heterozygous gene effect (relative risk [RR], 1.3; 95% confidence interval [CI], 1.0–1.7; *P* = .09).¹³ In agreement with this putative association, Farrington

Abbreviations used in this paper: CI, confidence interval; CRC, colorectal cancer; *MYH*, *MutY human homolog*; OR, odds ratio; RR, relative risk; SSCP, single-strand conformation polymorphism.

© 2007 by the AGA Institute
1542-3565/07/\$32.00

doi:10.1016/j.cgh.2006.12.025

et al,¹¹ in the largest population-based case-control study evaluating CRC risk in *MYH* mutation carriers, found an excess risk only for heterozygotes older than the age of 55 years, suggesting that monoallelic *MYH* mutation carriers could be at increased risk later in life. Overall, these discrepancies underscore a weak gene effect, thus needing larger sample sizes, population-based studies, specific-mutation analysis, and proper methodologic approaches such as meta-analysis or kin-cohort studies to ascertain the effect of low-penetrance genes.

Accurate characterization of patients with *MYH*-associated CRC is critical to identify patients who might benefit from genetic testing and, consequently, from specific screening and surveillance strategies. However, little is known about clinical characteristics of patients with *MYH*-associated CRC, especially regarding personal conditions and familial background. In that sense, it has been mentioned that the presence of multiple polyps could constitute a phenotypic marker of *MYH*-associated CRC, but up to 25%–33% of them do not have synchronous adenomas.^{9,11,15} In addition, patients with germline *MYH* mutations are significantly younger than non-mutation carriers.^{9,12,16} Finally, a family history of CRC has also been noticed in some studies^{9,12,16} but not confirmed in others.^{9,12,16} Although all these characteristics have been suggested as potentially useful criteria to select out for *MYH* genetic testing, there is no study evaluating their performance to identify *MYH* mutation carriers among CRC patients in a general population setting.

Here we present a prospective, multicenter, case-control, population-based study, performed within the Epicolon project,^{17,18} which was aimed at (1) establishing the CRC risk associated with specific germline *MYH* mutations and (2) characterizing patients with *MYH*-associated tumors to define a set of recommendations to identify *MYH* mutation carriers among newly diagnosed CRC cases.

Patients and Methods

Study Population

Between November 2000–October 2001, all patients with newly diagnosed CRC in 25 Spanish hospitals were included in the Epicolon project, a clinical epidemiology survey aimed at establishing the incidence and characteristics of hereditary and familial CRC forms in Spain.^{17,18} Nineteen of these 25 centers also agreed to participate in a nested case-control study aimed at evaluating the incidence and characteristics of *MYH*-associated CRC. Patients with familial adenomatous polyposis, germline *APC*, *MSH2* and *MLH1* mutation carriers, or personal history of inflammatory bowel disease, and those who refused to participate in the study were excluded from this analysis. The study was approved by the institutional ethics committee of each participating hospital, and written informed consent was obtained from all patients.

Demographic, clinical, and tumor-related characteristics of probands, as well as a detailed family history, were obtained.¹⁷ Pedigrees were traced backward and laterally as far as possible or at least up to second-degree relatives, regarding cancer history. Age at cancer diagnosis, type, location, and tumor stage of the neoplasm, and current status were registered for each affected family member.

Tissue samples from tumor and normal colonic mucosa were obtained from each patient, immediately frozen in liquid nitro-

gen, and stored at -70°C until use. In cases without frozen tissue, formalin-fixed, paraffin-embedded samples were used. Genomic DNA was isolated by using the QiaAmp Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

As part of the Epicolon project, microsatellite instability testing and immunostaining for DNA mismatch repair proteins were performed in all patients regardless of age, personal and family history, and tumor characteristics, as described elsewhere.¹⁷ Patients found to have tumors with microsatellite instability and/or lack of protein expression underwent germline genetic testing for *MSH2* and *MLH1*. In addition, patients with more than 15 synchronous colorectal adenomas also underwent germline *APC* gene testing. As mentioned above, cases with mutations in these genes were excluded from the present analysis.

Age- and sex-matched control subjects with no personal history of cancer at the time of ascertainment were recruited from a large cohort of individuals attending the outpatient clinics of orthopedic surgery departments of participating institutions. Information on family history of colorectal neoplasia or previous colonoscopy reports was not available for these subjects. Genomic DNA was obtained from peripheral blood samples.

Germline *MYH* Gene Mutation Analysis

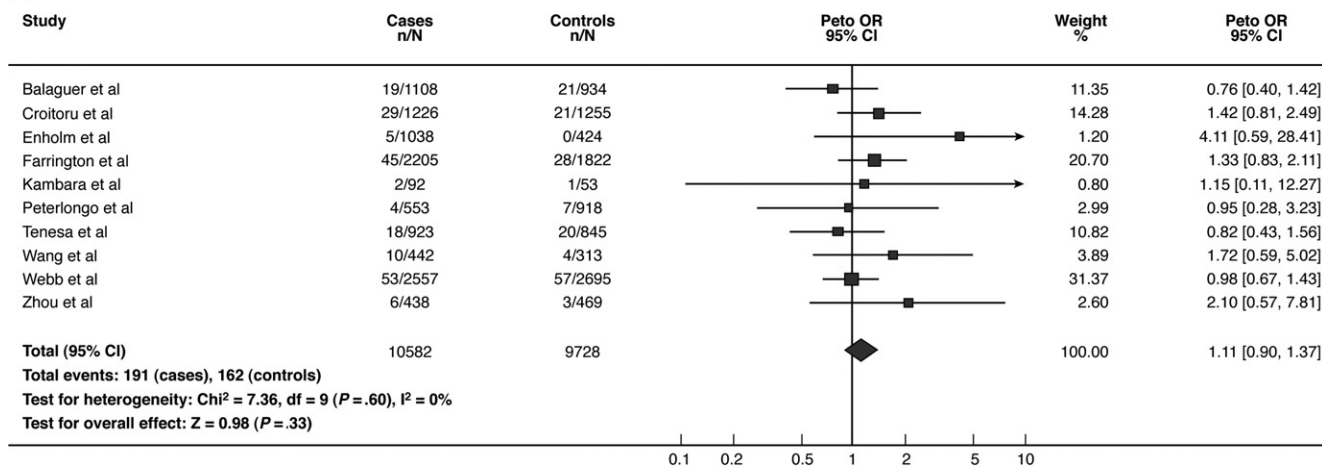
A 3-stage approach was performed to identify individuals carrying heterozygous or homozygous variants in the *MYH* gene (GenBank accession number NM_012222). First, we screened for the 2 most common mutations, Y165C and G382D, by allelic discrimination with allele-specific TaqMan probes and resolved on a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Second, in heterozygotes for the Y165C or G382D mutations, the coding region and exon-intron boundaries of the entire *MYH* gene were screened by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Primer details are available on request. Samples with abnormal band shifts were sequenced in forward and reverse orientations by using the BigDye terminator v31 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). With this approach, we identified all homozygotes or compound heterozygotes of any subjects in whom at least one allele was either Y165C or G382D. In addition, to minimize the probability of underdetecting individuals with other mutations, CRC patients with more than 15 synchronous adenomas were also evaluated by SSCP, although no mutation was found by the previous approach. Third, all CRC patients and control subjects were re-screened for any pathogenic variant found in the SSCP analysis by allelic discrimination with allele-specific TaqMan probes.

To allow comparison of our results, we used the *MYH* sequence used by previous authors (GenBank accession number U63329) for the G382D, Y165C, 1103delC, and 1186_1187insGG mutations, instead of the actual reference sequence (GenBank accession number NM_012222), which has 11 additional codons in exon 3, resulting in changes in numbering all variants (G393D, Y176C, 1138delC, and 1220_1221insGG, respectively).

Statistical Analysis

To test the association between the *MYH* gene and CRC risk, odds ratios (ORs) and 95% CIs were calculated for each genotype.¹⁹ Because of the low frequency of some variants, the

A



B

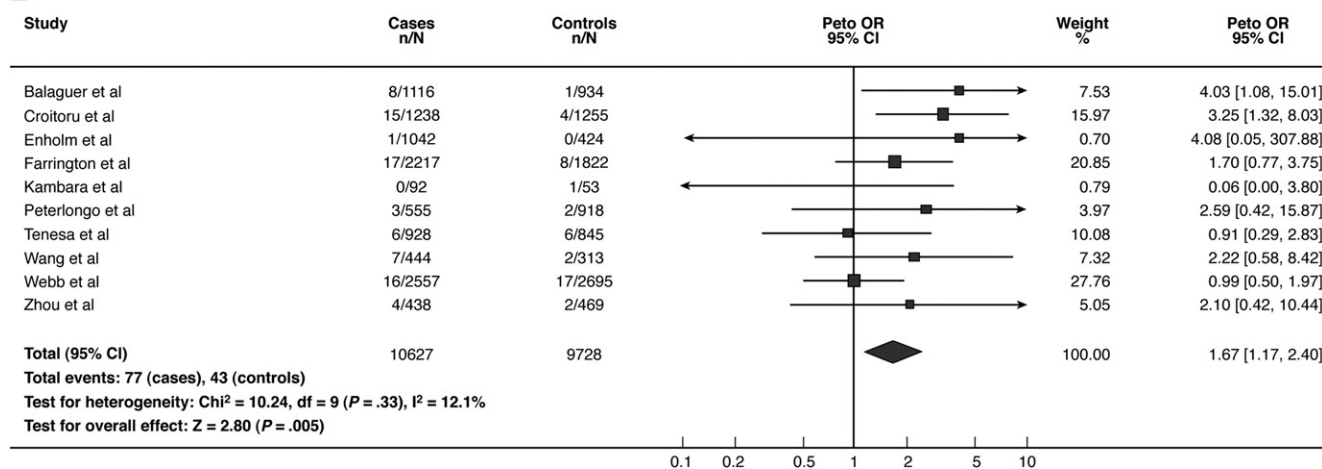


Figure 1. Meta-analysis of case-control studies evaluating the risk of CRC associated with MYH gene mutations. *Top panel*, monoallelic G382D or Y165C mutation carriers; *bottom panel*, Y165C mutation carriers, in homozygotes or heterozygotes.

analysis of individual allele effects was limited to the G382D and Y165C mutations. Analyses were done for biallelic, monoallelic, and any mutation carriers.

A meta-analysis including all previous case-control studies evaluating the CRC risk associated to the Y165C and G382D MYH mutations was performed (Figure 1). The homogeneity of effects throughout studies was appraised by using a homogeneity test based on the χ^2 test. Because of the low power of this test, a minimum cutoff P value of .1 was established as a threshold of homogeneity, lower values indicating heterogeneity. In addition, the I² statistic was calculated to assess the impact of heterogeneity on the results. This statistic describes the percentage of the variability and in effect estimates that it is due to heterogeneity rather than sampling error (chance). A value >50% might be considered substantial heterogeneity. Meta-analysis was performed by combining OR of the individual studies in a global OR, under the assumption-free model (or fixed effects model). We chose to use the fixed effects model to obtain more precision on the estimates, because the CIs are narrower than with the random effects model. Significance and 95% CI were provided for the combined OR. The analysis was performed for monoallelic and any mutation carriers. All cal-

culations were performed with the freeware program Review Manager 4.2.8 developed by the Cochrane Collaboration (Copenhagen, Denmark).

To identify personal and/or familial characteristics associated with the presence of germline MYH mutations, univariate and multivariate analyses were performed with respect to biallelic, monoallelic, and any mutation carriers. For the univariate analysis, categorical variables were compared by the χ^2 test, applying the Yates correction when needed, and continuous variables by the Student t test. Variables achieving a P value of less than .1 were subsequently included in the multivariate analysis by using a stepwise backward logistic regression procedure to identify independent predictors of germline MYH mutations.

Performance characteristics (sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, and overall accuracy) of each independent variable selected in the multivariate analysis and their combination were calculated with respect to the presence of MYH mutations.

Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation. All P values were two sided, and a value less than .05 was considered statistically significant. Calculations were

Table 1. Characteristics of the 1116 Patients With CRC

Characteristics	
Age (y) ^a	70.0 ± 11.4
Gender, n (%)	
Female	461 (41.3)
Site of tumor, n (%)	
Proximal to splenic flexure	313 (28.0)
TNM tumor stage, ^b n (%)	
I	132 (11.8)
II	464 (41.6)
III	297 (26.6)
IV	185 (16.6)
Synchronous CRC, n (%)	58 (5.2)
Synchronous colorectal adenomas, n (%)	298 (26.7)
Past history of CRC, n (%)	14 (1.3)
Past history of any non-colorectal neoplasia, n (%)	96 (8.6)
Family history of CRC, ^c n (%)	184 (16.5)

^aExpressed as mean ± standard deviation.

^bReferred to 1078 CRC patients.

^cReferred to first- and/or second-degree relatives.

performed with the SPSS software version 11.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

During the study period, 1978 patients with newly diagnosed CRC were included in 25 centers. One hundred seventeen patients were excluded because tumor developed in the context of familial adenomatous polyposis (n = 11) or inflammatory bowel disease (n = 14), germline *MSH2* and *MLH1* gene mutations (n = 11), patients did not consent to participate in the study (n = 32), or incomplete family history (n = 49). Of the remaining 1861 eligible patients, 1116 were diagnosed in centers agreeing to participate in the nested case-control study aimed at evaluating the incidence and characteristics of *MYH*-associated CRC. Characteristics of this group of

patients (Table 1) did not differ from the whole series.¹⁸ Simultaneously, 934 control subjects were also included.

Germline *MYH* Mutations

Biallelic *MYH* mutations were found in 8 (0.7%) CRC patients. In addition to the G382D and Y165C missense mutations, we identified 2 additional, previously described, pathogenic mutations^{4,20,21} (1103delC and 1186_1187insGG) in 3 patients (Table 2). Monoallelic *MYH* mutations were identified in 19 (1.7%) CRC patients, 15 for the G382D mutation and 4 for the Y165C mutation.

None of the 934 control subjects carried biallelic mutations, whereas 22 (2.3%) of them were monoallelic carriers, 20 for the G382D mutation, 1 for the Y165C mutation, and 1 for the 1186_1187insGG mutation (Table 2).

Two previously reported *MYH* non-pathogenic variants,² Q324H and V22M, were found in 7 (0.6%) and 2 (0.2%) CRC patients, respectively, who were either heterozygotes for the Y165C or G382D mutations (n = 5) or had more than 15 synchronous colorectal adenomas (n = 4). In the control group, the V22M and Q324H variants along with a previously reported non-pathogenic polymorphism²⁰ (IVS11-9C→T) were identified in 3, 4, and 1 heterozygotes for the Y165C or G382D mutations, respectively.

Demographic, phenotypic, and familial characteristics of patients with germline *MYH* mutations are shown in Table 3.

Colorectal Cancer Risk Associated With *MYH* Mutations

Biallelic *MYH* mutation carriers had an unequivocal increased CRC risk in relation to non-mutation carriers ($P < .009$). Quantification of this risk was not feasible because no control subject was homozygote for any *MYH* mutation (Table 2).

On the contrary, monoallelic *MYH* mutations were not associated with an increased risk of developing CRC (OR, 0.72; 95% CI, 0.39–1.33; $P = .30$) (Table 2). An almost identical result

Table 2. Risk of CRC Associated With Germline *MYH* Mutations

	Cases (n = 1116)	Controls (n = 934)	OR (95% CI)
Non-mutation carriers, n (%)	1089 (97.5)	913 (97.8)	1 (reference)
Biallelic mutation carriers, n (%)	8 (0.7)	0 (-)	NA
Y165C/Y165C	2 (0.2)	0 (-)	NA
Y165C/G382D	2 (0.2)	0 (-)	NA
G382D/G382D	1 (0.1)	0 (-)	NA
G382D/1103delC	1 (0.1)	0 (-)	NA
1186_1187insGG/1186_1187insGG	2 (0.2)	0 (-)	NA
Monoallelic mutation carriers, n (%)	19 (1.7)	22 (2.3)	0.72 (0.39–1.33) ^a
Y165C/-	4 (0.4)	1 (0.1)	3.35 (0.50–22.30) ^b
G382D/-	15 (1.3)	20 (2.1)	0.63 (0.32–1.22) ^c
1186_1187insGG/-	0 (-)	1 (0.1)	NA
Any mutation carriers, n (%)	27 (2.4)	22 (2.3)	1.03 (0.58–1.80)
Y165C	8 (0.7)	1 (0.1)	6.70 (1.08–41.30) ^d
G382D	19 (1.7)	20 (2.2)	0.79 (0.42–1.48) ^d

NA, not applicable.

^aExcluding biallelic carriers.

^bExcluding biallelic and monoallelic G382D mutation carriers.

^cExcluding biallelic and monoallelic Y165C mutation carriers.

^dExcluding other mutation carriers.

Table 3. Demographic, Phenotypic, and Familial Features of CRC Patients With Germline MYH Mutations

ID	Age (y)	Sex	Mutation 1	Mutation 2	Other nonpathogenic variants	Synchronous adenomas (n)	Synchronous CRC	Previous non-CRC (age at diagnosis, y)	Family history of any neoplasia (age at diagnosis, y)
27010	69	F	Y165C	Y165C	—	Yes (50)	No	No	No
1057	47	F	Y165C	Y165C	—	Yes (1)	No	No	Father: stomach (61)
13054	64	F	Y165C	G382D	—	Yes (1)	No	No	Brother: CRC (49); aunt: endometrial (60)
3007	49	M	Y165C	G382D	—	Yes (25)	Yes	Sarcoma (47)	No
1055	73	M	G382D	G382D	—	Yes (20)	Yes	No	No
12079	45	M	G382D	1103delC	—	No	No	No	No
12014	69	F	1186_1187insGG	1186_1187insGG	—	No	No	Breast (59)	Cousin: CRC (40)
12016	45	F	1186_1187insGG	1186_1187insGG	—	Yes (70)	No	No	No
28037	65	M	Y165C	—	Q324H	No	No	No	No
13028	64	M	Y165C	—	—	No	No	No	Uncle: polyps
20005	69	F	Y165C	—	—	No	No	No	No
24057	76	M	Y165C	—	—	No	No	No	No
9020	78	M	G382D	—	Q324H	Yes (1)	Yes	No	No
26035	53	M	G382D	—	Q324H	No	No	No	No
9072	82	M	G382D	—	V22M	Yes (1)	No	No	Father: stomach (71); sister: CRC (73)
6029	76	F	G382D	—	—	No	No	No	No
7075	83	M	G382D	—	—	Yes (5)	No	No	No
7081	81	F	G382D	—	—	No	No	No	Brother: stomach (64)
13062	76	F	G382D	—	—	No	No	No	No
12090	60	M	G382D	—	V22M	No	No	No	Mother: CRC (71); cousin: CRC (95)
12052	79	F	G382D	—	—	No	No	No	Sister: ovarian (71)
3008	56	F	G382D	—	—	No	No	No	Mother: stomach (67)
5063	50	M	G382D	—	—	Yes (64)	Yes	No	No
12107	73	F	G382D	—	—	No	No	No	No
13051	75	F	G382D	—	—	No	No	No	Brother: liver (78)
15025	76	M	G382D	—	—	No	No	No	Brother: lung (41)
5062	85	F	G382D	—	—	No	No	No	No

was obtained when the analysis was performed in the subset of individuals older than 55 years of age (OR, 0.68; 95% CI, 0.33–1.38; $P = .29$). However, in the whole series, the monoallelic effect was much larger for Y165C carriers (OR, 3.35; 95% CI, 0.50–22.30; $P = .38$) than for G382D carriers (OR, 0.63; 95% CI, 0.32–1.22; $P = .16$) (Table 2), although this difference was not statistically significant (OR, 5.33; 95% CI, 0.70–38.40; $P = .17$).

To further explore mutation-specific effects in CRC risk, we estimated this correlation for each individual MYH mutation in either homozygotes or heterozygotes. In this analysis, the Y165C mutation was significantly associated with an increased risk of developing CRC (OR, 6.70; 95% CI, 1.08–41.30; $P = .046$), whereas this correlation was not observed for the G382D mutation (OR, 0.79; 95% CI, 0.42–1.48; $P = .45$).

To date, 9 case-control studies have reported the frequency of Y165C and G382D MYH mutations.^{9–13,15,22–24} To further explore the risk associated with monoallelic carriers, we performed a meta-analysis pooling our data with those from previous studies, providing information on 10,627 cases and 9728 controls (Figure 1). The OR for monoallelic carriers was 1.11 (95% CI, 0.90–1.37), whereas the ORs associated with monoal-

lelic G382D or Y165C mutations were 1.10 (95% CI, 0.86–1.40) and 1.24 (95% CI, 0.83–1.84), respectively. When the analysis was extended to specific MYH mutations in either homozygotes or heterozygotes, we found a statistically significant risk for CRC associated with the Y165C mutation (OR, 1.67; 95% CI, 1.17–2.40), whereas the risk associated with the G382D mutation was almost significant (OR, 1.27; 95% CI, 1.00–1.61).

Individual and Familial Features Associated With MYH Mutations

Patients with CRC and biallelic MYH mutations were younger ($P = .002$), and they more frequently had tumors located in the proximal colon ($P = .04$), synchronous CRC ($P = .05$), and synchronous colorectal adenomas ($P = .006$) than non-mutation carriers (Table 4). However, 2 of the 8 (25%) biallelic carriers did not have adenomas at CRC diagnosis, and only 4 of them (50%) had more than 15 synchronous adenomas. Regarding familial characteristics, there were no differences between biallelic mutation carriers and those without MYH mutations in any of the evaluated parameters (Table 5). When variables identified in the univariate analysis were included in a logistic regression model, CRC diagnosis before 50 years of age

Table 4. Individual Characteristics of CRC Patients With Germline *MYH* Mutations (Univariate Analysis)

	Non-mutation carriers (n = 1089)	Biallelic mutation carriers (n = 8)	P value	Monoallelic mutation carriers (n = 19)	P value	Y165C mutation carriers (n = 8)	P value	Any mutation carriers (n = 27)	P value
Age (y) ^a	70.1 ± 11.3	57.7 ± 2.2	.002	71.3 ± 10.5	.65	62.8 ± 11.3	.07	67.3 ± 12.5	.20
Age, n (%)			.001		1		.07		.02
>50 y	1029 (94.5)	4 (50.0)		18 (94.7)		6 (75.0)		22 (81.5)	
<50 y	60 (5.5)	4 (50.0)		1 (5.3)		2 (25.0)		5 (18.5)	
Gender, n (%)			.28		.64		.72		.26
Male	642 (59.0)	3 (37.5)		10 (52.6)		4 (50.0)		13 (48.1)	
Female	447 (41.0)	5 (62.5)		9 (47.4)		4 (50.0)		14 (51.9)	
Site of tumor, n (%)			.04		.79		.008		.13
Proximal to splenic flexure	301 (27.6)	5 (62.5)		6 (31.6)		6 (75.0)		11 (40.7)	
Distal to splenic flexure	788 (72.4)	3 (37.5)		13 (68.4)		2 (25.0)		16 (59.3)	
TNM tumor stage, ^b n (%)			.31		.81		.74		.42
I-II	579 (55.1)	6 (75.0)		11 (57.9)		5 (62.5)		17 (63.0)	
III-IV	472 (44.9)	2 (25.0)		8 (42.1)		3 (37.5)		10 (37.0)	
Degree of differentiation, ^c n (%)			.12		.27		.66		.07
Poor	241 (24.4)	4 (57.1)		7 (38.9)		1 (16.7)		11 (44.0)	
Moderate	670 (67.8)	3 (42.9)		9 (50.0)		5 (83.3)		12 (48.0)	
Well	77 (7.8)	0 (-)		2 (11.1)		0 (-)		2 (8.0)	
Mucinous CRC, ^c n (%)			.59		.06		.16		.11
Yes	118 (11.9)	1 (14.3)		5 (27.8)		2 (33.3)		6 (24.0)	
No	870 (88.1)	6 (85.7)		13 (72.2)		4 (66.7)		19 (76.0)	
Previous CRC, n (%)	14 (1.3)	0 (-)	1.00	0 (-)	1.00	0 (-)	1.00	0 (-)	1.00
Previous colorectal adenomas, n (%)	20 (1.8)	1 (12.5)	.14	0 (-)	1.00	0 (-)	1.00	1 (3.7)	.40
Previous colorectal neoplasia, n (%)	29 (2.7)	1 (12.5)	.20	0 (-)	1.00	0 (-)	1.00	1 (3.7)	.52
Previous non-colorectal neoplasia, n (%)	108 (9.9)	2 (25.0)	.19	0 (-)	.24	1 (12.5)	.57	2 (7.4)	1.00
Synchronous CRC, n (%)	54 (5.0)	2 (25.0)	.059	2 (10.5)	.25	1 (12.5)	.34	4 (14.8)	.04
Synchronous colorectal adenomas, n (%)	288 (26.5)	6 (75.0)	.006	4 (21.1)	.79	4 (50.0)	.22	10 (37.0)	.22
More than 15 synchronous colorectal adenomas, n (%)	9 (0.8)	4 (50.0)	.001	1 (5.3)	.16	2 (25.0)	.002	5 (18.5)	.001
Synchronous colorectal neoplasia, n (%)	307 (28.2)	6 (75.0)	.008	4 (21.1)	.49	4 (50.0)	.23	10 (37.0)	.31

^aExpressed as mean ± standard deviation.

^bReferred to 1078 CRC patients.

^cReferred to 1013 CRC patients. Mucinous carcinoma type was defined by the presence of more than 50% mucinous carcinoma cells.

(RR, 9.68; 95% CI, 1.81–51.63; $P = .008$) and presence of more than 15 synchronous colorectal adenomas (RR, 49.94; 95% CI, 9.38–265.93; $P < .0001$) were independently associated with biallelic mutation carriers.

Monoallelic *MYH* mutation carriers did not significantly differ from non-mutation carriers in any evaluated individual or familial characteristics (Tables 4 and 5).

On the basis of the observation that the Y165C mutation could confer a higher CRC risk compared with the G382D mutation, we evaluated individual and familial features of Y165C mutation carriers (Tables 4 and 5). Indeed, patients who were homozygotes or heterozygotes for this mutation were younger ($P = .07$), they more frequently had tumors located in the proximal colon ($P = .008$) and more than 15 synchronous colorectal adenomas ($P = .002$) than non-mutation carriers. The logistic regression analysis identified tumor location (RR, 6.76; 95% CI, 1.33–34.44; $P = .02$) and presence of more than 15 synchronous colorectal adenomas (RR, 22.12; 95% CI, 3.80–

128.72; $P = .001$) as parameters independently associated with Y165C mutation carriers.

Finally, when the analysis was repeated regarding carriers of any *MYH* mutation, these patients more frequently had more synchronous CRC ($P = .04$) and more than 15 synchronous colorectal adenomas ($P = .001$) than non-mutation carriers (Tables 4 and 5). The logistic regression analysis identified the presence of more than 15 colorectal adenomas (RR, 27.27; 95% CI, 8.45–88.04; $P < .0001$) as the only independent predictor of any mutation carriers.

Performance Characteristics and Efficiency of Clinical Criteria for the Identification of *MYH* Mutation Carriers

To define clinical criteria for selecting patients who should be submitted to *MYH* genetic testing, variables independently associated with germline *MYH* mutations were considered as putative strategies. Performance characteristics of each

Table 5. Familial Characteristics of CRC Patients With Germline MYH Mutations (Univariate Analysis)

	Non-mutation carriers (n = 1089)	Biallelic mutation carriers (n = 8)	P value	Monoallelic mutation carriers (n = 19)	P value	Y165C mutation carriers (n = 8)	P value	Any mutation carrier (n = 27)	P value
FDR or SDR with CRC, n (%)	181 (16.6)	1 (12.5)	1.00	2 (10.5)	.75	1 (12.5)	1.00	3 (11.1)	.60
FDR or SDR with CRC or other related malignancies, ^a n (%)	330 (30.3)	2 (25.0)	1.00	6 (31.6)	.90	3 (37.5)	.70	8 (29.6)	.94
FDR or SDR with CRC diagnosed <50 y, n (%)	31 (2.8)	1 (12.5)	.21	0 (-)	1.00	1 (12.5)	.21	1 (3.7)	.55
FDR or SDR with CRC or other related malignancies ^a diagnosed <50 y, n (%)	68 (6.2)	1 (12.5)	.40	0 (-)	.62	1 (12.5)	.41	1 (3.7)	1.00
FDR with CRC, n (%)	149 (13.7)	1 (12.5)	1.00	2 (10.5)	1.00	1 (12.5)	1.00	3 (11.1)	1.00
FDR with CRC or other related malignancies, n (%)	265 (24.3)	2 (25.0)	1.00	5 (26.3)	.79	3 (37.5)	.41	7 (25.9)	.85
FDR with CRC diagnosed <50 y, n (%)	27 (2.5)	0 (-)	1.00	0 (-)	1.00	0 (-)	1.00	0 (-)	1.00
FDR with CRC or other related malignancies diagnosed <50 y, n (%)	52 (4.8)	1 (12.5)	.33	0 (-)	1.00	1 (12.5)	.33	1 (3.7)	1.00

FDR, first-degree relative; SDR, second-degree relative.

^aRelated malignancies include endometrial, gastric, ovarian, hepatobiliary, small bowel, brain, renal pelvis, and ureter.

individual parameter and their combination for the identification of biallelic mutation carriers are shown in Table 6. Whereas presence of more than 15 synchronous colorectal adenomas was the single, more discriminative feature, addition of CRC diagnosed before the age of 50 years to this variable was the most effective set of criteria for the identification of biallelic MYH mutation carriers (RR, 45.80; 95% CI, 10.35–202.13; *P* < .0001), with a sensitivity of 75% and a positive predictive value of 8.1% (Table 6).

Discussion

This study represents the first reported attempt to define a set of recommendations for the identification of MYH mutation carriers among patients with newly diagnosed CRC. Indeed, results of this investigation indicate that patients with CRC and more than 15 synchronous colorectal adenomas or younger than 50 years might benefit from MYH genetic testing because of the high probability of carrying a germline mutation in this gene. In addition, this study argues against an increased CRC risk for monoallelic carriers and suggests a mutation-specific effect, with a stronger pathogenicity of the Y165C mutation compared with the G382D mutation.

The strength of this study relies on the fact that it was performed on a general population basis, it involved a large series of well-characterized patients regarding individual phenotype, family history, and tumor molecular profile,¹⁷ and it adequately matched control subjects. We are aware, however, that the relatively low number of some specific MYH variants, especially in the case of the Y165C mutation, might constitute a drawback of the study, thus precluding demonstrating unequivocally the association between monoallelic gene mutations and CRC risk.

Association between biallelic germline MYH mutations and CRC has been conclusively established during the last few years.^{9,11,15} However, clinical criteria to identify those patients carrying this genetic alteration have not been defined so far. In

a previous non-population-based study involving 444 patients with CRC and 140 individuals referred for APC analysis in whom germline mutation was not found, both presence of multiple polyps and early-onset cancer were suggested as potential criteria to drive MYH genetic testing.^{9,11,15} However, it has been argued that presence of polyps could be a quite insensitive phenotypic marker because up to one third of these patients did not have synchronous lesions.^{9,11} Similarly, data on the predictive value of family history of CRC have also resulted in some conflicting results.^{9,12,16} The lack of agreement with respect to clinical recommendations for indicating MYH genetic testing probably reflects the absence of prospective analyses specifically designed for this purpose.

The present population-based study confirms that the presence of more than 15 synchronous colorectal adenomas and tumor diagnosis before 50 years of age are independent predictors of biallelic MYH mutations, and it provides evidence of their effectiveness. In fact, performance characteristics of this

Table 6. Performance Characteristics of Clinical Criteria for the Identification of Biallelic MYH Mutation Carriers^a

Criteria	Biallelic MYH mutations				
	Se	Sp	PPV	NPV	OA
CRC diagnosed <50 y	50.0	94.0	6.1	99.6	94.1
Presence of >15 synchronous colorectal adenomas	50.0	99.0	28.5	99.6	98.7
CRC diagnosed <50 y or presence of >15 synchronous colorectal adenomas	75.0	93.8	8.1	99.8	93.7

Se, sensitivity; Sp, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; OA, overall accuracy.

^aResults are expressed in percentage.

set of recommendations indicate that they are the most accurate clinical criteria tested so far for the identification of *MYH* mutation carriers among CRC patients, with a sensitivity of 75% and a positive predictive value of 8%. It is important to note that application of these parameters to previous studies has resulted in similar figures,^{9,12} thus minimizing the possibility of potential differences because of geographical variations. Unfortunately, the relatively low number of mutations identified in this study precluded the performance of an internal validation following a split-sample approach.

Interestingly, family history of CRC or other malignancies was not associated with germline *MYH* mutations. This circumstance was suggested in a previous study, in which biallelic and monoallelic carriers were more likely to have first-degree or second-degree relatives with CRC (RR, 1.54; 95% CI, 1.10–2.16).⁹ Similarly, Jo et al¹⁶ indicated that 7 of 9 patients with biallelic *MYH* mutations seen in a high-risk gastrointestinal cancer clinic reported family histories consistent with the hereditary nonpolyposis CRC syndrome. Although differences in the study population might explain these somehow contradictory results, it is important to point out that the suspected diagnosis of Lynch syndrome in all those 7 patients was mainly based on the fulfillment of criterion number 1 of the revised Bethesda guidelines, ie, CRC before age 50 years,¹⁶ thus reinforcing the usefulness of our set of recommendations.

The causative involvement of monoallelic *MYH* mutations in the pathogenesis of this neoplasm remains controversial. In fact, although a recent meta-analysis^{9,10,13} and a kin-cohort study⁸ have suggested an increased CRC risk in heterozygotes, no single case-control study has demonstrated it.^{8–13} The present study was also underpowered to confirm such association, but it provided additional information to ascertain the effect of low-penetrance variants. Indeed, we conducted a meta-analysis including all previous case-control studies, generating nearly 11,000 cases and 10,000 controls, and its results suggest a lack of CRC risk for monoallelic carriers. However, when we performed a mutation-specific analysis, both our series and the meta-analysis showed that the Y165C mutation (either in homozygotes or heterozygotes) was associated with a higher probability of CRC compared with the G382D mutation. This mutation-specific effect on CRC risk is consistent with results from *in vitro* assays in which the effective adenine glycosylase activity of the Y165C variant was much more compromised than that corresponding for the G382D mutation.^{2,25}

The lack of association of CRC risk and monoallelic carrier status found in our study is in agreement with the largest survey performed so far²³ but in contrast with other previous population-based studies.^{9,11} Although methodologic biases cannot be ruled out, these discrepancies are probably due to population differences and underscore the need for more well-conducted population-based studies to better determine the risk for monoallelic carriers. In that sense, our results argue against an increased CRC risk in this setting, on the basis of both the meta-analysis and the fact that monoallelic carriers do not differ from non-mutation carriers in any evaluated clinical characteristics. However, future investigations should take into account the possible mutation-specific effect to confirm our observation.

Characterization of an inherited disorder predisposing to CRC might have noteworthy clinical implications regarding treatment, surveillance, and screening. Regarding the therapeutic

management of *MYH*-associated CRC, it is tempting to suggest a similar approach for individuals with familial adenomatous polyposis because of the high probability of developing synchronous colorectal lesions. Similarly, surveillance strategies in patients submitted to partial colectomy should take into account the putative propensity to develop metachronous lesions. Screening recommendations for biallelic and monoallelic carriers are more uncertain and clearly claim for further studies assessing the natural history of this inherited disorder. For this purpose, identification of individuals with germline *MYH* mutations is the obvious first step, and, accordingly, clinical criteria proposed in this study (ie, patients with CRC and more than 15 synchronous colorectal adenomas or diagnosed before the age of 50 years) might be a relevant contribution. Screening for the most common mutations, which might differ depending on the population, could be performed with TaqMan technology, followed by analysis of the entire gene by using SSCP or denaturing high-performance liquid chromatography in heterozygotes. If replication studies validate this set of recommendations, systematic application of them could allow the detection of the majority of biallelic carriers and, consequently, a vast amount of obligate monoallelic carriers among first-degree relatives, thus providing the opportunity to better ascertain CRC risk in such individuals.

Appendix

Investigators From the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association Who Participated in the Study

Hospital 12 de Octubre, Madrid: Juan Diego Morillas (local coordinator), Raquel Muñoz, Marisa Manzano, Francisco Colina, Jose Díaz, Carolina Ibarrola, Guadalupe López, Alberto Ibáñez; Hospital Clínic, Barcelona: Antoni Castells (local coordinator), Virginia Piñol, Sergi Castellví-Bel, Francisco Rodríguez-Moranta, Francesc Balaguer, Antonio Soriano, Rosa Cuadrado, Maria Pellisé, Rosa Miquel, J. Ignasi Elizalde, Josep M. Piqué; Hospital Clínico Universitario, Zaragoza: Ángel Lanás (local coordinator), Javier Alcedo, Javier Ortego; Hospital Cristal-Piñor, Complejo Hospitalario de Ourense: Joaquín Cubiella (local coordinator), Ma Soledad Díez, Mercedes Salgado, Eloy Sánchez, Mariano Vega; Hospital del Mar, Barcelona: Montserrat Andreu (local coordinator), Xavier Bessa, Agustín Panadés, Asumpta Muní, Felipe Bory, Miguel Nieto, Agustín Seoane; Hospital Donosti, San Sebastián: Luis Bujanda (local coordinator), Juan Ignacio Arenas, Isabel Montalvo, Julio Torrado, Ángel Cosme; Hospital General Universitario de Alicante: Artemio Payá (local coordinator), Rodrigo Jover, Juan Carlos Penalva, Cristina Alenda; Hospital General de Granollers: Hospital General de Vic: Joan Saló (local coordinator), Eduard Batiste-Alentorn, Josefina Autonell, Ramon Barniol; Hospital General Universitario de Guadalajara: Ana María García (local coordinator), Fernando Carballo, Antonio Bienvenido, Eduardo Sanz, Fernando González, Jaime Sánchez; Hospital General Universitario de Valencia: Enrique Medina (local coordinator), Jaime Cuquerella, Pilar Canelles, Miguel Martorell, José Ángel García, Francisco Quiles, Elisa Orti; Hospital do Meixoeiro, Vigo: Juan Clofent (local coordinator), Jaime Seoane, Antoni Tardío, Eugenia Sanchez; Hospital San Eloy, Baracaldo: Luis Bujanda (local coordinator), Carmen Muñoz, María del Mar Ramírez,

Araceli Sánchez; Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona: Xavier Llor (local coordinator), Elisenda Pons, Rosa M. Xicola, Marta Piñol, Mercè Rosinach, Anna Roca, José M. Hernández, Miquel A. Gassull; Hospital Universitari Mútua de Terrassa: Fernando Fernández-Bañares (local coordinator), Josep M. Viver, Antonio Salas, Jorge Espinós, Montserrat Forné, Maria Esteve; Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida: Josep M. Reñé (local coordinator), Carmen Piñol, Juan Buenestado, Joan Viñas; Hospital Universitario de Canarias: Enrique Quintero (local coordinator), David Nicolás, Adolfo Parra, Antonio Martín; Hospital Universitario La Fe, Valencia: Lidia Argüello (local coordinator), Vicente Pons, Virginia Pertejo, Teresa Sala; Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba: Antonio Naranjo (local coordinator), María del Valle García, Patricia López, Fernando López, Rosa Ortega, Javier Briceño, Javier Padillo.

References

- Burt R, Neklason DW. Genetic testing for inherited colon cancer. *Gastroenterology* 2005;128:1696–1716.
- Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002;30:227–232.
- Cheadle JP, Sampson JR. Exposing the MYH about base excision repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet* 2003;12:R159–R165.
- Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003;348:791–799.
- Jones S, Emmerson P, Maynard J, et al. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C→T:A mutations. *Hum Mol Genet* 2002;11:2961–2967.
- Sampson JR, Dolwani S, Jones S, et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003;362:39–41.
- Gismondi V, Meta M, Bonelli L, et al. Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer* 2004;109:680–684.
- Jenkins MA, Croitoru ME, Monga N, et al. Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MYH mutations: a population-based case-family study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:312–314.
- Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, et al. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1631–1634.
- Peterlongo P, Mitra N, Chuai S, et al. Colorectal cancer risk in individuals with biallelic or monoallelic mutations of MYH. *Int J Cancer* 2005;114:505–507.
- Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, et al. Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am J Hum Genet* 2005;77:1.
- Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A, et al. Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol* 2003;163:827–832.
- Tenesa A, Campbell H, Barnetson R, et al. Association of MUTYH and colorectal cancer. *Br J Cancer* 2006;95:239–242.
- Fleischmann C, Peto J, Cheadle J, et al. Comprehensive analysis of the contribution of germline MYH variation to early-onset colorectal cancer. *Int J Cancer* 2004;109:554–558.
- Wang L, Baudhuin LM, Boardman LA, et al. MYH mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps. *Gastroenterology* 2004;127:9–16.
- Jo WS, Bandipalliam P, Shannon KM, et al. Correlation of polyp number and family history of colon cancer with germline MYH mutations. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:1022–1028.
- Piñol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 2005;293:1986–1994.
- Piñol V, Andreu M, Castells A, et al. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicenter, prospective, nation-wide study—Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:39–45.
- Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. New York: John Wiley & Sons, 1981.
- Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, et al. MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 2006;119:807–814.
- Isidro G, Laranjeira F, Pires A, et al. Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum Mutat* 2004;24:353–354.
- Kambara T, Whitehall VL, Spring KJ, et al. Role of inherited defects of MYH in the development of sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:1–9.
- Webb EL, Rudd MF, Houlston RS. Colorectal cancer risk in monoallelic carriers of MYH variants. *Am J Hum Genet* 2006;79:768–771.
- Zhou XL, Djureinovic T, Werelius B, et al. Germline mutations in the MYH gene in Swedish familial and sporadic colorectal cancer. *Genet Test* 2005;9:147–151.
- Pope MA, Chmiel NH, David SS. Insight into the functional consequences of hMYH variants associated with colorectal cancer: distinct differences in the adenine glycosylase activity and the response to AP endonucleases of Y150C and G365D murine MYH. *DNA Repair (Amst)* 2005;4:315–325.

Address requests for reprints to: Antoni Castells, MD, Department of Gastroenterology, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain. e-mail: castells@clinic.ub.es; fax: +34-93-227-93-87.

Supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 01/0104, 03/0070, 05/0071, and PI05/1285), from the Instituto de Salud Carlos III (RC03/02 and RC03/10), from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 04-07190), and from Merck, Co. F.B. received a research grant from the Hospital Clínic and the Instituto de Salud Carlos III and V.G. from the Hospital Clínic. S.C-B. is supported by a contract from the Fondo de Investigación Sanitaria (Ministerio de Sanidad). X.L. has a contract from Programa Ramon y Cajal (Ministerio de Educación y Ciencia). R.M.X. is recipient of a FI grant of the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació from the Generalitat de Catalunya and the European Social Fund.

The authors would like to thank Dr Josep Oriola, Dr Cèlia Badenas, Joan Anton Puig, Dr Roberto Mazzara, and Mrs Yvonne Arce for their contributions to the recruitment of control subjects.

DISCUSSIÓ

La present Tesi Doctoral la formen dos estudis que tenen com objectiu comú aprofundir en la caracterització i identificació del CCR hereditari, utilitzant una cohort de base poblacional de pacients afectes d'aquesta neoplàsia. Per una banda, s'ha avaluat la implicació de les mutacions al gen *MYH* en el CCR en el nostre medi, contribuint a l'establiment del risc associat a les mutacions en aquest gen i al disseny d'uns criteris clínics que poden ajudar al seu diagnòstic. Per altra banda, s'ha validat un nou model predicte per a la identificació de la síndrome de Lynch -el model PREMM_{1,2}- que pot canviar en un futur pròxim l'estratègia diagnòstica d'aquesta síndrome.

La força global dels estudis, enmarcats dins el projecte EPICOLON, radica en el gran nombre de pacients inclosos de manera prospectiva i seguint uns criteris ben definits, i també en la informació recollida respecte a característiques demogràfiques, clíniques, familiars i relacionades amb el tumor. A més, el fet que el disseny de l'estudi sigui de base poblacional fa que els pacients inclosos siguin representatius de la població del nostre país, i que les dades obtingudes siguin més precises i extrapolables.

El primer estudi d'aquesta Tesi Doctoral demostra que el model PREMM_{1,2} constitueix una eina efectiva per a la detecció de pacients amb CCR portadors de mutacions als gens *MLH1/MSH2*, tant per si mateix com, sobretot, en combinació amb l'estudi molecular del sistema de reparació de l'ADN realitzat en el si del tumor. Així, la valoració quantitativa del risc pot ser molt útil a l'hora d'establir estratègies d'estudi molecular. A més, la combinació del model PREMM_{1,2} amb l'estudi molecular del tumor és capaç d'identificar un subgrup heterogeni de pacients amb alt risc de CCR, incloent

el anomenat CCR familiar –tipus X¹¹⁴, el CCR associat al gen *MYH* i altres trastorns hereditaris amb causa genètica encara desconeguda.

La primera dada important d'aquest estudi és la demostració que el model PREMM_{1,2}, emprant un punt de tall $\geq 5\%$, identifica tots els pacients portadors de mutació als gens *MLH1/MSH2* en una població no seleccionada de pacients amb CCR. La utilització d'un punt de tall superior aporta major especificitat i valor predictiu positiu, a expenses d'una menor sensibilitat. El valor predictiu negatiu d'aquest valor va ser del 100%, recolzant la consistència d'aquest punt de tall. Així, des d'un punt de vista pràctic, aquest valor es podria utilitzar a la pràctica clínica per tal de decidir si un pacient requereix una avaluació adicional mitjançant estudis moleculars. La baixa especificitat d'un valor de PREMM_{1,2} $\geq 5\%$ (68%) clarament requereix un refinament de la predicció de ser portador d'una mutació. Així, les dades d'aquest estudi mostren que la combinació d'un valor de PREMM_{1,2} $\geq 5\%$ amb l'estudi molecular del tumor augmenta clarament l'especificitat (98%) i el valor predictiu positiu (21%).

Una altra dada interessant d'aquest estudi és que de la combinació del model PREMM_{1,2} amb l'estudi d'alteració del sistema de reparació de l'ADN, s'identifica un subgrup de pacients que no mostren alteració d'aquest sistema i que clínicament s'assembla molt a l'anomenat CCR familiar tipus X¹¹⁴, definit com aquelles famílies que compleixen els criteris d'Amsterdam I (que tradueix una història familiar dominant de CCR) però no presenten alteració del sistema de reparació de l'ADN. Els individus d'aquestes famílies tenen un risc menor de desenvolupar un CCR que a la síndrome de Lynch, i no sembla haver un risc augmentat per altres neoplàsies. L'etiologia d'aquesta síndrome

és desconeguda, amb una probable base genètica heterogènia. En aquest estudi, els pacients amb un $PREMM_{1,2} \geq 20\%$ sense alteració del sistema de reparació de l'ADN presenten característiques clíniques similars a aquesta síndrome: menys història familiar de CCR, i menys història personal i familiar de neoplàsies associades. A més, de manera interessant, un dels pacients amb $PREMM_{1,2}$ elevat i sistema de reparació de l'ADN indemne presentava mutacions bial·lèliques germinals al gen *MYH* (Y165C/G382D).

Tanmateix, aquest estudi té una sèrie de limitacions. En primer lloc, el baix nombre de pacients amb mutació als gens *MLH1/MSH2* pot representar un inconvenient en relació a la fiabilitat dels resultats. En segon lloc, el model no té en compte les mutacions al gen *MSH6*, tot i que aquestes representen una proporció petita a la síndrome de Lynch. Finalment, l'estudi genètic només es va fer en aquells casos de pacients amb alteració del sistema de reparació de l'ADN, tot i que és altament improbable que, donat que l'estudi molecular del tumor es va fer de forma sistemàtica a tots els pacients, es deixés d'identificar algun pacient amb mutació. A més, per excloure aquesta possibilitat, es va fer igualment l'estudi genètic a tots els pacients amb un valor de $PREMM_{1,2} \geq 20\%$.

La principal avantatge del model $PREMM_{1,2}$ en relació amb l'estratègia actual d'identificació de la síndrome de Lynch basada en l'aplicació dels criteris revisats de Bethesda⁵³, és que permet la quantificació del risc. De fet, el model és capaç de discriminar entre diferents grups de pacients en funció de la probabilitat de ser portador de mutació als gens *MLH1/MSH2*. Aquesta correlació és especialment rellevant donat que un valor de $PREMM_{1,2} < 5\%$ va identificar el subgrup de pacients amb alteració del sistema de reparació de

l'ADN associat a mutacions al gen *BRAF*, observat característicament en el CCR esporàdic amb hipermetilació del promotor del gen *MLH1*¹¹⁵. Tenint en compte aquests resultats, es proposa una nova estratègia per al diagnòstic molecular dels pacients amb sospita de síndrome de Lynch. Així, els pacients amb un $PREMM_{1,2} < 5\%$ no requeririen més avaluació del risc donat el valor predictiu negatiu del 100% associat a aquesta condició. En els pacients amb un $PREMM_{1,2} \geq 5\%$, l'estratègia molecular dependria de la magnitud d'aquest valor: mentre que en aquells que tinguessin un valor $\geq 20\%$ es podria plantejar l'estudi genètic directe (sobretot en casos en els que no es disposa de tumor), en els que tinguessin un valor entre 5-20%, l'estudi molecular del tumor milloraria clarament el valor predictiu positiu (del 2 al 21%).

En conclusió, l'aplicació del model $PREMM_{1,2}$ ha demostrat ser una estratègia útil per a la detecció de la síndrome de Lynch. La seva facilitat d'aplicació i la seva naturalesa quantitativa la fan una eina molt atractiva a la pràctica clínica ja que es podria utilitzar tant en atenció primària per decidir quins pacients han de ser derivats per a completar l'estudi com als propis centres especialitzats per tal de decidir l'estratègia molecular més adient.

El segon estudi d'aquesta Tesi Doctoral avalua la prevalença de les mutacions germinals al gen *MYH* als pacients amb CCR. Aquest estudi estableix que la prevalença d'aquesta síndrome en els pacients amb CCR en el nostre país és $< 1\%$, i aporta les primeres recomanacions clíniques per a identificar els pacients amb CCR portadors de mutacions bial·lèliques en aquest gen. Així, els resultats d'aquest estudi indiquen que els pacients amb > 15 adenomes sincrònics al CCR i aquells menors de 50 anys es podrien beneficiar de l'estudi genètic de *MYH* donada l'elevada probabilitat de ser

portadors de mutacions en aquest gen. Per altra banda, aquest estudi aporta informació relevant en quant al risc de CCR associat a mutacions monoal·lèliques en aquest gen, observant una major patogenicitat de la mutació Y165C en comparació amb la G382D.

L'associació entre mutacions germinals bial·lèliques al gen *MYH* i el CCR ha estat àmpliament demostrada en els últims anys^{21, 96-99}. No obstant, fins al moment actual no es disposava d'uns criteris clínics per a identificar els pacients amb CCR portadors de mutacions en aquest gen. En un estudi previ que incloïa 444 pacients amb CCR seleccionats i 140 pacients amb poliposi sense mutació a APC, la presència de pòlips i una edat de presentació jove es van suggerir com a potencials criteris per a la seva identificació⁹². Tanmateix, es va observar que la presència de pòlips per si sol constitueix un criteri poc sensible donat que més del 30% dels pacients amb CCR portadors de mutacions bial·lèliques al gen *MYH* no presenten adenomes²¹. Aquestes contradiccions demostren la necessitat d'estudis prospectius en poblacions no seleccionades que permetin establir els criteris clínics diagnòstics més adients.

El segon estudi d'aquesta Tesi Doctoral confirma que la presència de >15 adenomes sincrònics i un diagnòstic de CCR efectuat abans dels 50 anys són factors predictius independents de la presència de mutacions bial·lèliques al gen *MYH*. La combinació d'aquests criteris tenen una sensibilitat del 75% i un valor predictiu positiu del 8%. És important destacar que l'aplicació d'aquests criteris als estudis poblacionals previs aporta la mateixes dades.

Una altra dada interessant d'aquest estudi és el fet que la història familiar no és predictiva de ser portador de mutacions. Un estudi previ havia suggerit que els individus portadors de mutacions bi o monoal·lèliques tenien més probabilitat de tenir antecedents familiars de primer o segon grau de CCR (risc relatiu, 1,54; IC 95%, 1,1-2,16)⁹⁹. De manera similar, un altre estudi¹¹⁶ indicava que 7 de 9 pacients amb mutacions bial·lèliques al gen *MYH* analitzats en el contexte d'una clínica d'alt risc de CCR tenien una història consistent amb una síndrome de Lynch. Tot i que diferències en la població estudiada poden explicar aquests resultats contradictoris, és important assenyalar que en aquest últim estudi tots els pacients complien el criteri 1 revisat de Bethesda (CCR diagnosticat abans del 50 anys) reforçant, per tant, la solidesa dels criteris clínics proposats en el present estudi.

La causalitat de les mutacions monoal·lèliques en la patogènesi del CCR és controvertida. Tot i que una meta-anàlisi recent suggeria un augment del risc de CCR¹¹³, cap dels estudis de casos i controls de forma individual ho ha pogut demostrar. El present estudi tampoc confirma l'associació (odds ratio, 0,76; IC95%: 0,40-1,42). No obstant, aporta informació addicional per a realitzar una meta-anàlisi incloent tots els estudis de casos i controls realitzats fins el moment (11.000 casos i 10.000 controls). El resultat d'aquesta meta-anàlisi mostra absència d'associació de forma global (odds ratio, 1,11; IC95%: 0,90-1,37). No obstant, a l'analitzar l'efecte específic de cadascuna de les mutacions prevalents, la meta-anàlisi revela un risc augmentat de CCR en aquells individus portadors de la mutació Y165C (en heterocigosi o homocigosi) (odds ratio, 1,67; IC95%: 1,17-2,40), en comparació amb la mutació G382D. Aquest resultat és consistent amb

estudis *in vitro* que mostren que la mutació Y165C compromet de forma més severa l'activitat glicosilasa MYH¹¹⁷.

La manca d'associació entre les mutacions monoal·lèliques i el risc de CCR observada en el present estudi coincideix amb els resultats de l'estudi poblacional més gran realitzat fins el moment¹¹², i entra en contradicció amb estudi previs^{98, 99, 112}. Aquestes variacions probablement tradueixen diferències poblacionals i emfatitzen la necessitat de més estudis de base poblacional per tal de determinar de forma definitiva el risc associat a mutacions monoal·lèliques. Per altra banda, és important analitzar possibles gens modificadors i l'efecte específic de cada mutació a l'hora d'establir el risc de CCR en aquesta situació.

En conclusió, aquest segon estudi de la present Tesi Doctoral suposa un primer pas per la identificació del CCR associat al gen *MYH*. El diagnòstic d'aquesta síndrome hereditària és fonamental en el moment actual per tal de poder definir la seva història natural i, eventualment, poder establir estratègies de prevenció efectives en els pacients portadors de mutacions.

CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en els estudis que componen aquesta Tesi Doctoral permeten extreure les següents conclusions:

- El model PREMM_{1,2} amb un punt de tall $\geq 5\%$ té un comportament similar als criteris revisats de Bethesda per a la identificació de pacients amb CCR portadors de mutacions als gens *MLH1/MSH2*.
- La combinació del model PREMM_{1,2} amb l'estudi del sistema de reparació de l'ADN en el si del tumor millora la seva efectivitat, en especial pel que fa a la especificitat i al valor predictiu positiu.
- El model PREMM_{1,2} es correlaciona no només amb la presència de mutacions als gens *MLH1/MSH2* (PREMM_{1,2} $\geq 5\%$), sino també amb la presència d'alteració del sistema de reparació de l'ADN associat a mutacions somàtiques al gen *BRAF* (PREMM_{1,2} $< 5\%$).
- El model PREMM_{1,2} en combinació amb l'estudi de l'alteració del sistema de reparació a l'ADN en el si del tumor permet definir un grup heterogeni d'alt risc de CCR, que inclou el CCR familiar tipus X.
- La principal avantatge del model PREMM_{1,2} en comparació amb els criteris revisats de Bethesda és la quantificació del risc. Aquesta quantificació pot ser útil a la pràctica clínica per decidir la derivació dels pacients a clíniques d'alt risc de CCR, així com establir l'estratègia molecular més adient.
- A la població espanyola, un 0,8% de tots els CCR són deguts a la presència de mutacions bial·lèliques al gen *MYH*.
- Els individus portadors de mutacions bial·lèliques desenvolupen CCR a una edat més jove que els que no tenen aquestes mutacions (57 anys)

i, a més, presenten habitualment >15 adenomes sincrònics. No obstant això, un terç d'ells no presenten adenomes sincrònics.

- La presència de mutacions monoal·lèliques no s'associa a una major història familiar de CCR i/o neoplàsies relacionades.
- Tot i que de forma global les mutacions monoal·lèliques no s'associen a un major risc de CCR, els portadors de la mutació Y165C tenen una major probabilitat de desenvolupar aquesta neoplàsia.
- La utilització de les variables predictives independents de mutacions bial·lèliques (CCR diagnosticat abans dels 50 anys i >15 adenomes sincrònics) podria ser una estratègia útil per a la identificació d'aquests individus.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, et al. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. In: IARC CancerBase No. 5. Version 2.0 (2004) Lyon: IARC Press.
2. Gatta G, Capocaccia R, Coleman MP, Gloeckler Ries LA, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Verdecchia A, Berrino F. Toward a comparison of survival in American and European cancer patients. *Cancer* 2000;89:893-900.
3. Mortalidad por cáncer y otras causas en España, año 2000: Centro Nacional de Epidemiología, 2000.
4. Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:650-61.
5. Howe GR, Benito E, Castelleto R, Cornee J, Esteve J, Gallagher RP, Iscovich JM, Deng-ao J, Kaaks R, Kune GA, et al. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1887-96.
6. Friedenreich CM, Brant RF, Riboli E. Influence of methodologic factors in a pooled analysis of 13 case-control studies of colorectal cancer and dietary fiber. *Epidemiology* 1994;5:66-79.
7. Kim YI. AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* 2000;118:1235-57.
8. Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* 2002;98:241-56.

9. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer* 2001;85:1700-5.
10. Agents IWGotEoC-P. Weight control and physical activity. International Agency for Research on Cancer, 2002.
11. Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:725-31.
12. Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med* 1994;331:1694-702.
13. Burt RW. Colon cancer screening. *Gastroenterology* 2000;119:837-53.
14. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, Woolf SH, Glick SN, Ganiats TG, Bond JH, Rosen L, Zapka JG, Olsen SJ, Giardiello FM, Sisk JE, Van Antwerp R, Brown-Davis C, Marciniak DA, Mayer RJ. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997;112:594-642.
15. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;331:1669-74.
16. Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Bond JH, Waye JD, Schapiro M, Panish JF, et al. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1996;334:82-7.
17. Ahsan H, Neugut AI, Garbowski GC, Jacobson JS, Forde KA, Treat MR, Waye JD. Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1998;128:900-5.

18. St John DJ, McDermott FT, Hopper JL, Debney EA, Johnson WR, Hughes ES. Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1993;118:785-90.
19. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2992-3003.
20. Rozen P, Macrae F. Familial adenomatous polyposis: The practical applications of clinical and molecular screening. *Fam Cancer* 2006;5:227-35.
21. Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, Wiltshire A, Prendergast J, Porteous M, Campbell H, Dunlop MG. Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am J Hum Genet* 2005;77:1.
22. Lynch HT, Boland CR, Gong G, Shaw TG, Lynch PM, Fodde R, Lynch JF, de la Chapelle A. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet* 2006;14:390-402.
23. Giardiello FM, Trimbath JD. Peutz-Jeghers syndrome and management recommendations. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:408-15.
24. Brosens LA, van Hattem A, Hylind LM, Iacobuzio-Donahue C, Romans KE, Axilbund J, Cruz-Correa M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Giardiello FM. Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis. *Gut* 2007;56:965-7.
25. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.

26. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 2001;121:198-213.
27. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993;329:1977-81.
28. Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000;119:854-65.
29. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787-93.
30. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:988-93.
31. Jass JR. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol* 2006;12:4943-50.
32. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M, Gruenthal K, Leppert MF, Slattery ML. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 2001;121:830-8.

33. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-7.
34. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-32.
35. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* 2003;138:560-70.
36. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:839-47.
37. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, Lane MR, Lanspa SJ, Lynch HT. Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 1994;14:1631-4.
38. Castells A, Pique JM. Tumores intestinales. In: Farreras V, Rozman C, eds. *Medicina ínterna*. 14^a ed. Madrid: Harcourt, 2000:261-272.
39. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, Waring PM, Ruzskiewicz AR, Pollett AF, Redston M, Barker MA, Baron JA, Casey GR, Dowty JG, Giles GG, Limburg P, Newcomb P, Young JP, Walsh MD, Thibodeau SN, Lindor NM, Lemarchand L, Gallinger S, Haile RW, Potter JD, Hopper JL, Jass JR. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007;133:48-56.

40. Gruber SB. New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology* 2006;130:577-87.
41. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, Morreau H, van Puijenbroek M, Tops C, van Os T, Wagner A, Ausems MG, Gomez E, Breuning MH, Brocker-Vriends AH, Vasen HF, Wijnen JT. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006;130:312-22.
42. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17:271-2.
43. Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 1995;109:1685-99.
44. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
45. McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL, Kambara T, Spring KJ, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, Simms LA, Leggett BA, Young J, Jass JR. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer* 2004;3:101-7.
46. Pinol V, Castells A, Andreu M, Castellvi-Bel S, Alenda C, Llor X, Xicola RM, Rodriguez-Moranta F, Paya A, Jover R, Bessa X. Accuracy of

- revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Jama* 2005;293:1986-94.
47. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Sotamaa K, Prior TW, Westman J, Panescu J, Fix D, Lockman J, Comeras I, de la Chapelle A. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005;352:1851-60.
 48. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espin E, Armengol M, Sijmons RH, Kleibeuker JH, Seruca R, Aaltonen LA, Imai K, Yamamoto H, Schwartz S, Jr., Hofstra RM. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 2005;24:3995-8.
 49. Ballesté B, Bessa X, Bellosillo B, Maragon E, Torra S, Llor X, Castells A, Andreu M. Papel de la mutación BRAF en la estrategia de detección del cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (CCHNP). *Gastroenterol Hepatol* 2006;29:156-157.
 50. Benlloch S, Paya A, Alenda C, Bessa X, Andreu M, Jover R, Castells A, Llor X, Aranda FI, Massuti B. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagn* 2006;8:540-3.
 51. Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomaki P, De La Chapelle A, Mecklin JP. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000;118:829-34.

52. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.
53. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261-8.
54. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996;2:169-74.
55. Jass JR, Pokos V, Arnold JL, Cottier DS, Jeevaratnam P, Van de Water NS, Browett PJ, Winship IM, Lane MR. Colorectal neoplasms detected colonoscopically in at-risk members of colorectal cancer families stratified by the demonstration of DNA microsatellite instability. *J Mol Med* 1996;74:547-51.
56. Jass JR, Cottier DS, Jeevaratnam P, Pokos V, Holdaway KM, Bowden ML, Van de Water NS, Browett PJ. Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet* 1995;346:1200-1.

57. Lewis CM, Neuhausen SL, Daley D, Black FJ, Swensen J, Burt RW, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Genetic heterogeneity and unmapped genes for colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:1382-8.
58. Liu B, Farrington SM, Petersen GM, Hamilton SR, Parsons R, Papadopoulos N, Fujiwara T, Jen J, Kinzler KW, Wyllie AH, et al. Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med* 1995;1:348-52.
59. Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T, Hodgson SV, Harocopos CJ, Bodmer WF. Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary non-polyposis colorectal cancer even if the Amsterdam criteria are not fulfilled. *Br J Surg* 1997;84:233-7.
60. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758-62.
61. Piñol V, Castells A, Andreu M, Castellvi-Bel S, Alenda C, Llor X, Xicola RM, Rodriguez-Moranta F, Paya A, Jover R, Bessa X. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Jama* 2005;293:1986-94.
62. Parmigiani G, Berry D, Aguilar O. Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1998;62:145-58.

63. Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA, Calzone K, Stopfer J, Campeau L, Ganguly A, Rebbeck T, Weber BL. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997;336:1409-15.
64. Chen S, Wang W, Lee S, Nafa K, Lee J, Romans K, Watson P, Gruber SB, Euhus D, Kinzler KW, Jass J, Gallinger S, Lindor NM, Casey G, Ellis N, Giardiello FM, Offit K, Parmigiani G. Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. *Jama* 2006;296:1479-87.
65. Balmana J, Stockwell DH, Steyerberg EW, Stoffel EM, Deffenbaugh AM, Reid JE, Ward B, Scholl T, Hendrickson B, Tazelaar J, Burbidge LA, Syngal S. Prediction of MLH1 and MSH2 mutations in Lynch syndrome. *Jama* 2006;296:1469-78.
66. Barnetson RA, Tenesa A, Farrington SM, Nicholl ID, Cetnarskyj R, Porteous ME, Campbell H, Dunlop MG. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N Engl J Med* 2006;354:2751-63.
67. Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, Tops C, Moller P, Fodde R. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;339:511-8.
68. Dunlop MG. Guidance on gastrointestinal surveillance for hereditary non-polyposis colorectal cancer, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis, and Peutz-Jeghers syndrome. *Gut* 2002;51:V21-7.

69. Jarvinen HJ. Genetic testing for polyposis: practical and ethical aspects. *Gut* 2003;52:19ii-22.
70. Ramsey SD, Clarke L, Etzioni R, Higashi M, Berry K, Urban N. Cost-effectiveness of microsatellite instability screening as a method for detecting hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2001;135:577-88.
71. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmang C. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;124:544-60.
72. Vasen HF, Nagengast FM, Khan PM. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* 1995;345:1183-4.
73. Lynch P. If aggressive surveillance in hereditary nonpolyposis colorectal cancer is now state of the art, are there any challenges left? *Gastroenterology* 2000;118:969-71.
74. Grady WM. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology* 2003;124:1574-94.
75. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen HJ. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81:214-8.
76. Burke W, Petersen G, Lynch P, Botkin J, Daly M, Garber J, Kahn MJ, McTiernan A, Offit K, Thomson E, Varricchio C. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer.

- I. Hereditary nonpolyposis colon cancer. Cancer Genetics Studies Consortium. JAMA 1997;277:915-9.
77. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2003. CA Cancer J Clin 2003;53:27-43.
78. Dove-Edwin I, Boks D, Goff S, Kenter GG, Carpenter R, Vasen HF, Thomas HJ. The outcome of endometrial carcinoma surveillance by ultrasound scan in women at risk of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma and familial colorectal carcinoma. Cancer 2002;94:1708-12.
79. Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Mecklin JP, Moller P, Nagengast F, Parc Y, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Wijnen J. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). J Med Genet 2007;44:353-62.
80. American Gastroenterological Association medical position statement: hereditary colorectal cancer and genetic testing. Gastroenterology 2001;121:195-7.
81. Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome). Int J Cancer 1996;69:38-43.
82. Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuker JH, Taal BG, Griffioen G, Nagengast FM, Meijers-Heijboer EH, Bertario L, Varesco L, Bisgaard ML, Mohr J, Fodde R, Khan PM. Cancer risk in families with hereditary

- nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996;110:1020-7.
83. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342:1946-52.
 84. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002;30:227-32.
 85. Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM, Chang DY. Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys* 2001;35:141-70.
 86. Garcia-Ortiz MV, Ariza RR, Roldan-Arjona T. An OGG1 orthologue encoding a functional 8-oxoguanine DNA glycosylase/lyase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 2001;47:795-804.
 87. Yang H, Clendenin WM, Wong D, Demple B, Slupska MM, Chiang JH, Miller JH. Enhanced activity of adenine-DNA glycosylase (Myh) byapurinic/aprimidinic endonuclease (Ape1) in mammalian base excision repair of an A/GO mismatch. *Nucleic Acids Res* 2001;29:743-52.
 88. Sakumi K, Tominaga Y, Furuichi M, Xu P, Tsuzuki T, Sekiguchi M, Nakabeppu Y. Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption. *Cancer Res* 2003;63:902-5.

89. Cheadle JP, Sampson JR. Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 2:R159-65.
90. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV, Thomas HJ, Tomlinson IP. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003;348:791-9.
91. Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, Frayling I, Jordan S, Maher ER, Mak T, Maynard J, Pigatto F, Shaw J, Cheadle JP. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003;362:39-41.
92. Wang L, Baudhuin LM, Boardman LA, Steenblock KJ, Petersen GM, Halling KC, French AJ, Johnson RA, Burgart LJ, Rabe K, Lindor NM, Thibodeau SN. MYH mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps. *Gastroenterology* 2004;127:9-16.
93. Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, Sampson JR, Cheadle JP. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum Mol Genet* 2002;11:2961-7.
94. Gismondi V, Meta M, Bonelli L, Radice P, Sala P, Bertario L, Viel A, Fornasarig M, Arrigoni A, Gentile M, Ponz de Leon M, Anselmi L, Mareni C, Bruzzi P, Varesco L. Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients

- with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer* 2004;109:680-4.
95. Isidro G, Laranjeira F, Pires A, Leite J, Regateiro F, Castro e Sousa F, Soares J, Castro C, Gira J, Brito MJ, Medeira A, Teixeira R, Morna H, Gaspar I, Marinho C, Jorge R, Brehm A, Ramos JS, Boavida MG. Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum Mutat* 2004;24:353-4.
96. Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A, Lipton L, Tomlinson I, Karja V, Eskelinen M, Mecklin JP, Karhu A, Jarvinen HJ, Aaltonen LA. Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol* 2003;163:827-32.
97. Fleischmann C, Peto J, Cheadle J, Shah B, Sampson J, Houlston RS. Comprehensive analysis of the contribution of germline MYH variation to early-onset colorectal cancer. *Int J Cancer* 2004;109:554-8.
98. Peterlongo P, Mitra N, Chuai S, Kirchoff T, Palmer C, Huang H, Nafa K, Offit K, Ellis NA. Colorectal cancer risk in individuals with biallelic or monoallelic mutations of MYH. *Int J Cancer* 2005;114:505-7.
99. Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, Manno M, Selander T, Aronson M, Redston M, Cotterchio M, Knight J, Gryfe R, Gallinger S. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1631-4.

100. Tenesa A, Campbell H, Barnetson R, Porteous M, Dunlop M, Farrington SM. Association of MUTYH and colorectal cancer. *Br J Cancer* 2006;95:239-42.
101. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, Pinol V, Xicola RM, Bujanda L, Rene JM, Clofent J, Bessa X, Morillas JD, Nicolas-Perez D, Paya A, Alenda C. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy on colorectal cancer. *Gut* 2006;55:848-855.
102. Rodríguez-Moranta F, Castells A, Andreu M, Piñol V, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, Xicola R, Jover R, Payá A, Bessa X, Balaguer F, Cubiella J, Argüello L, Morillas J, Bujanda L. Clinical performance of original and revised Bethesda guidelines for the identification of MSH2 / MLH1 gene carriers in patients with newly diagnosed colorectal cancer. Proposal of a new and simpler set of recommendations. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1104-1111.
103. Jover R, Payá A, Alenda C, Castells A, Llor X, Andreu M. Clinico-pathological differences regarding MLH1 and MSH2 expression in microsatellite instability colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 2005;128:A-567.
104. Castellvi-Bel S, Castells A, Strunk M, Ferrandez A, Piazuelo E, Mila M, Pinol V, Rodríguez-Moranta F, Andreu M, Lanás A, Pique JM. Genomic rearrangements in MSH2 and MLH1 are rare mutational events in Spanish patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Lett* 2005;225:93-8.

105. Llor X, Pons E, Xicola RM, Castells A, Alenda C, Pinol V, Andreu M, Castellvi-Bel S, Paya A, Jover R, Bessa X, Giros A, Roca A, Gassull MA. Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res* 2005;11:7304-10.
106. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:769-80.
107. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-5.
108. de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005;4:233-7.
109. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999;36:801-18.
110. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17:271-2.
111. Jenkins MA, Croitoru ME, Monga N, Cleary SP, Cotterchio M, Hopper JL, Gallinger S. Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MYH mutations: a population-based case-family study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:312-4.
112. Webb EL, Rudd MF, Houlston RS. Colorectal Cancer Risk in Monoallelic Carriers of MYH Variants. *Am J Hum Genet* 2006;79:768-71.

113. Tenesa A, Campbell H, Barnetson R, Porteous M, Dunlop M, Farrington SM. Association of MUTYH and colorectal cancer. *Br J Cancer* 2006.
114. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, Gallinger S, Bapat B, Aronson M, Hopper J, Jass J, LeMarchand L, Grove J, Potter J, Newcomb P, Terdiman JP, Conrad P, Moslein G, Goldberg R, Ziogas A, Anton-Culver H, de Andrade M, Siegmund K, Thibodeau SN, Boardman LA, Seminara D. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *Jama* 2005;293:1979-85.
115. Loughrey MB, Waring PM, Tan A, Trivett M, Kovalenko S, Beshay V, Young MA, McArthur G, Boussioutas A, Dobrovic A. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer* 2007.
116. Jo WS, Bandipalliam P, Shannon KM, Niendorf KB, Chan-Smutko G, Hur C, Syngal S, Chung DC. Correlation of polyp number and family history of colon cancer with germline MYH mutations. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:1022-8.
117. Pope MA, Chmiel NH, David SS. Insight into the functional consequences of hMYH variants associated with colorectal cancer: distinct differences in the adenine glycosylase activity and the response to AP endonucleases of Y150C and G365D murine MYH. *DNA Repair (Amst)* 2005;4:315-25.