

**Maestría en Biología Molecular Médica**

Universidad de Buenos Aires

**“Características clínicas, histopatológicas e Inestabilidad de  
Secuencias Microsatélites (MSI) en Cáncer Colon (CC)”**

**Ana Cecilia Maldonado**

**Córdoba, Julio del 2005**

# **MAESTRIA EN BIOLOGIA MOLECULAR MÉDICA**

Universidad de Buenos Aires

## **Director de Tesina:**

Dra. Teresita Alvarellos

## **Codirector de Tesina:**

Dr. Emilio Palazzo

## **Lugar de realización:**

- Fundación Para el Progreso de la Medicina: Laboratorio de Biología Molecular.
- Hospital Privado de Córdoba: Servicio de Anatomía Patológica  
Servicio de Oncología.

## Índice

Introducción	4
• Epidemiología	4
• Factores de riesgo	4
• Genes asociados a CC	5
• Poliposis Adenomatosa Familiar	8
• Cancer colorectal No Poliposo Hereditario	9
• Mecanismos Moleculares del CC	10
Objetivo	13
Materiales y Métodos	14
• Pacientes	14
• Tipo de muestra	14
• Extracción de ADN	14
• PCR	15
• Electroforesis	17
• Detección	18
Resultados	19
• Tablas	21
• Gráficos	25
Discusión	27
Conclusión	30
Anexo	31
Bibliografía	32

## **Introducción**

El Cáncer Colon (CC) se considera la segunda causa de muerte por cáncer en América luego del cáncer de pulmón en hombres y del Cáncer de mama en mujeres, causando 106.000 muertes en el año 2004. Su incidencia es creciente y su pronóstico no se ha modificado en los últimos 40 años. (1, 2)

La variación geográfica de la incidencia de CC en el mundo es muy alta, siendo Nueva Zelanda e Irlanda los países mas afectados, luego EEUU seguido de América del Sur y la más baja se presenta en la India. (3)

Una gran variedad de factores ambientales y genéticos son los responsables del CC. Una dieta rica en grasas y baja en fibras, típica de países desarrollados, parece favorecer su desarrollo, aunque la historia natural del CC se correlaciona estrechamente con las alteraciones genéticas que ocurren en el 85% de los casos. (4)

### ***Los factores de riesgo que predisponen al cáncer de colon son:***

- Dieta rica en grasas pobre en volumen.
- Edad superior a los 40 años
- Antecedentes personales de:
  - Adenomas colorectales (sincrónicos, metacrónicos)
  - Carcinoma Colorectal
- Antecedentes familiares de:
  - Síndrome polipósico: poliposis colónica familiar, síndrome de Gardner, síndrome de Turcot, Síndrome de Torre Muir, síndrome de Peutz-Jeghers, Poliposis Juvenil Familiar.
  - Cáncer de colon hereditario sin poliposis.
  - Familiares de primer grado con cáncer colorectal.
- Enfermedad inflamatoria intestinal:
  - Colitis ulcerosa.
  - Enfermedad de Crohn. (5)

## **Genes asociados a CC**

Desde el punto de vista genético molecular, una neoplasia se considera como la proliferación clonal de células caracterizadas por un crecimiento autónomo y presentan alteraciones genéticas heredadas o adquiridas de novo en el transcurso de la evolución del tumor. La generación de células tumorales es un proceso aleatorio pero de selección de clones que escapan a los mecanismos de control proliferativo e inmunológico. (6, 7)

El cáncer de colon es el resultado de una progresión y acumulación de mutaciones de oncogenes (reguladores positivos del ciclo celular), genes supresores de tumores (reguladores negativos del ciclo celular) y genes encargados de la reparación del ADN. (7,8)

### ***Gen PAF (Gen de la Poliposis adenomatosa Familiar)***

Es un gen supresor tumoral, esta ubicado en el cromosoma 5q, codifica para una proteína citoplasmática de 2843 aminoácidos que se localiza en los tejidos adultos y tiene diferentes dominios con distintas funciones donde la región C-terminal puede unirse a los microtúbulos y la región N-terminal está involucrada con la unión a las catenina a y b1. La frecuencia de mutaciones en el gen APC para la población general es de 1/1000 con penetrancia del 100%. Las mutaciones observadas incluyen desde grandes deleciones, hasta mutaciones puntuales e hipermetilaciones que afectan los mecanismos de transcripción y "splicing" y más del 90% de las mutaciones descritas generan una proteína trunca. (9,10,11)

### ***Gen Ras***

K- Ras es un oncogen que codifica una proteína de unión a Guanina trifosfato, involucrada en la traducción de señales y se han hallado mutaciones en los codones 12 y 13 generando una ganancia de función de la proteína que estimula la proliferación celular dando a la célula ventajas

de crecimiento. Estas mutaciones se presentan en el 40% de los CC y adenomas avanzados. (2, 12,13)

### ***Gen DCC (gen de la Deleción de Cáncer de Colon)***

Se localiza en el cromosoma 18q21 que codifica una proteína de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Su función esta asociada con la interacción entre células - matriz y/o con procesos de diferenciación. La pérdida alélica de este gen ha sido demostrada en más del 70% de los CC y en el 50% de los adenomas. (13,14)

### **Gen p-53**

Es un gen supresor de tumor cuyo rol crucial es advertir el daño en ADN, asistiendo a su reparación o induciendo la muerte celular. Se han detectado mutaciones de este gen en el 50 - 70% de los canceres de colon esporádicos. El valor pronóstico de p53 varía según los autores pero las mutaciones y sobreexpresión de la proteína se relaciona con menor sobrevida. (12, 13, 14,15)

### ***Genes de Reparación del ADN (de Bases Mal Apareadas )***

El ADN puede ser el blanco de numerosos agentes biológicos, físicos y químicos; sin embargo, es muy estable en su capacidad para conservar la información genética que contiene; dicha estabilidad puede atribuirse a su estructura de doble hélice y a la existencia de varios mecanismos de reparación. La importancia de estos mecanismos radica en que una simple sustitución de una base en un gen puede modificar la función de la proteína correspondiente, causando alteraciones incluso letales. Múltiples sistemas de reparación protegen el genoma de los mamíferos, desde la apoptosis que elimina células anormales de la

población celular hasta las enzimas específicas de reparación que corrigen daños puntuales en el ADN. (9)

El sistema de reparación de bases mal apareadas (Mismatch Repair "MR"), tiene la capacidad de reconocer y reparar pares de nucleótidos lesionados que puede suceder durante la síntesis donde la ADN polimerasa incorpora una base diferente a la indicada o en el ADN ya sintetizado por desaminación de la 5-metil citosina o adenina que conducen a la formación, respectivamente, de uracilo, timina e hipoxantina. Cuando la lesión escapa a estos mecanismos de control, actúan los genes del sistema de reparación de mismatch (MLH1, MSH2, MSH3 Y MSH6), los cuales requieren que la cadena a corregir no esté aún modificada por la metilación de la adenina localizada en secuencias GATC. El ATP, la proteína SSB (proteína que se une a ADN de una sola cadena) y los productos de los genes involucrados son indispensables para que haya una corrección eficiente. La proteína SSB se une fuerte y cooperativamente al ADN de cadena sencilla y además estimula la actividad de las ADN polimerasas II y III. La proteína hMSH2 junto con MSH3 ó MSH6, se une al ADN sobre el par de bases apareadas erróneamente y el gen hMLH1 actúa como una endonucleasa sitio específica, que rompe un enlace fosfodiéster en el extremo 5' de la secuencia GATC no metilada. (16,17, 18)

La expresión del gen hMLH1 ubicado en 3p21 es esencial para el funcionamiento del sistema de reparación que además de iniciar el proceso interviene en la regulación de los puntos de control en las fases G1, M y G1 del ciclo celular. Después de que hMLH1 da origen a las incisiones en el ADN que contiene la base mal apareada y no metilada, el gen uvrB elimina el fragmento abriendo un espacio de una kilobase como mínimo; posteriormente, la ADN polimerasa llena dicho espacio polimerizando los nucleótidos correctos para finalmente dejar actuar a la ADN ligasa. (16,18,19,20)

La caracterización molecular de todos estos genes involucrados en esta neoplasia ha permitido clasificar el CC en dos grupos: los síndromes poliposos y los no poliposos.

### **Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF)**

Se caracteriza clínicamente porque los pacientes tienen más de 100, y hasta 1.000, pólipos adenomatosos colónicos que empiezan a aparecer entre los 10 y 20 años de edad, inicialmente en la región rectosigmoidea del colon, y con frecuencia producen hemorragia rectal. Esta patología se hereda de forma autosómica dominante con penetrancia completa, aunque existen casos esporádicos sin historia familiar que parecen haber presentado mutaciones espontáneas. La PAF generalmente se manifiesta entre los 50 y 60 años de edad con alto riesgo de desarrollar otros carcinomas en tiroides, estómago, cerebro y sarcomas óseos. (10,11)

PAF representa el 1% de todos los CCR y se ha demostrado que la mayoría (70%) de los pacientes con PAF tienen mutaciones del gen *APC* en todas las células del organismo. Las mutaciones en el gen *APC* en los pacientes con PAF siguen una distribución diferente a las de los tumores esporádicos: la mayoría (68%) se concentran en la mitad 5' del exon 15 y un 13% adicional se localiza en el exon 8. El 50-60% de los adenomas y el 33% de los carcinomas que desarrollan estos pacientes adquieren una mutación en el otro alelo del gen *APC* durante el desarrollo tumoral. (21,22)

Genotípica y fenotípicamente las familias con PAF son muy heterogéneas pero generalmente se caracterizan por presentar aneuploidias y mutaciones específicas en los genes *APC*, *k-ras* y *p53*.

Existen además algunas variantes de PAF como: (2)

A. El Síndrome de Gardner, donde las manifestaciones extracolónicas principales son osteomas y fibromas en la piel.

B. El Síndrome de Peutz-Jegher asociado a genodermatosis y melanosis mucocutáneas en la cavidad oral; su gen, fue recientemente mapeado en el cromosoma 19p 13.



C. La Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada (PAFA), la cual se caracteriza por el desarrollo de un menor número de adenomas colónicos con predilección por la región proximal del colon; se presenta a mayor edad que la PAF clásica.

El fenotipo de la enfermedad parece estar relacionado con la localización de la mutación sobre el gen APC así: en PAFA, la mutación frecuentemente se encuentra en la región 5 entre los codones 1285 y 1465, mientras que la aparición de hipertrofias congénitas del pigmento epitelial de la retina en el Síndrome de Gardner se asocia con mutaciones en los codones 542 a 1809 y la presencia severa de metástasis extracolónicas con cambios en los codones 1465 a 1546 y 2621.

La identificación del gen responsable de la PAF ha facilitado el diagnóstico genético de los portadores asintomáticos. (22, 23, 24)

### **Cáncer Colo-rectal No Poliposo Hereditario (CCNPH)**

En 1971 Lynch y Krush lo denominaron como Síndrome de Lynch o CCNPH (4-6) y representa 10 – 15 % de todos los casos de CCR.

Básicamente el Síndrome de Lynch se caracteriza por tener un patrón de herencia autosómico dominante, penetrancia del 85 al 90% y el diagnóstico se realiza antes de los 45 años de edad. Histopatológicamente sus características son, la diferenciación e incremento de los marcadores celulares, infiltración linfocítica peritumoral mezclada con células tumorales que aumenta el riesgo de hacer metástasis a sitios como endometrio, ovario, estómago, tracto hepatobiliar, uretra y pelvis renal. Adicionalmente en algunas familias con CCNPH se ha observado un elevado porcentaje de cáncer de mama y el estudio del contenido de ADN muestra que son tumores pseudodiploides. Existen adenomas colorrectales sincrónicos hasta en un 20% de los casos. (2, 25, 26)

Se definieron los criterios de Ámsterdam y los de Bethesda, para el diagnóstico clínico de Cáncer Colon Heredado no Poliposo (CNP). (2)

**(Anexo 1)**

## **Mecanismos Moleculares del CC**

Durante el proceso de carcinogénesis del CC, las células neoplásicas comparten un alto grado de inestabilidad genómica producida por dos vías moleculares; la **vía del fenotipo supresor** y la **vía del fenotipo mutador**.

### **Vía supresora**

Se presenta en el 80% de los casos de CC esporádico y en la mayoría de PAF. La inestabilidad cromosómica se caracteriza por el desarrollo de tumores con aneuploidías, pérdida de heterocigosidad en múltiples loci y acumulación de mutaciones en los genes reguladores, genes supresores o que activan oncogenes como APC, p53 y *ras* (10,11, 14). Se requieren mutaciones en cuatro o cinco genes específicos para que se produzca el crecimiento maligno y en segundo lugar más que el orden de las mutaciones que no suele ser estricto, lo importante es la acumulación de las mismas. La primera mutación se localiza en el gen APC, convirtiendo el epitelio normal en uno o más tumores benignos (*adenomas*) por pérdida en el control de la división celular, adhesión y migración. Esta vía envuelve las cateninas b y el factor de células T, dando señales de proliferación transcripcional que pueden operar por la vía de *C myc*. En casos espontáneos, la mutación ocurre en una sola célula, por lo cual el adenoma resultante, es un clon celular. La siguiente mutación es en el oncogen *k-ras* y la acumulación de estas dos mutaciones en los adenomas estimula su crecimiento. Finalmente, la mutación en p53 causa la transición a células cancerosas porque no hay regulación del ciclo celular para el paso de G1 a S. Otros cambios muy comunes incluyen la pérdida de copias de genes DPC4/Smad4 o DCC localizado en el cromosoma 18 y del gen Peutz-Jegher situado en el cromosoma 19 muy característicos en los tumores esporádicos. (28, 29, 30,31)

### ***Vía Mutadora***

Este mecanismo se presenta en CCNPH y en el 10 –15% de los casos esporádicos. Los tumores se caracterizan por presentar poliploidía o pseudopoliploidía. Además, se observa ausencia de mutación en los genes tumorales comunes y acumulación de numerosas mutaciones en secuencias microsatelitales constituidos principalmente por polidesoxiadenosinas. La acumulación de estas mutaciones en estas secuencias tiene consecuencias significativas para la estructura y función del genoma; ellas pueden alterar la organización de la cromatina e inducir cambios en la estructura del nucleosoma o modificar el patrón de expresión génica por mutaciones en los reguladores y/o promotores de los genes. El momento en que ocurre la inestabilidad se desconoce, no obstante, se ha observado que las mutaciones son homogéneas en el mismo tumor pero diferentes entre los tumores. (29, 32, 33). La inestabilidad genómica en las secuencias microsatelitales se explicó al comprobar la presencia de daño en los genes de reparación del ADN a las cuales denominaron *Mutaciones del Fenotipo Mutador* (MFM). Actualmente se conocen seis genes de reparación del ADN bien identificados que son hMSH2, hMSH6 y hMSH3 (homólogos a MutS bacteriano) y hMLH1, hPMS1, hPMS2 (homólogos a MutL bacteriano).

Los genes más estudiados, hMSH2 y hMLH1 se localizan en los cromosomas 2q15-16 y 3p21. Estos genes actúan como genes supresores de tumores y la pérdida de ambas copias del gen resulta en anomalías en el sistema de reparación. Una de ambas copias se hereda en línea germinal en CCNPH y el segundo golpe ocurre en la célula neoplásica.

La alteración en estos dos genes a su vez induce nuevas mutaciones como la inactivación del gen *BAX* que regula la apoptosis. En el 50% de los tumores de colon se observan mutaciones similares en los genes TGFbRII, hMSH3 y hMSH6. (34)

Las secuencias microsatelitales, son secuencias cortas de ADN repetidas en tandem que se encuentran a lo largo del todo el genoma

localizadas dentro de la heterocromatina cerca de centrómeros y telómeros. Generalmente son secuencias no codificantes aunque no siempre. Estas secuencias son únicas en cada individuo pero diferentes entre individuos y contribuyen como marcadores para el análisis genético. A pesar del poliformismo de estas secuencias entre individuos, el patrón de herencia se mantiene estable. Las secuencias repetitivas son mono, di, tri o tetranucleótidos, donde la repetición más frecuente es (CA)<sub>n</sub>. La expansión o acortamiento de dichas secuencias es por el aumento o la disminución de la unidad repetitiva debido a mutaciones que ocurren durante la reparación del ADN luego de su replicación. Esto se refiere como fenotipo de error de reparación (RER) debido a mutaciones en los genes de reparación del ADN antes mencionados. (34)

Más del 80% de los tumores en CCNPH presentan mutaciones en hMSH2 y hMLH1, y con menos frecuencia en hMSH6, hMSH3, hPMS1, hPMS2. Aproximadamente entre el 10 - 15% de los tumores esporádicos también exhiben el fenotipo mutador y están asociados con alteraciones somáticas de los genes de reparación pero son mutaciones que no están presentes en la línea germinal. La mutación más común detectada es la hipermetilación del promotor de hMLH 1.(35)

En 1997 “ the National Cancer Institute” desarrollo el criterio internacional para determinar el fenotipo mutador en la detección y análisis en la predisposición familiar al Cáncer de Colon donde se estableció que; la inestabilidad genómica asociada con defectos en la reparación del ADN se denominó inestabilidad de secuencias microsatelitales (MSI) y un panel de cinco secuencias han sido validadas y recomendadas como panel de referencia, pero existen además otros marcadores. El tumor puede ser caracterizado como: alta frecuencia de inestabilidad de secuencias microsatelitales (MSI-H), si dos o más de los cinco marcadores muestran inestabilidad y baja frecuencia (MSI-L) si solo uno de los cinco marcadores muestra inestabilidad. MSI puede ser medido en muestras de tejido tumoral (fresco o fijado en parafina) y tejido normal. La guía Bethesda

fue desarrollada para la selección de tumores para el análisis de MSI y se concluyó aplicar estas recomendaciones solo para neoplasias colorrectales. (36)

Actualmente se han identificado las características histopatológicas de los tumores que presentan el fenotipo mutador con MSI. Todos estos tumores muestran predilección por el colon derecho, características histológicas de tumores mucinoides, un prominente infiltrado linfocitario e histología pobremente diferenciada. (4)

Aunque el pronóstico de pacientes con CC es altamente dependiente de la etapa al diagnóstico: 5 o más años de supervivencia en el 90% de aquellos con Duke's A, pero solo el 5% con Duke's C, (4) estudios recientes sugieren que tumores con MSI raramente hacen metástasis y poseen mayor supervivencia. (37) Más importante aún son los resultados de estudios en fase III de quimioterapia adyuvante en CC en estadio II y III donde pacientes con MSI tienen mejor pronóstico en el grupo que no recibió 5 fluorouracilo.(4)

Es importante disponer de métodos moleculares y validar su utilidad en la iniciación y progresión del cáncer, en la respuesta a nuevos tratamientos y en el estudio de individuos asintomáticos en riesgo de desarrollar cáncer de colon.

### **Objetivo**

- 1) Puesta a punto de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de Inestabilidad de secuencias microsatelitales (MSI).
- 2) Análisis retrospectivo del valor pronóstico y predictivo de la detección de MSI por PCR en pacientes con diagnóstico de cáncer de colon.
- 3) Establecer diferencias en la supervivencia del paciente según la ubicación, estadio y tratamiento del tumor.

## **Materiales y Métodos**

### **Pacientes**

Se analizaron retrospectivamente 53 historias clínicas de pacientes con diagnóstico de Adenocarcinoma de Colón, sin distinción de edad, sexo y cuya presentación clínica no sugiera Poliposis Adenomatosa Familiar, desde 1996 a Diciembre del 2001 y el seguimiento de los mismo se continuó hasta Junio del año 2005.

Se obtuvieron los siguientes datos del paciente: edad al diagnóstico, sexo, localización del tumor (proximal o distal), histología (mucinoso o no mucinoso), grado de diferenciación (bueno, moderado, pobremente diferenciado o no específico), estadio del tumor, presencia de metástasis, si recibieron o no quimioterapia, años de sobrevida y antecedentes familiares de Cáncer de Colon.

### **Tipo de muestra**

Se obtuvieron muestras de tejido normal y tumoral embebido en parafina de solo 35 pacientes. Las mismas fueron analizadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Privado y posteriormente se realizó la extracción del ADN y el análisis molecular con los cinco marcadores que representan el *panel de referencia* para Inestabilidad de secuencias microsátélites según la reunión consenso.

### **Extracción de DNA**

- El ADN genómico se obtuvo a partir de una digestión de 3 cortes de 20 um con 100 ul de Buffer de incubación y Proteinasa K (Promega) cuya concentración utilizada fue 18mg/ml. Las muestras se incuban a 56° C toda la noche, seguidas de una extracción con MagneSil. Genomic Fixed Tissue System ( Promega) para pequeñas cantidades de tejidos, según protocolo.
- Posteriormente se agregaron dos volúmenes de Buffer de lisis y 7ul de resina paramagnética al tubo que contiene la muestra y se incubó

durante 5 minutos. El ADN se une a la resina eliminando de esta manera los inhibidores.

- Se coloca el tubo conteniendo la muestra en un soporte magnético y sin remover esta resina se descarta el sobrenadante.
- Se realiza un lavado con Buffer de lisis se vuelve a colocar en el soporte magnético y se descarta el volumen.
- Se realiza un lavado con buffer de lavado 1 X, paso que se repite 3 veces, descartando el sobrenadante.
- Se descarta el sobrenadante luego del tercer lavado y se deja secar al aire durante unos minutos.
- Se agregan 25 ul de Buffer de elusión y se coloca la muestra a 65°C por 5 min.
- Luego de retirar el tubo y colocarlo en el soporte magnético se transfiere el sobrenadante conteniendo el ADN en solución a un tubo nuevo.
- Se conserva a 4°C por una semana o a – 20°C por tiempo prolongado
- 5 ul de esta solución se utilizó como templado para la reacción de PCR.

## **PCR**

Para determinar la calidad del ADN extraído se realizó una PCR para una secuencia del gen B actina que asegura, se trate de ADN amplificable.

Para la PCR se utilizaron 5 marcadores que representan el panel de referencia que fueron BAT25, BAT26 (mononucleótidos) y D5S346, D2S123, D17S250 (dinucleótidos). (37)

Las reacciones PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 ul conteniendo 50 -100ng de ADN genómico, el buffer de PCR 1X ( Green Buffer Promega). 250ul de cada primer y 1 una unidad de Go taq Polimerase (Promega). La concentración de MgCl<sub>2</sub> fue 2.5mM para BAT25 y 2.75 mM para BAT26, D2S123, D5S346 y D17S250. (38, 39)

Los ciclos de la PCR se indican en la tabla 1. Cada una de estas secuencias requiere un par de oligonucleótidos sintéticos que flanqueen la

región a amplificar. Las condiciones de ciclado fueron diferentes para cada marcador analizado que constó de 30 a 35 ciclos; desnaturalización a 95° C, seguido del annealing de los oligonucleótidos a una temperatura específica para cada marcador y finalmente la extensión a 72° C.

**Tabla 1. Secuencia de primers y condiciones de ciclado.**

Marcador	Secuencia	Ciclado	Fragmento
BAT 25	TCGCCTCCAAGAATGTAAGT TCTTGATTTTAACTATGGCTC	30 CICLOS 95°1min, 56° 45seg 72° 45seg	90 pb
BAT26	TGACTACTTTTTGACTTCAGCC AACCATTCAACATTTTAAAC	30 CICLOS 95° 45 seg, 55° 1min, 72 30seg	80 – 100 pb
D2S123	AAACAGGATGCCTGCCTTTA GGACTTTCCACCTATGGGAC	30 CILCOS 95° 45 seg, 55° 45seg, 72 45seg.	197 – 227 pb
D5S346	ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG AGCAGATAAGACAAGTATTACTAG	30 CICLOS 95° 1 min, 57° 45 seg, 72 45seg	96 – 192 pb
D17S250	GGAAGAATCAAATAGACAAT GCTGGCCATATATATTTAAACC	30 CILCOS 95° 45 seg, 55° 45 seg, 72 45seg	150 pb

Para los marcadores dinucleótidos (D2S123, D5S346, D17S250) se realizó PCR “Touchdown” que involucra una disminución progresiva de la temperatura de annealing en 2°C y una amplificación final a la menor temperatura. El esquema de termociclado fue:

- 1) 94°C 5 min: 1 ciclo.
- 2) 94°C 30seg, 65°C 30seg, 72°C seg: 2 ciclos
- 3) 94°C 30seg, 63°C 30seg, 72°C seg: 2 ciclos
- 4) 94°C 30seg, 61°C 30seg, 72°C seg: 2 ciclos
- 5) 94°C 30seg, 59°C 30seg, 72°C seg: 2 ciclos
- 6) 94°C 30seg, 57°C 30seg, 72°C seg: 2 ciclos
- 7) 94°C 30seg, 55°C 30seg, 72°C seg: 10 ciclos

Este esquema de temperaturas permite eliminar la aparición de bandas inespecíficas durante la reacción de PCR. Para D2S123 y D17S250 la menor



temperatura a la que se realizó la amplificación fue 55° C mientras que para D5S346 la temperatura final de los últimos 10 ciclos fue 57°C.

## **Electroforesis**

El análisis de los productos de PCR se realizó por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida no desnaturizante y tinción con plata.

- Al tratarse de bandas entre 90 y 220 pb se utilizó una concentración de poliacrilamida al 8 % partiendo de una solución al 30%.
- Preparación de la solución del gel de Poliacrilamida:
  - Poliacrilamida al 30%: 3.2 ml
  - Buffer de corrida TBE 5X: 2 ml
  - Agua destilada: 5.5
  - APS (Persulfato de Amonio): 60ul
  - TEMED: 5ul
- Una vez que se agregan los agentes catalizadores APS y TEMED, se mezcla bien la solución para la polimerización homogénea.
- Se agrega un volumen de la solución del gel poliacrilamida entre las placas de vidrio y se deja polimerizar a temperatura ambiente por 30 minutos, usando como control de polimerización la solución de poliacrilamida remanente.
- Una vez formado el gel se retira el peine cuidadosamente y se lavan todos los pocillos ya formados con agua destilada.
- Sumergir el sistema conteniendo el gel polimerizado en su cuba correspondiente para conectarlo luego de la siembra de las muestras a una fuente de poder.
- Se siembran 5 ul de volumen de reacción en cada pocillo cuidadosamente, sin contaminar el pocillo contiguo.
- El sistema corre durante 1 hora a 60 – 80 voltios hasta que desaparece el frente de corrida.

## **Detección**

Como método de detección para el análisis de las bandas se realizó tinción con plata debido a que es 3 veces más sensible que la tinción con Bromuro de Etidio y menos tóxico, detectando de 0,1 a 0,001 ng de ADN por banda.

- Se coloca el gel en una bandeja conteniendo una solución de fijación que contiene etanol al 10% y Ácido acético glacial al 5% durante 30min en agitación constante. Alternativamente el gel puede dejarse en esta solución durante más tiempo o toda la noche.
- Luego se realiza un lavado del gel con agua destilada y se coloca la solución de tinción que contiene Nitrato de Plata al 0,1% durante 15 minutos.
- Se realizan 2 a 3 lavados con agua destilada de 1 minuto cada uno.
- Inmediatamente se coloca el gel en una solución de revelado que contiene NaOH al 1,5%, formaldehído al 0,4%, en agitación constante hasta la aparición de bandas.
- Cuando las bandas alcanzan la intensidad deseada, se agrega una solución para detener la tinción que contiene, ácido acético al 10% durante 5 minutos.
- Los resultados fueron registrados obteniendo una imagen fotográfica con cámara digital bajo el formato jpg.

## **Interpretación**

Para determinar el fenotipo mutador se debe observar una diferencia de peso molecular (PM) en el patrón de bandas obtenido al comparar tejido normal y tumoral de cada paciente lo que indica expansión o acortamiento de las secuencias microsatelitales analizadas.

## Resultados

De los 35 pacientes estudiados, la edad promedio fue 64 años (32 – 90 años). El 57% fue de sexo masculino y el 43 % de sexo femenino.

Con respecto a la ubicación del tumor el 64% fue en Colón izquierdo, el 31% en derecho, y el 5 % restante en colon transverso.

Según la clasificación de estos tumores el 57% de los pacientes resultó Duke's C y el 40% Duke's B. Según el estadio del tumor el 49% se presentó en estadio III, el 45% en estadio II y el 6% en estadio IV.

De acuerdo a la curva de sobrevivencia de la población general estudiada, el 14% de los pacientes murieron antes de los 5 años. **(Gráfico1)**

El 37% de los pacientes tuvieron recaída de la enfermedad, con tumor in situ, metástasis (MTS) hepática, ósea o pulmonar sin alcanzar los 5 años libres de enfermedad incluyendo aquellos que murieron que representan el 39% de este grupo. **(Tabla 1)**

Al analizar la sobrevivencia según la edad de la muestra, el 32% de los pacientes con > 60 años y el 30 % con ≤ 60 años no supero los cinco años libre de enfermedad. **(Tabla 2)**

De los pacientes clasificados como Duke's B cuyo estadio fue II o III, el 28% tuvo recaída de la enfermedad o MTS distal principalmente hepática y por lo tanto el 72% supero los 5 años libres de enfermedad. En cambio de los tumores Duke's C, cuyo estadio fue III o IV, el 41% tuvo recaída o MTS y solo el 59% supero los 5 años libres de enfermedad. **(Tabla 3)**

Al analizar los pacientes que presentaron tumor en colon derecho, el 67% fue de sexo femenino, la edad promedio fue 60 años, el 55% se clasificó como Duke's C y el 18% no superó los 5 años libres de enfermedad.

De los 22 pacientes con ubicación del tumor en colon izquierdo, el 67% fue sexo masculino, la edad promedio fue 66 años, el 60% fue Duke's C y el 37% tuvo recaída antes de los 5 años.

El análisis molecular de los 35 pacientes mostró que solo 4 de ellos presentaron inestabilidad de secuencias microsatélites que representan el 11% de los casos estudiados.

De acuerdo a las características clínicas de estos pacientes, todos los tumores se presentaron en colon derecho y el rango de edad fue 32-68 años. Respecto a la clasificación uno de ellos fue Duke's C en estadio III y los restantes Duke's B en estadio II. La Histología se presentó moderadamente diferenciada. Dos presentaron infiltrado inflamatorio y los dos restantes fueron tumores mucosecretantes de tipo mucinosos. Ninguno de ellos hizo metástasis distal y todos superaron los 5 años libres de enfermedad. **(Tabla 4)**

De acuerdo al análisis de Kaplan-Meier los pacientes con MSI poseen mayor sobrevida que aquellos estables. **(Gráfico 2)**

Además según la clasificación de Duke's, los pacientes con MSI tuvieron mayor sobrevida que aquellos con MSI negativo, en estadio tanto B como C. **(Gráfico 3)**

Al analizar las características moleculares, dos pacientes se presentaron MSI-H positivos para BAT 26, D2S123 y D17S250 y dos MSI-L positivos para D2S123 y D17S250. **(Tabla5)**

Los dos pacientes con MSI-H presentaron un evidente infiltrado inflamatorio y aquellos con MSI-L fueron tumores mucinosos.

Analizando los antecedentes familiares de estos pacientes, dos tenían al menos un miembro de la familia en primer grado con CC y representaron el 5% de los tumores estudiados.

La Figura 1 representa un ejemplo de la electroforesis de productos de PCR en gel de poliacrilamida con tinción con plata, de tejido normal y tejido tumoral de 2 pacientes, positivos para BAT 26 y D17S250 que demuestra acortamiento de las secuencias en tejido tumoral debido a una disminución del peso Molecular (PM) de las bandas.

**Tabla 1:** Características demográficas de los pacientes.

	Nº	%
Total N° de pacientes	<b>35</b>	100
<b>Sexo</b>		
Masculino	20	57
Femenino	15	43
<b>Edad (media)</b>	<b>64</b>	
< 60 años	13	37
> 60 años	22	63
<b>Ubicación del tumor</b>		
C. derecho	11	31
C. izquierdo	22	64
C. Trasverso	2	5
<b>Histología</b>		
Buena	2	6
Moderada	31	88
Pobre	2	6
<b>Clasificación</b>		
Duke's B	14	40
Duke's C	20	57
Duke's D	1	3
<b>Estadío</b>		
IV	2	6
III	17	49
II	16	45
<b>MTS</b>	13	37
<b>Fallecidos</b>	5	14

**Tabla 2:** Sobrevida libre de enfermedad con relación a la edad.

	Más de 5 años	Menos de 5 años	Total
> 60 años	15 (68%)	7 (32%)	<b>22</b>
< 60 años	9 (70%)	4 (30%)	<b>13</b>

**Tabla 3:** Seguimiento en años de pacientes con Cáncer Colorectal que recibieron quimioterapia adyuvante

	DUKE'S B	DUKE'S C
<b>Total N° Pacientes</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
<b>&lt; de 5 años de sobrevida libre de enfermedad (Metástasis, recaída o muerte)</b>	4	10
<b>&gt; 5 años de sobrevida libre de enfermedad.</b>	11	10

**Tabla 4:** Características clínicas e histopatológicas de los pacientes que presentaron Inestabilidad de secuencias microsatelitales

<b>N<sup>a</sup></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Edad</b>	68	32	50	62
<b>Ubicación</b>	<b>C.derecho</b>	<b>C.derecho</b>	<b>C.derecho</b>	<b>C.derecho</b>
<b>Histología</b>	Moderd.	Moderd.	Moderd.	Moderd.
<b>Duke's</b>	B	C	B	B
<b>Estadío</b>	2	3	2	2
<b>Mucinosos</b>	no	no	si	si
<b>Inf Inflamatorio</b>	si	si	no	no
<b>MTS distal</b>	no	no	no	no
<b>Sobrevida</b>	> 5	> 5	> 5	> 5
<b>Antecedentes Familiares*</b>	si	no	si	no

\* Se considera como antecedentes familiares al menos un individuo relacionado en primer grado con el paciente estudiado que tuvo Cáncer de Colon

**Tabla 5:** Características moleculares de los pacientes que presentaron Inestabilidad de secuencias microsatelitales.

<b>N<sup>a</sup></b>	<b>BAT25</b>	<b>BAT26</b>	<b>D2S123</b>	<b>D5S346</b>	<b>D17S250</b>	<b>MSI</b>
<b>1</b>	<i>post</i>	<i>post</i>	<i>post</i>	neg	<i>post</i>	MSI-H
<b>2</b>	neg	<i>post</i>	neg	neg	<i>post</i>	MSI-H
<b>3</b>	neg	neg	neg	neg	<i>post</i>	MSI-L
<b>4</b>	neg	neg	<i>post</i>	neg	neg	MSI-L

**Figura1.** Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante.

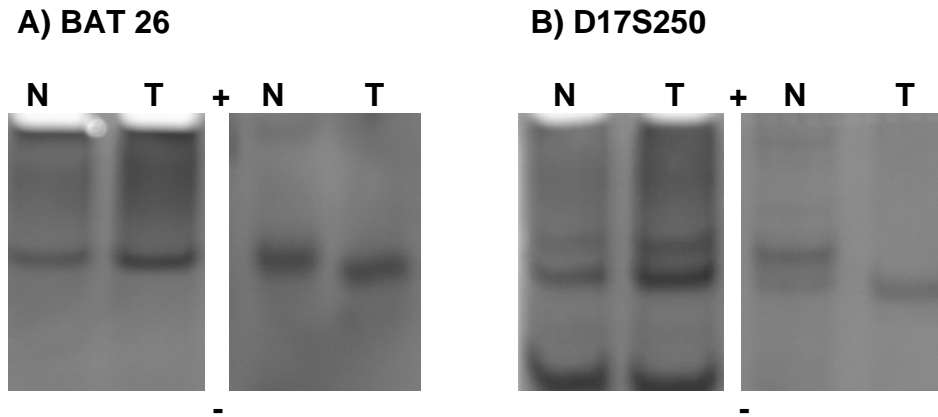


Figura1: Electroforesis de productos de PCR en gel de poliacrilamida con tinción con plata, de tejido normal (N) y tejido tumoral (T) de cada paciente.

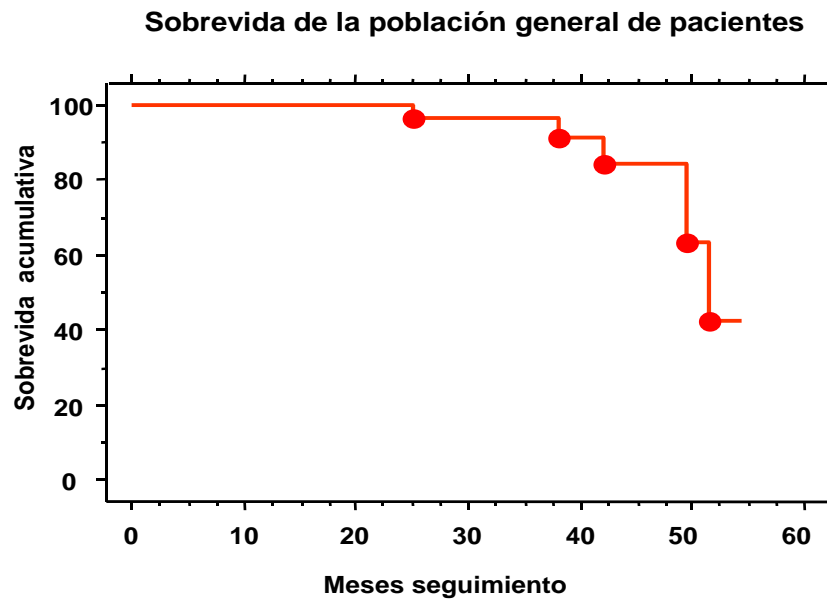
**A)** Para BAT26 al comparar ambos tejidos se observa MSI negativo para el paciente 1 en donde no hay diferencias de peso molecular (PM) de las bandas y MSI positivo en el paciente 2 que muestra una banda de menor PM en tejido tumoral e indica acortamiento de la secuencia.

**B)** Corresponden a productos de PCR Touchdown y se observa MSI negativo para el marcador D17S250 en el paciente 1 y MSI positivo en el paciente 2 donde la presencia de una única banda y de menor PM en tejido tumoral indica acortamiento de las secuencias de ambos alelos.

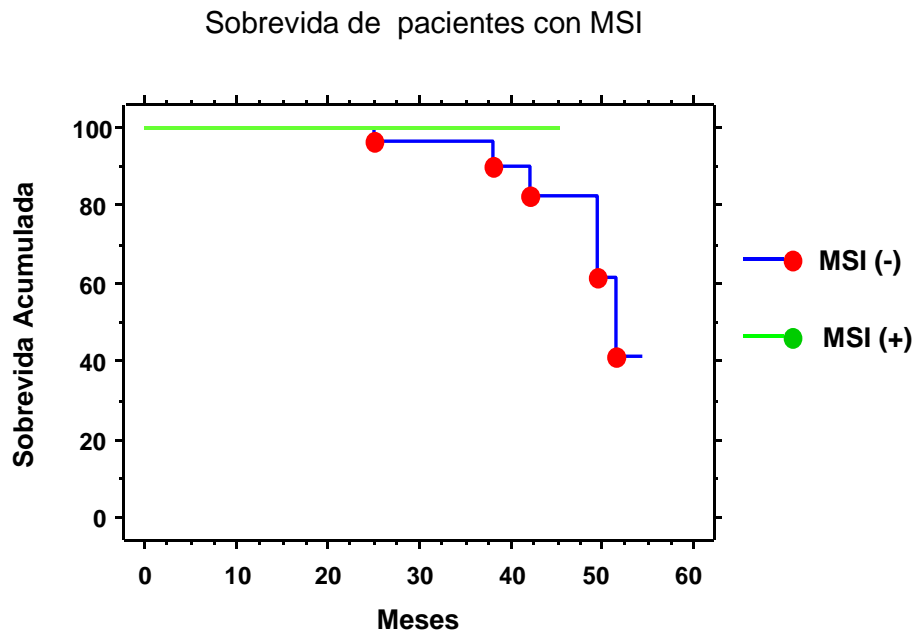
\* Para D17S250 se observan dos bandas como producto de PCR debido a que estas secuencias microsatelitales son altamente polimórficas.



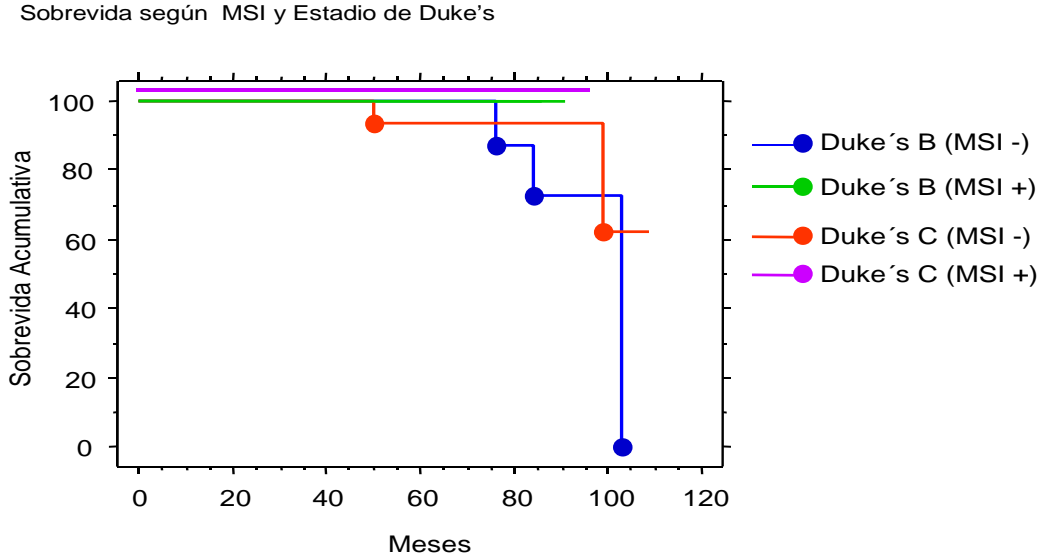
**Gráfico 1:** Curva de Sobrevida Kaplan-Meier de la población estudiada.



**Gráfico 2:** Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de pacientes con MSI



**Gráfico 3:** Curva de Sobrevida de Kaplan-Meier de pacientes con MSI según la clasificación de Duke's.



## Discusión

El Cáncer de Colon es el resultado de la progresión y acumulación de mutaciones de oncogenes, genes supresores de tumores y genes encargados de la reparación del ADN. (7,8) Más del 80% de los tumores en CCNPH que cumplen con los criterios de Bethesda y aproximadamente entre el 10 - 15% de los tumores esporádicos exhiben el fenotipo mutador que se define como MSI y esta asociado con alteraciones de los genes de reparación llevando a una pérdida o ganancia de la unidad repetitiva de secuencias microsatelitales que se encuentran a lo largo del todo el genoma (35). Un panel de referencia de cinco marcadores permite el estudio molecular de los tumores al comparar con tejido normal del mismo individuo.

De nuestra población estudiada, sus características fueron, la mayoría de los pacientes de sexo masculino y con mas de 60 años.

Al analizar la ubicación del tumor, parece convertirse en un factor pronóstico importante ya que de acuerdo a nuestros resultados de los pacientes con tumor en colon derecho el 18% no supero los 5 años libres de enfermedad versus el 37% de los pacientes que presentaron el tumor en colon izquierdo.

Según la clasificación de Duke's y considerando que es otro factor pronóstico relevante, la mayoría fue C en estadío III o IV y se observó que el 41% tuvo recaída o MTS y no superó los 5 años versus el 28 % con Duke's B.

La edad aunque si se considera un factor pronóstico (12), en nuestro estudio no parece mostrar tanta relevancia ya que el porcentaje de pacientes que

no supero los 5 años libre de enfermedad fue similar al comparar ambos grupos. **(tabla2).**

Luego de la caracterización molecular de estos tumores se observó que aquellos que presentaron MSI, en su mayoría fueron de sexo femenino y acorde a la bibliografía, mostraron predilección por el colon derecho, características histológicas de tumores mucinosos, prominente infiltrado linfocitario excepto la histología que en nuestros pacientes fue moderadamente diferenciada. (2,4,14,27,37)

La bibliografía sugiere además que estos tumores con MSI raramente hacen metástasis y poseen mayor sobrevida, lo que coincide con nuestros resultados luego de analizar las curvas de sobrevivencia. Los pacientes superaron los 5 años, independientemente de los factores pronóstico clínicos clásicos aunque es necesario destacar que para validar estos resultados debemos contar con un mayor número de pacientes. (2, 14, 27, 37, 39)

De acuerdo a los antecedentes familiares, dos de los pacientes que presentaron MSI, poseían al menos un miembro de la familia relacionado en primer grado con Cáncer de colon y si bien no fueron considerados como CCHNP ya que no cumplían con los criterios de Ámsterdam y Bethesda, no puede evitarse mencionar que existiría un componente hereditario debido a los individuos relacionados en primer grado y por lo tanto estas ventajas en la sobrevida dada por MSI podrían aplicarse a los casos familiares además de los casos esporádicos. Se debe tener en cuenta que identificar pacientes con CCHNP tiene potenciales beneficios para la detección temprana de CCR y la reducción de la mortalidad en individuos relacionados.

Dentro de las características histopatológicas distintivas de estos tumores los dos que presentaron MSI –H poseían un marcado infiltrado inflamatorio mientras que los que fueron MSI-L eran de tipo mucinosos.

Estas características podrían tenerse en cuenta para analizar diferencias histopatológicas y genéticas entre tumores con MSI-L y MSI-H que quizás en un futuro próximo podrían tener alguna implicancia terapéutica. (40)

Es importante destacar que los pacientes positivos para MSI, recibieron el mismo tratamiento con 5-Fluorouracilo y Leucovorin como terapia Adyuvante y aunque todos superaron los 5 años de sobrevida, estudios recientes determinaron que pacientes con MSI-H, tanto esporádicos como CCNPH responden de manera diferente a la quimioterapia adyuvante (37). Ribic y colaboradores demostraron que en CCR en estadio II y III, los pacientes con MSI tuvieron mejor pronóstico en el grupo que no recibió 5 fluorouracilo y que aquellos con MSI- L o estables tuvieron mayor tendencia a mejorar con la quimioterapia. (4) Por lo tanto la caracterización molecular de aquellos pacientes con CCR tendría cierta implicancia clínica con respecto a la selección de la terapia adyuvante.

El estudio de los marcadores moleculares puede identificar pacientes que podrían o no beneficiarse con la quimioterapia pero la detección de los mismos por métodos moleculares necesitan ser estandarizados y validados. (4,37)

De esta forma vemos que además de la dieta, el estilo de vida y los factores medio ambientales, los marcadores genéticos juegan un importante rol en la predisposición al CC, en su iniciación y progresión.

Aunque existen diferencias según el estadio del tumor y los beneficios permanecen aún controvertidos, determinar el perfil molecular del tumor podría convertirse en un marcador pronóstico útil. (4,19,37)

Es importante destacar que de los 5 marcadores utilizados para el estudio, de los cuales sabemos que son polimórficos entre pacientes pero se heredan de manera estable, predominó D17S250 en los que mostraron inestabilidad de secuencia, lo que podría convertirse en un marcador de población si analizáramos mayor número de pacientes

### **Conclusión**

Disponer del análisis molecular es de gran utilidad para la detección precoz y tiene ya aplicaciones clínicas en el Cáncer de Colon familiar.

Estudios randomizados y un mayor número de pacientes son necesarios para poder determinar el valor predictivo en cada etapa de la enfermedad, ya que no están establecidas las diferencias según el estadio del tumor al diagnóstico

En resumen, el estudio de la inestabilidad en secuencias microsátélites ofrece perspectivas de aplicación clínica a varios niveles que incluyen el estudio familiar de posibles individuos relacionados asintomáticos, su utilidad como factor pronóstico y para el diseño de nuevas terapias específicas.

## Anexo 1

### **Criterios de Amsterdam Modificados (2000)**

- *Tres familiares relacionados con CCR, uno relacionado en primer grado con los otros dos y con las dos últimas generaciones afectadas, uno o mas diagnosticado antes de los 45 años*
- *Dos casos de CRC relacionados en primer grado y uno tercero con otra neoplasia o cáncer de endometrio.*
- *Tres tumores relacionados con CCNPH (CCR, endometrio, intestino grueso, uretra o pelvis renal) de los cuales uno esta relacionado en primer grado con otro y están afectadas las dos generaciones seguidas. Uno esta diagnosticado antes de los 50 años.*

### **Criterios de Bethesda (2000)**

- *Individuos con cáncer cuyas familias cumplan con los criterios de Amsterdam.*
- *Individuo con dos cánceres relacionados a CCNPH incluidos cánceres extracolónicos*
- *Individuo con CCR y un familiar en primer grado con CCR y/o un cáncer extracolónico relacionado con CCNPH y/o un adenoma colorectal. Uno de los cánceres diagnosticado antes de los 45 años y el adenoma antes de los 40 años.*
- *Individuo con CCR o Cáncer de endometrio diagnosticado antes de los 45 años.*
- *Individuo con CCR derecho con patrón indiferenciado antes de los 45 años.*
- *Individuo con CRC de células en anillo antes de los 45 años.*
- *Individuo con adenomas diagnosticado antes de los 40 años.*

## Bibliografía

1. Parkin D M. Global cancer statics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543.
2. Rowley P.T. Inherited Susceptibility to Colorectal Cancer *Annu Rev Med* 2005; 56: 539-554.
3. Taquin W. Implementing screening for colorectal cancer. *Brit Med J* 1999; 319: 1212-3.
4. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ et al. Tumor Microsatellite-Instability Status as a predictor of Benefit from Fluorouracil-Based adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:247.
5. Matzakos T, Lawrence SP, Ahnen DJ. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Up to Date* 2003.
6. Pharoah PDP, and Calas C. Molecular genetics and the assessment of human cancers. *Expert reviews in molecular medicine* 1999; 1(9): 1-22
7. Lengaver; Kinzler K. and Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nat* 1998; 396: 643-649.
8. Janin N. A simple model for carcinogenesis of colorectal cancer microsatellite instability. *Adv in Cancer Research* 2000; 77: 189-221.
9. A. de la Chapelle. Genetic Predisposition to Colorectal Cancer. *Nature Reviews* 2004; 4: 769-779.
10. Fearon & Vogelstein. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
11. Leslie A, Carey F A, Pratt N R and Steele R J C. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surgery* 2002; 89: 845-860
12. Davies RJ, Miller R and Coleman N. Colorectal Cancer Screening: Prospects for Molecular Stool Analysis. *Nature Rev Cancer* 2005; 5:199-209.
13. Fearon E. K-ras gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1978-1980.



14. Pasche B, Mulcahy M, and Benson Al. B. Molecular markers in prognosis of colorectal cancer and prediction of response to treatment. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 2002; 16 (2): 331-345.
15. Lane DP. Cancer. p-53, guardian of the genome *Nature*.1992;58:15-6.
16. Schilsky R, Minsky B, Hoff P. Cancer of the colon. In: DeVita V. Hellman S, Rosenberg S. *Cancer Principles & Practice of Oncology*, 6<sup>a</sup> ed, Philadelphia, Lippincott, 2000; 1216-1319.
17. Loeb LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994;54:5059-5063.
18. Wooster R, Cleton J, Collins N, et al: Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancer. *Nat Gen* 1994; 6: 152-6.
19. Ward R, Meacher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wur R, Hawkins N. Microsatellite Instability and the clinicalpathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 2001; 48:821-829.
20. Aaltone L. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-7.
21. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359:235-237.
22. Burt RW, Disorio JA, Cannon-Albright L. Genetics of Colon Cancer: Impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995; 46: 471.
23. Cottrell, Bic Knell D, Kaklamanis L, Bodmer WF. Molecular Analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992; 340: 626-630.
24. Spirio L, Olschwang S, Groden J. Alleles of the APC gene: An Attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993: 75:951
25. Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JP, Launomen V and Aaltonen LA. Microsatellite Marker Analysis in Screening for Hereditary Nonpoliposis colorectal Cancer( HNPCC). *Cancer Res* 2001; 61:4545-4549.

26. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnild M, Khanduja K, et al. Screening for The Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). *N Engl J Med* 2005; 352: 1851-1860.
27. Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancers. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.
28. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993; 262:1734-1737.
29. Shibata D, Peinado M, Ionov Y, et al. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Gen* 1994; 6: 273-81.
30. Laurent-Puig L, Olschwang S, Delattre O, Validire P, Melot T, Mosseri V, Salmon RJ, Thomas G. Association of *Ki-ras* mutation with differentiation and tumor-formation pathways in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1991;49:220-223.
31. Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-4878.
32. Lynch H, Lynch J. Genetic of colonic cancer. *Digestion* 1998; 59: 481-501.
33. Juul W, Khan M, Vasen H, et al. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 511-7.
34. Muc R and Naidoo R. Microsatellite Instability in diagnostic pathology. *Curr Diag Pathol* 2002; 2:318-327.
35. Jeong SY, Shin, K, Shin J et al. Microsatellite Instability and Mutations In DNA Mismatch Repair Genes in Sporadic Colorectal Cancers. *Dis Colon Rectum* 2003;46(8):1069-1077.
36. Rodríguez M, Boland R, Rhamilton S, et al: A national cancer institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and beheads guidelines. *J Natl Canc Inst* 1997; 89: 1758-1762.

37. Gervaz P, Bucher P and Morel P. Two Colons- Two cancers: Paradigm Shift and Clinical Implications. *J Surg Oncol* 2004; 88: 261-266.
38. Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JP, Launonen V and Aaltonen LA. Microsatellite Marker Analysis in Screening for Hereditary Nonpoliposis colorectal Cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001; 61:4545-4549.
39. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, and Hawkins N. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 2001; 48:821-829.
40. Luceri C, DeFilippo C, Guglielmi F, Caderni G, Messerini L, Biggeri A, Mini E, et al. Microsatellite instability in a population of sporadic colorectal cancers: correlation between genetic and pathological profiles. *Digest Liver Dis* 2002; 34:553-559