

## Síndrome de Lynch: Caracterización genética clínica. Caso clínico

Alejandro Zárate<sup>1</sup>, Karin Álvarez<sup>1,3</sup>, Ana María Wielandt<sup>1,3</sup>,  
Montserrat Hevia<sup>2</sup>, Marjorie De la Fuente<sup>2</sup>, Pilar Carvallo<sup>2</sup>,  
Francisco López-Köstner<sup>1,3</sup>.

### *Hereditary non-polyposis colorectal cancer. Report of four siblings*

*Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) or Lynch Syndrome is an autosomic dominant syndrome involving 5%-10% of colorectal cancer patients. Mutations in MLH1 and MSH2 genes account for most cases. These two genes participate in the DNA mismatch repair pathway. Therefore mutation carriers show microsatellite instability (MSI) in tumors. This syndrome is characterized by the early development of colorectal cancer (before 50 years) and an increased incidence of cancer in other organs. We report four siblings from a family diagnosed with HNPCC. All of them were subjected to colonic surgery for colorectal cancer. Moreover, one patient developed an ampulloma after her colon surgery. The molecular-genetic analysis revealed three brothers with microsatellite instability in the tumor tissue, the absence of the MLH1 protein, and the presence of a germ line mutation localized in intron 15 of the MLH1 gene (Rev Méd Chile 2008; 136: 757-62).*

**(Key words:** Colorectal neoplasms, hereditary nonpolyposis; MLH1 protein, human; MSH2 protein, human)

Recibido el 6 de junio, 2007. Aceptado el 2 de octubre, 2007.

Estudio financiado por Proyecto Fondecyt # 1040827.

<sup>1</sup>Departamento de Cirugía Digestiva, Facultad de Medicina, <sup>2</sup>Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. <sup>3</sup>Unidad Coloproctología, Clínica Las Condes.

El cáncer colorrectal se encuentra entre las primeras causas de muerte en la mayoría de los países desarrollados<sup>1</sup>. Una fracción del total de casos que padecen de este cáncer se encuentra asociado a síndromes con carácter familiar o hereditario<sup>2</sup>, dentro de este grupo el más frecuentemente encontrado es el cáncer colorrectal hereditario no poliposo (HNPCC) también deno-

minado síndrome de Lynch<sup>3</sup>. El HNPCC se caracteriza por un comienzo temprano de cáncer colorrectal (antes de los 50 años) y una incidencia aumentada de cáncer en otros órganos tales como endometrio, estómago, ovario, intestino delgado, tracto hepatobiliar, pelvis renal, uréter, piel y cerebro<sup>4</sup>. Este síndrome hereditario es causado por mutaciones en la línea germinal de los genes MLH1, MSH2 y MSH6, principalmente. Estos genes codifican para enzimas que participan en el sistema de reparación de errores del ADN<sup>5</sup>, es por ello que la carencia de la expresión de estos genes está asociada a una inestabilidad microsatelital (MSI) en los tumores.

*Correspondencia a:* Dr. Francisco López Köstner. Unidad de Coloproctología, Clínica las Condes. Lo Fontecilla 441, Las Condes, Santiago. Teléfono: 4888101. Fax: 4888129. E mail: flopez@clinicalascondes.cl

La detección de familias sospechosas de ser portadoras de un HNPCC se realiza a través de criterios clínicos de selección internacionales, como son los establecidos en las reuniones de Amsterdam<sup>6</sup> y Bethesda<sup>7</sup>. El criterio de Amsterdam se basa en la selección de familias que incluyen al menos tres familiares en primer grado afectados con cáncer colorrectal (y cánceres asociados a HNPCC), todo ello en dos generaciones sucesivas, además al menos uno de los casos debe haberse presentado antes de los 50 años. Debido al alto grado de estrictez que presenta este criterio, para el cual no todos los pacientes tienen la información adecuada para completar los requisitos establecidos, es que se utilizan los criterios de Bethesda los cuales son más flexibles, ya que considera sólo al paciente afectado. El paciente seleccionado con este último criterio es posteriormente analizado por la técnica de inestabilidad microsateletal. Ambos criterios de selección han sido creados para favorecer el éxito en la búsqueda de mutaciones en los genes reparadores del ADN anteriormente nombrados. Como parte de un estudio retrospectivo de un registro de pacientes con variantes hereditarias

de cáncer colorrectal realizado en la Pontificia Universidad Católica de Chile<sup>8</sup>, identificamos una familia con cuatro hermanos en la cual todos fueron operados por neoplasias colorrectales.

CASO CLÍNICO

La familia identificada desde el registro está compuesta por cuatro hermanos, con la existencia de numerosos casos de cáncer colorrectal, incluyendo a la madre y la abuela de estos cuatro hermanos (Figura 1).

El primer paciente, de sexo masculino, se realizó a los 42 años una colonoscopia donde se evidenció un tumor de colon derecho, la biopsia endoscópica confirmó un adenocarcinoma y el estudio de diseminación fue negativo. Producto de este hallazgo, al paciente se le realizó una colectomía total con ileo-recto-anastomosis. El estudio anatomopatológico confirmó un adenocarcinoma mal diferenciado con metástasis ganglionares por lo que se indicó quimioterapia. Después de 6 años de seguimiento no evidenció recidiva de su tumor ni desarrollo de otros tumores.

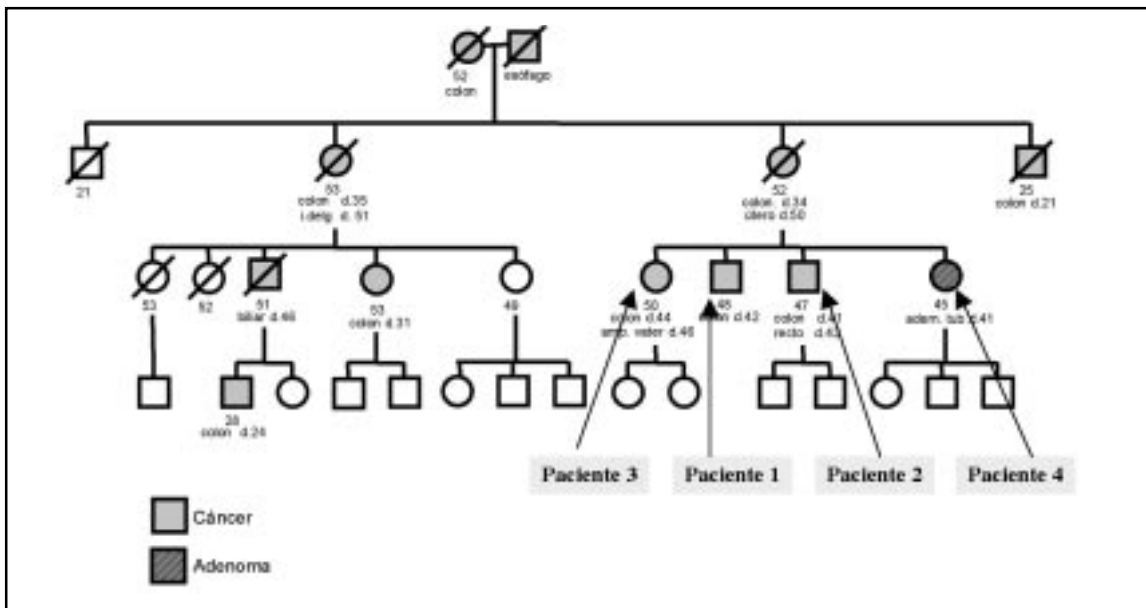


Figura 1. Genealogía de la familia HNPCC. Las flechas indican los casos estudiados. Bajo cada sujeto se indica el cáncer y edad de diagnóstico, edad actual o de fallecimiento. O: mujer; □: hombre; ∅/∅: fallecido. (d) = edad de diagnóstico de la patología nombrada.

Frente a la sospecha de un síndrome de Lynch se le planteó al caso índice, la necesidad de practicar un estudio colonoscópico a todos sus hermanos (en el año 2000 aún no se contaba con la posibilidad de realizar estudio genético en Chile). Al estudio acudieron sólo las dos hermanas, una de las cuales presentó una colonoscopia normal y la otra la presencia de un pólipo adenomatoso de 6 mm en el colon sigmoides, el cual fue resecado.

Su hermano consultó 10 meses después, por un cuadro de seis meses de evolución, caracterizado por un cambio de hábito intestinal asociado a la presencia de mucosidades en las deposiciones. Mediante una colonoscopia se le detectó un tumor de recto a 9 cm del margen anal, cuya endosonografía rectal demostró una lesión uT3N+. Además, el paciente poseía un tumor de colon derecho. Posterior a su diagnóstico fue sometido a quimiorradioterapia preoperatoria. A los 42 años, se le realizó una panproctocolectomía, reservorio ileal e ileostomía en asa. Posteriormente se cerró la ileostomía sin complicaciones. El estudio anatomopatológico confirmó un adenocarcinoma mal diferenciado. Después de 5 años de seguimiento, no presentó recidiva ni desarrollo de otros tumores.

La hermana a quien se le había resecado el pólipo en el colon sigmoides, no se presentó a control acudiendo sólo 2 años después a éste. En la colonoscopia se encontró un tumor polipoideo ligeramente ulcerado en el colon derecho (2 cm de diámetro). La biopsia fue compatible con adenocarcinoma y el estudio de diseminación resultó negativo. A los 44 años, esta paciente se realizó una colectomía total con íleo-recto anastomosis. El estudio anatomopatológico confirmó un adenocarcinoma moderadamente diferenciado (pT2N0M0). Tres años después de la operación, se pesquisó en esta paciente un tumor de la ampolla de Vater, por lo que se sometió a una duodeno-pancreatectomía a los 47 años. Controles posteriores en el seguimiento no mostraron recidiva de ninguno de sus tumores.

La cuarta hermana, de 41 años, fue sometida a un nuevo control colonoscópico al año siguiente y se encontró un pólipo adenomatoso en el colon derecho, que no se logró resear endoscópicamente. La biopsia mostró un adenoma, pero dado los antecedentes recientes de sus hermanos, se optó por una colectomía total profiláctica laparoscópica. El estudio anatomopatológico confirmó la

presencia de un adenoma tubular con displasia moderada.

Con el fin de analizar si el manejo clínico y el tratamiento de los pacientes de esta familia sospechosa de HNPCC se correlacionaba con la presencia de una mutación en la línea germinal, se propuso realizar estudios genéticos para los genes MLH1 y MSH2, así como también estudiar la inestabilidad microsatelital en el tumor. Estos análisis permitirían desarrollar un mejor seguimiento de los pacientes e individuos asintomáticos de alto riesgo de esta familia.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis de inestabilidad microsatelital (MSI) se realizó en muestras de los tumores colorrectales obtenidas desde cada uno de los hermanos. Este análisis incluyó los marcadores microsatelitales establecidos en el panel de referencia para HNPCC: mononucleótidos BAT25 y BAT26, además de los dinucleótidos D5S346, D2S123 y D3S1029<sup>9</sup>. Para ello se extrajo ADN de la muestra tumoral desde bloques de parafina mediante digestión con proteinasa K<sup>10</sup>. Brevemente, a partir del taco de parafina se obtienen cortes de 8 micrones de espesor. El tejido tumoral es reconocido por tinción con hematoxilina-eosina y se procede a obtener un raspado de células desde un portaobjeto sin tinción mediante el uso de un bisturí limpio. Las células se incuban con proteinasa K (200 ug/ml) por 48 a 72 h y tras purificación etanólica del ADN se utiliza 1 µl de éste para la reacción de amplificación por PCR. Con el fin de poder comparar los patrones de migración entre ADN tumoral y ADN normal, se extrae ADN normal de cada paciente desde linfocitos de sangre periférica<sup>11</sup>. Se realiza un PCR radioactivo con 0,05 µCi de <sup>32</sup>P-α-dCTP por 40 ciclos, a una temperatura de hibridación de 55°C y 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> utilizando los partidores específicos para cada marcador microsatelital<sup>12</sup> en un volumen total de 25 µl. Los productos del PCR radioactivo se separan en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%/urea 8 M con *buffer* de corrida TBE que luego son secados y visualizados por autorradiografía. Se considera que un tumor es altamente inestable cuando presenta dos o más marcadores positivos, es decir, que presentan cam-

bios de longitud, debido a inserciones o desapariciones de una unidad repetitiva en una región del microsatélite y estable si no presenta cambios de longitud en ninguno de los 5 marcadores.

Por otra parte, se realizó una evaluación de la expresión de las proteínas MLH1 y MSH2 a través de inmunohistoquímica<sup>13</sup>. La búsqueda de mutaciones en los genes MLH1 y MSH2 se llevó a cabo a través de la técnica de conformómeros de hebra simple (SSCP, *single strand conformer polymorphisms*) y posterior secuenciación automática del ADN<sup>14</sup>. El análisis funcional de los efectos de la mutación se realizó a partir de la extracción de ARN total a partir de linfocitos de dos de los pacientes usando el *kit* comercial Trizol (Gibco BRL Life Technologies) según las indicaciones recomendadas en el protocolo comercial. El ADN complementario (cADN) se sintetizó a partir del ARN total por transcripción reversa y amplificación por PCR (RT-PCR) el cual fue secuenciado en forma automática para determinar la presencia o ausencia del *splicing* alternativo. Para el estudio se pidió el consentimiento informado de cada uno de los pacientes.

#### RESULTADOS

El análisis genético molecular reveló el cambio c.1731+3A>T, que consiste en la sustitución de una adenina por timina en el nucleótido número tres del intrón 15. La mutación fue identificada en los tres hermanos que presentaban cáncer colorrectal y no así en el paciente con pólipo adenomatoso. El análisis funcional de esta mutación indicó que este cambio nucleotídico presente en el intrón del gen MLH1 tenía un efecto en el *splicing* del ARN mensajero, produciendo la pérdida del exón 15 completo del gen MLH1.

El análisis de inestabilidad microsatelital en los tumores colorrectales de los cuatro hermanos reveló que tres de ellos presentaban un fenotipo inestable (dos o más marcadores positivos). A su vez, el análisis inmunohistoquímico evidenció la ausencia de la proteína MLH1 y la presencia de la proteína MSH2, en estos mismos tumores. Por el contrario, el análisis del pólipo adenomatoso presente en la cuarta hermana demostró ser estable para los 5 marcadores microsatelitales estudiados, presentando además la expresión de ambas proteínas en el tejido tumoral.

#### DISCUSIÓN

En este caso, en nueve años de seguimiento, tres de cuatro hermanos presentaron un cáncer colorrectal (todos operados) y el cuarto caso de sexo femenino se le practicó una colectomía profiláctica. Si bien esta paciente no tenía el diagnóstico preoperatorio de cáncer, el hecho de estar en una familia con HNPCC y tres de sus hermanos haber presentado cáncer colorrectal implica una ansiedad y necesidad de evaluación periódica mediante colonoscopia. El aumento creciente de la ansiedad o la imposibilidad para mantenerse en controles periódicos, han sido motivos mencionados en la literatura para una colectomía profiláctica<sup>15</sup>. Además, cabe destacar que en ese momento no existían las herramientas para realizar un análisis mutacional en nuestro país, por lo tanto, se asumió una conducta de vigilancia clínica sobre estos cuatro hermanos.

En pacientes con HNPCC, la cirugía de elección es la colectomía total e íleo-rectoanastomosis<sup>16,17</sup>, por el mayor riesgo de desarrollar una neoplasia colorrectal sincrónica o metacrónica<sup>18</sup>. El recto remanente se estudia periódicamente mediante un examen endoscópico, ya que el tejido rectal mantiene su riesgo de desarrollar cáncer<sup>19</sup>. El segundo caso, dado que poseía un cáncer de colon y de recto sincrónico, fue sometido a una panproctocolectomía con reservorio ileal, de esta forma se puede extirpar todo el tejido del colon y recto, y sólo dejar una pequeña franja de 2 cm aproximadamente de recto. Al realizar conjuntamente el reservorio, se puede ofrecer al paciente una mejoría en su función intestinal posterior<sup>19</sup>.

El HNPCC o síndrome de Lynch se caracteriza por mutación en uno de los genes reparadores del ADN, los cuales al estar alterados promueven la acumulación de mutaciones en el tumor. Una de las formas de evidenciar la alteración de la función de uno de estos genes es analizando la inestabilidad de los marcadores microsatélites en el genoma. El estudio mutacional demostró una alteración genética en el intrón 15 del gen MLH1, la cual fue demostrada como patogénica, ya que provoca una delección completa del exón 15 en el ARN mensajero. El exón 15 de MLH1 codifica para un dominio de interacción<sup>20</sup> con otras proteínas reparadoras alterando el funcionamiento de este sistema de reparación. Cabe destacar que esta

mutación no ha sido descrita previamente en la literatura. Esta mutación fue detectada en los tres individuos con cáncer colorrectal, sin embargo, el cuarto caso, quién no desarrolló cáncer colorrectal, no es portador de la mutación identificada. El genotipo observado en estos cuatro hermanos se correlaciona con los resultados obtenidos en el estudio de inestabilidad microsateletal y en el análisis inmuistoquímico, ya que, observamos un fenotipo de inestabilidad y pérdida de la proteína MLH1 sólo en los tejidos de los pacientes afectados con cáncer y con mutación identificada en el gen MLH1.

Los pacientes afectados pueden desarrollar múltiples tumores, siendo el más frecuente el desarrollo de un cáncer colorrectal y en segundo lugar el cáncer de endometrio. Entre los otros tumores asociados se encuentran el gástrico, de intestino delgado, páncreas, vía biliar, tracto urinario, ovarios, adenoma de glándula sebácea y cerebro<sup>4</sup>. Es por esto que se hace necesario realizar una vigilancia frecuente para detectar en etapas tempranas el desarrollo de cánceres extracolónicos en los pacientes afectados. Estos cuatro

hermanos han sido periódicamente evaluados, y sólo uno de ellos desarrolló un cáncer extracolónico en la ampolla de Vater. Este hecho ha sido el fundamento para que algunos autores ocupen el término de síndrome de Lynch más que de HNPCC.

Desde el momento en que se identificó la mutación en esta familia, la hermana de los pacientes que no es portadora de la misma mutación fue sacada del seguimiento clínico para cáncer colorrectal. Por otra parte, se ha establecido que desde que se realizan estudios genéticos se ha reportado una mayor adherencia para la realización del estudio colonoscópico anual entre personas a las cuales se detecta el estado genético de portador de la enfermedad<sup>21</sup>.

En resumen, la sospecha clínica para la detección de pacientes HNPCC es muy relevante, ya que nos permitirá por un lado la identificación de las mutaciones involucradas en el desarrollo del HNPCC, así como también, realizar un adecuado tratamiento y seguimiento multidisciplinario de la patología, tanto en el paciente índice como en los familiares de alto riesgo.

#### REFERENCIAS

1. PROVENZALE D, GRAY RN. Colorectal cancer screening and treatment: review of outcomes research. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2004; 33: 44-5.
2. STRATE L, SYNGAL S. Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes Control* 2005; 16: 201-13.
3. LYNCH H, DE LA CHAPELLE A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-32.
4. AARNIO M, SANKILA R, PUKKALA E, SALOVAARA R, AALTONEN LA, DE LA CHAPELLE A ET AL. Cancer risk in mutation carriers of DNA mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81: 214-8.
5. PELTOMAKI P, VASEN HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997; 113: 1146-58.
6. 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.
7. RODRÍGUEZ-BIGAS MA, BOLAND CR, HAMILTON SR, HENSON DE, JASS JR, KHAN PM ET AL. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1758-62.
8. FULLERTON DA, LÓPEZ F, RAHMER A. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: surgical treatment and pedigree analysis. *Rev Méd Chil* 2004; 132: 539-47.
9. BOLAND CR, THIBODEAU SN, HAMILTON SR, SIDRANSKY D, ESHLEMAN JR, BURT RW ET AL. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57.
10. SHIBATA DK, ARNHEIM N, MARTIN WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988; 167: 225-30.

11. LAHIRI DK, NURNBERGER JI JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.
12. LOUKOLA A, EKLIN K, LAIHO P, SALOVAARA R, KRISTO P, JARVINEN H ET AL. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001; 61: 4545-9.
13. VELASCO A, RIQUELME E, SCHULTZ M, WISTUBA II, VILLARROEL L, PIZARRO J ET AL. Mismatch repair gene expression and genetic instability in testicular germ cell tumor. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 977-82.
14. BELLOLIO RF, ALVAREZ VK, DE LA FUENTE LM, LEÓN GF, FULLERTON MDA, SOTO DG ET AL. Cáncer colorrectal hereditario: análisis molecular de los genes APC y MLH1. *Rev Méd Chil* 2006; 134: 841-8.
15. MERG A, LYNCH HT, LYNCH JF, HOWE JR. Hereditary colorrectal cancer-part II. *Curr Probl Surg* 2005; 42: 267-333.
16. MECKLIN J, JARVINEN H. Treatment and follow-up strategies in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 927-9.
17. RODRÍGUEZ-BIGAS MA, VASEN HF, PEKKA-MECKLIN J, MYRHOJ T, ROZEN P, BERTARIO L ET AL. Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy: International Collaborative Group on HNPCC. *Ann Surg* 1997; 225: 202-7.
18. LYNCH HT, DE LA CHAPPELLE A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36: 801-18.
19. CHURCH J, SIMMANG C. Practice parameters for the treatment of patients with dominantly inherited colorectal cancer (Familial Adenomatous Polyposis and Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1001-12.
20. GUERRETTE S, ACHARYA S, FISHEL R. The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *J Biol Chem* 1999; 274: 6336-41.
21. WAGNER A, VAN KESSEL I, KRIEGE MG, TOPS CM, WIJNEN JT, VASEN HF ET AL. Long term follow-up on HNPCC gene mutation carriers: compliance with screening and satisfaction with counseling and screening procedures. *Fam Cancer* 2005; 4: 295-300.