

Técnicas de genética y biología molecular para el análisis del cáncer colorrectal hereditario

Palabras clave: cáncer colorrectal, PAF, CCHNP, APC, MLH1, MSH2, análisis genético, biología molecular.

RESUMEN

Los conocimientos adquiridos en genética y biología moleculares a lo largo de las 2 últimas décadas han permitido progresar en el diagnóstico molecular de algunas enfermedades, entre ellas las formas de cáncer colorrectal hereditario como el cáncer colorrectal hereditario no polipósico y la poliposis adenomatosa familiar. El descubrimiento de los genes causantes de estas enfermedades ha tenido, además, repercusiones más allá de las propias enfermedades hereditarias, ya que en muchas ocasiones los mismos genes causantes de las formas hereditarias de cáncer también participan en las formas esporádicas mucho más frecuentes.

El diagnóstico genético permite la confirmación de un diagnóstico clínico, la realización de un diagnóstico presintomático o incluso prenatal, con las consecuencias que ello implica para los pacientes afectados de estas enfermedades hereditarias y sus familias.

GENETIC AND MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR THE ANALYSIS OF HEREDITARY COLORECTAL CANCER

The knowledge acquired in genetics and molecular biology over the last 2 decades has led to advances in the molecular diagnosis of some diseases, among them hereditary forms of colorectal cancer such as hereditary non-polyposis colorectal cancer and familial adenomatous polyposis. Moreover, the discovery of the genes causing these diseases has had implications beyond hereditary diseases since the same genes that cause hereditary forms of cancer also play a role in the much more frequent sporadic forms.

Genetic diagnosis allows clinical diagnosis to be confirmed, as well as presymptomatic and even prenatal diagnoses to be made, with implications for patients with these hereditary diseases and their families.

Correspondencia: Dr. Antoni Castells. Servicio de Gastroenterología. Institut de Malalties Digestives, Hospital Clínic. Villarroel 170. 08036 Barcelona. Teléfono: 93 227 5418; Fax: 93 227 9387. Correo electrónico: castells@clinic.ub.es

Introducción

El cáncer es una de las enfermedades más comunes y graves en el hombre. Los datos estadísticos muestran que un tercio de la población está afectada de alguna forma de cáncer, es causante del 20% de todas las muertes y, en países desarrollados, es causa de más del 10% del gasto sanitario. El diagnóstico y tratamiento tempranos, así como la identificación mediante técnicas de biología y genética moleculares de los individuos con una mayor probabilidad de desarrollarlo antes de que ello ocurra, son objetivos prioritarios de la investigación biomédica actual¹.

El desarrollo del cáncer colorrectal (CCR) comporta una serie de cambios histopatológicos en la mucosa colorrectal bien caracterizados y conocidos, como la secuencia adenoma-carcinoma². Esta progresión es el resultado de una serie de cambios genéticos secuenciales que consisten en la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor^{3,4}, así como cambios epigenéticos⁵.

El CCR es una de las enfermedades más frecuentes en las poblaciones occidentales y la segunda causa de muerte por cáncer. En Europa se diagnostican cada año 215.000 casos nuevos, que ocasionan más de 110.000 muertes. En España, con una incidencia de 30-35 casos por 100.000 habitantes, representa el segundo tumor más frecuente tras el cáncer de pulmón y la segunda causa de muerte por cáncer^{6,7}. El riesgo de desarrollar CCR es del 5% en la población general, aunque esta cifra aumenta exponencialmente con la edad⁸ y es mucho más elevado en individuos con una historia familiar de CCR.

En el CCR existe un gran componente hereditario o familiar, el cual podría ser mayor que en cualquier otra enfermedad humana adulta. Así, se ha estimado que el 20-30% de los casos de CCR afectan a individuos predispuestos genéticamente⁹. Sin embargo, en la actualidad tan sólo un pequeño porcentaje puede atribuirse a un síndrome hereditario específico¹⁰.

Tabla I. **Genes implicados en formas de cáncer colorrectal hereditario**

Síndrome	Gen	Características clínicas
Poliposis adenomatosa familiar	<i>APC</i>	Pólipos adenomatosos colorrectales (>100); ocasionalmente hiperplasia fúndica en estómago y adenomas duodenales
Poliposis adenomatosa familiar atenuada	<i>APC</i> (mutaciones en la región 5') <i>MYH</i> (herencia autosómica recesiva)	Igual que la poliposis adenomatosa familiar excepto en el número de pólipos (< 100)
Síndrome de Gardner	<i>APC</i>	Igual que poliposis adenomatosa familiar, y tumores desmoides u osteomas
Síndrome de Turcot	<i>APC</i> (<i>MSH2</i> en una familia)	Igual que PAF y tumores cerebrales
Cáncer colorrectal	<i>MSH2</i> (~ 40% casos) <i>MLH1</i> (~ 50% casos) hereditario no asociado a poliposis <i>MSH6</i> (7-10% casos) <i>PMS2</i> (raro)	Cáncer colorrectal sin poliposis extensa; también tumores de endometrio y estómago; ocasionalmente tumores uroteliales, hepatobiliares y cerebrales
Síndrome de Peutz-Jeghers	<i>LKB1</i> (<i>STK11</i>) (30-40%)	Pólipos hamartomatosos a lo largo del tracto gastrointestinal; pigmentación mucocutánea; riesgo incrementado de cáncer gastrointestinal y no gastrointestinal
Poliposis juvenil	<i>SMAD4</i> (<i>DPC4</i>) (3~28%, Europa; 35-60% en EE.UU.), <i>BMPR1</i> (40% en Europa) <i>PTEN</i>	Múltiples pólipos hamartomatosos juveniles; incremento del riesgo de cáncer gastrointestinal
Enfermedad de Cowden	<i>PTEN</i>	Pólipos colónicos hamartomatosos, tumores benignos y malignos de tiroides, mama, útero y piel (múltiples tricolemomas)
Síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley	<i>PTEN</i>	Microcefalia, fibromatosis, poliposis hamartomatosa, hemangiomas, pigmentación en el pene

PAF: poliposis adenomatosa familiar.

Los síndromes de CCR hereditario conocidos se subdividen en los asociados o no a poliposis^{11,12}. Los síndromes polipósicos se subdividen a su vez, en función del tipo histológico, en adenomatosos y hamartomatosos. Los síndromes de CCR asociados a poliposis representan el 0,5% del total de casos y los adenomatosos son mucho más frecuentes que los hamartomatosos. Por el contrario, el CCR no asociado a poliposis representa un 1-5% del total. Finalmente, los casos familiares que no corresponden a los síndromes antes descritos constituyen un 20-25% de la totalidad de CCR, aunque esta fracción podría ser mucho mayor según se deduce del estudio de genealogías^{10,13}.

En los últimos años se han identificado muchos de los genes responsables de las distintas formas hereditarias de CCR (tabla I), lo que ha abierto la posibilidad del diagnóstico molecular para este subgrupo de pacientes^{6,14,15}. Dada su mayor prevalencia, la presente revisión se centrará en la poliposis adenomatosa familiar y el CCR hereditario no asociado a poliposis.

Poliposis adenomatosa familiar

La poliposis adenomatosa familiar (PAF) es un síndrome hereditario de predisposición genética al CCR en el cual se desarrollan múltiples adenomas (habi-

tualmente más de 100) distribuidos a lo largo del colon y/o recto. La enfermedad acostumbra presentarse alrededor de los 16 años de edad (rango: 7-36 años) y los pólipos están presentes en más del 95% de los pacientes a los 35 años. Además, la aparición de CCR es inevitable si no se realiza una colectomía profiláctica; la edad media de presentación en los individuos no tratados es de 39 años (rango: 34-43 años). Alrededor del 60% de los pacientes presentan lesiones gastroduodenales asociadas, como poliposis glandular fúndica, pólipos hiperplásicos o adenomas, y es muy frecuente la existencia de lesiones hiperpigmentadas de la retina¹⁶. Se estima que esta enfermedad afecta a uno de cada 15.000 individuos y presenta una penetración prácticamente del 100%.

La PAF se hereda de forma autosómica dominante y está causada por mutaciones en el gen supresor *APC*¹⁷. El gen *APC* es de un tamaño considerable, se compone de 15 exones que codifican para una proteína de 2.843 aminoácidos implicada en la adhesión celular, la transducción de señal y la activación transcripcional.

La PAF es un ejemplo de cáncer hereditario en el cual las variaciones alélicas de un mismo gen dan lugar a una diversidad en el fenotipo (tabla I). Así, se ha descrito una variante denominada poliposis adenomatosa

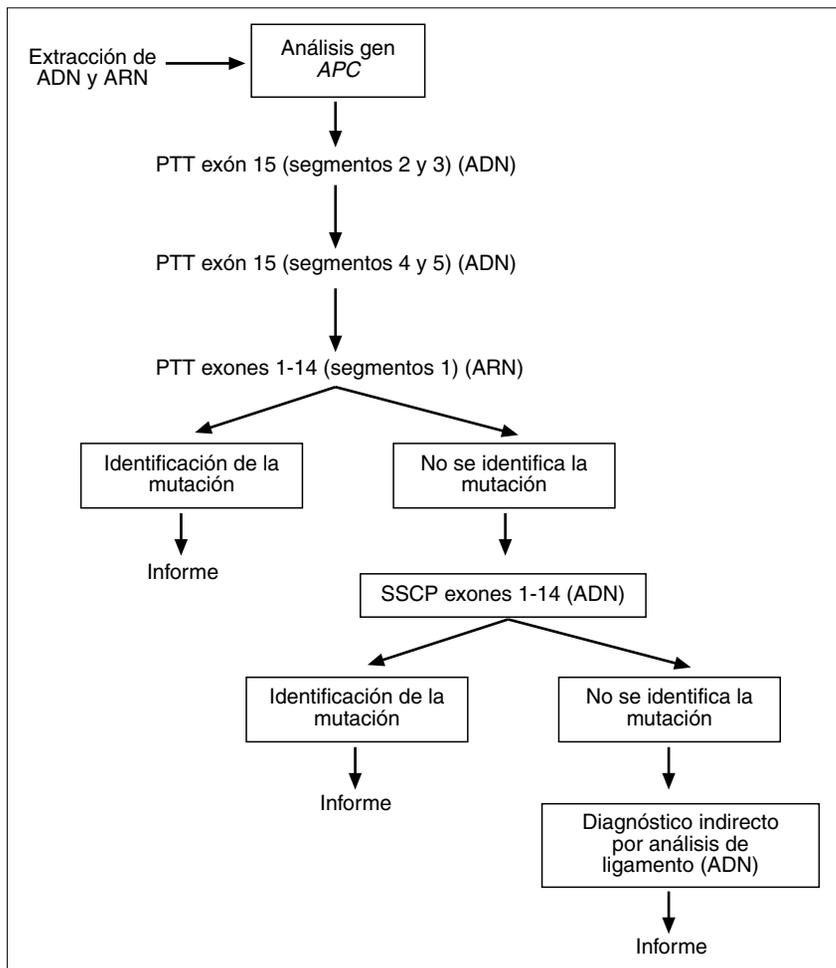


Fig. 1. Estrategia de diagnóstico molecular en la poliposis adenomatosa familiar. PTT: protein truncation test; SSCP: single strand conformation polymorphism.

Tabla II. Rendimiento de las distintas técnicas empleadas en el diagnóstico genético de la poliposis adenomatosa familiar y el cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis*

Método	Sensibilidad
<i>Poliposis adenomatosa familiar</i>	
Secuenciación	> 90%
Análisis de ligamiento	99%
Prueba de la proteína truncada	70-80%
Prueba de la proteína truncada + CSGE + SSCP + secuenciación	80-90%
<i>Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis</i>	
Secuenciación	> 90%
CSGE + secuenciación	> 90%
DOVAM-S (SSCP)	95-100%
Prueba de la proteína truncada	50-65%

CSGE: conformation strand gel electrophoresis; SSCP: single-strand conformation polymorphism testing; DOVAM-S: detection of virtually all mutations-SSCP.

*Adaptada de Giardiello et al¹⁴. Para más información, consúltese: www.genetests.org

familiar atenuada, que se caracteriza por un inicio más tardío y un menor número de pólipos localizados de manera preferente en el colon derecho, y cuya alteración molecular consistiría en la presencia de mutaciones en el extremo 5' del gen APC. Por otra parte, la identificación de APC ha permitido confirmar que el síndrome de Gardner forma parte del espectro clínico de la PAF. En este sentido, se reserva esta denominación para los individuos que presentan lesiones extraintestinales asociadas a la afectación colorrectal. Dado que los pólipos son de tipo adenomatoso, el riesgo de malignización es idéntico al descrito en la PAF. Las lesiones extraintestinales más frecuentes son osteomas en maxilares, cráneo y huesos largos, tumores desmoides, fibromatosis mesentérica y quistes subdentarios. Por último, el síndrome de Turcot es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva inicialmente descrita como la asociación de PAF y tumores del sistema nervioso central. Sin embargo, recientemente se ha descrito la presencia de mutaciones germinales tanto en el gen APC como en un gen responsable de la reparación del ADN (MSH2). Por ello, los tumores del sistema nervioso central deberían in-

clirse entre las lesiones asociadas tanto a la PAF como al CCR hereditario no asociado a poliposis.

En la actualidad, gracias a que se conoce el defecto molecular en el gen *APC*, existe la posibilidad de realizar un análisis genético para la confirmación diagnóstica o la identificación de portadores asintomáticos en familiares con riesgo en el caso de que se conozca la mutación causante en una determinada familia con PAF. Además, existe cierta correlación genotipo-fenotipo en el sentido de que la localización de la mutación en *APC* puede determinar el espectro clínico de la enfermedad¹⁸.

Las técnicas empleadas para el diagnóstico genético de PAF son variadas y incluyen la técnica PTT (*protein truncation test*, prueba de la proteína truncada), que permite detectar la mayoría de las mutaciones identificadas en este gen, las cuales comportan una terminación prematura de la proteína. Otras técnicas empleadas para el cribado mutacional del gen *APC* son SSCP (*single strand conformation polymorphism*), DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), DHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*) y la secuenciación. Además, también pueden aplicarse técnicas como el análisis Southern blot o la técnica MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), que permiten detectar deleciones o duplicaciones en este gen. Por último, existe la posibilidad de realizar un diagnóstico genético indirecto mediante análisis de ligamiento en familias con PAF con más de un miembro afectado mediante marcadores altamente polimórficos del gen *APC* (microsatélites) y así establecer el haplotipo ligado a la enfermedad. Este enfoque, sin embargo, no permite identificar la mutación causante. En la tabla II se muestra el rendimiento de las diferentes técnicas para la detección de mutaciones en el gen *APC*, mientras que en la figura 1 se esquematiza la estrategia de diagnóstico molecular en la PAF que se emplea en nuestro centro.

Recientemente, se han descrito mutaciones germinales en el gen *MYH* en pacientes con múltiples adenomas colorrectales o PAF en los que no se habían identificado mutaciones en el gen *APC*¹⁹. El gen *MYH* está implicado en la reparación del ADN por escisión de bases y actúa para paliar el daño oxidativo al ADN. Este gen parece actuar de forma autosómica recesiva con mutaciones bialélicas necesarias para la expresión del fenotipo, a diferencia de *APC*, que actúa de forma autosómica dominante, y está implicado en una proporción significativa de pacientes con PAF atenuada.

Una vez identificada la mutación patogénica en *APC* o *MYH* en una determinada familia, se ha de ofrecer la posibilidad de diagnóstico de confirmación y/o presintomático al resto de los miembros de la familia siguiendo las pautas correctas del consejo genético (véase más adelante).

Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis

El CCR hereditario no asociado a poliposis (CCHNP) es una enfermedad hereditaria autosómica dominante y corresponde a la predisposición genética más común a desarrollar CCR u otras neoplasias como cáncer de endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, tracto hepatobiliar, tracto urinario superior, cerebro y piel²⁰. El CCHNP constituye entre el 1 y el 3% de los casos de cáncer CCR dependiendo de la población estudiada. En la población española se estima que representa el 2,5%¹⁰. El CCHNP está asociado a mutaciones germinales en genes implicados en la vía de reparación del emparejamiento incorrecto del ADN (*mismatch repair*, MMR), en especial *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Las mutaciones en *MLH1* y *MSH2* son las mayoritarias y suponen alrededor del 90% de las mutaciones identificadas en familias con CCHNP, mientras que las mutaciones en *MSH6* suponen alrededor del 7-10% y las mutaciones en *PMS2* representan menos del 5%. La penetración del CCR asociado a mutaciones en estos genes es del 80% aproximadamente. También se han publicado mutaciones en los genes *MSH3*, *EXO1* y *TGF β 2* en algunas familias con CCHNP, aunque su relevancia clínica no está bien establecida²¹. La base de datos de mutaciones de la International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) (<http://www.insight-group.org>) contiene, en su última actualización, 448 mutaciones identificadas en 748 familias de todo el mundo.

Las causas más habituales de consulta genética por CCHNP son una historia familiar de CCR o neoplasias extracolónicas anteriormente citadas, una historia personal de tumores sincrónicos o metacrónicos y/o la aparición temprana de CCR en ausencia de poliposis.

Debido a la elevada incidencia de CCR, es posible observar una agregación de tumores presumiblemente esporádicos en el seno de una determinada familia sin que eso signifique que nos encontramos ante un caso de CCHNP. De esa manera, debido a que no es factible efectuar el análisis genético en todos los enfermos afectados de CCR, se recomienda hacer una selección clínica minuciosa de las familias con CCHNP previa al análisis molecular basándose en criterios clínicos establecidos. Dado que los criterios de Amsterdam originales²² o revisados²³ son muy específicos pero poco sensibles, se ha propuesto utilizar los criterios de Bethesda²⁴, recientemente revisados²⁵.

Para llevar a cabo el análisis molecular se sigue un algoritmo como el esquematizado en la figura 2. Una vez identificado un caso índice de CCHNP con los criterios clínicos anteriormente mencionados, se procede a efectuar el análisis molecular^{14,26,27}. Si se dispone de muestra tumoral, se pueden utilizar las técnicas de inestabilidad de microsatélites y/o la inmunohistoquímica para las

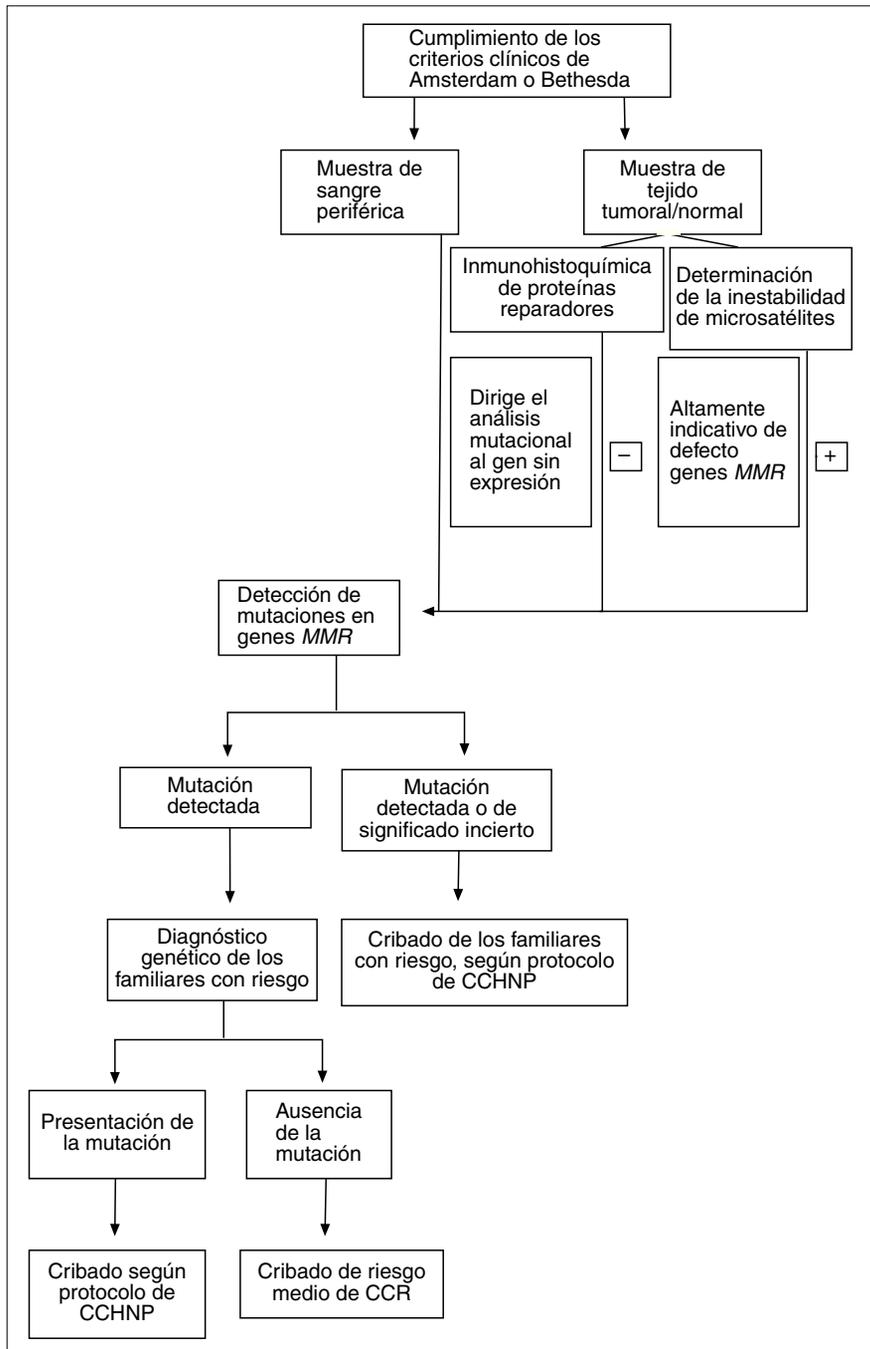


Fig. 2. Estrategia de cribado y diagnóstico molecular del cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis. MMR: reparación del emparejamiento incorrecto del ADN (mismatch repair); CCHNP: cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis; CCR: cáncer colorrectal.

proteínas reparadoras²⁸. A nivel molecular, la inestabilidad de microsatélites constituye un marcador fenotípico del CCHNP aunque no exclusivo, ya que también se puede encontrar en el 7-15% de los tumores CCR esporádicos debido a hipermetilación del promotor de *MLH1* o mutaciones somáticas en algún gen reparador. La inmunohistoquímica para las proteínas reparadoras *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PSM2* en tejido tumoral detecta la presencia o ausencia de la proteína reparadora analizada y, en caso de ausencia, permite dirigir

el análisis molecular posterior. Sin embargo, algunas mutaciones en genes reparadores no dan lugar a la ausencia de la proteína correspondiente. Este análisis puede complementar al análisis de inestabilidad de microsatélites o, incluso, ser una alternativa a éste en los centros que no disponen de laboratorio para la realización de técnicas moleculares. En cuanto al análisis mutacional en los genes reparadores, se realiza mediante la detección de mutaciones germinales en ADN genómico. Actualmente se reco-

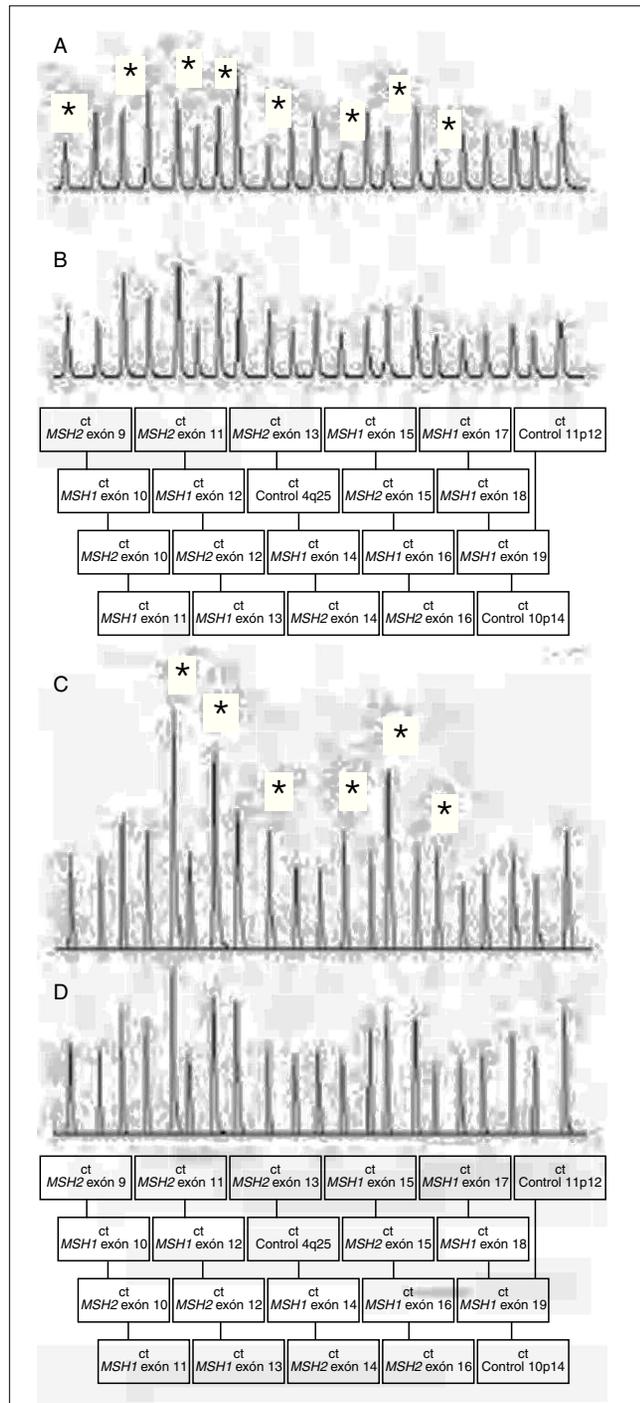


Fig. 3. MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Cromatogramas en muestras con delección de los exones 9 al 16 en MSH2 (A) o duplicación de los exones 11 al 16 en MSH2 (C), y en muestra de controles (B y D). Los asteriscos indican los fragmentos delecionados o duplicados en las muestras A y C.

mienda realizar la detección de reordenamientos genómicos en los genes reparadores antes del cribado de mutaciones concretas, debido a la relativa elevada frecuencia de estas alteraciones en familias con CCHNP y a su simplicidad técnica gracias a la disponibilidad de ensayos rápidos, como la técnica MLPA (fig. 3). En caso de detectar un reordenamiento genómico se obvia el cribado posterior²⁹.

El cribado de mutaciones concretas en los genes reparadores implicados se puede efectuar mediante diversas técnicas (secuenciación completa, PTT, SSCP, DHPLC, DGGE u otras), dependiendo de las preferencias y disponibilidad del laboratorio. Este cribado se suele realizar exón por exón o en varios fragmentos de cada gen reparador y es, por tanto, una técnica costosa y laboriosa. Si no se ha utilizado la secuen-

ciación completa como estrategia de cribado, una vez detectado un patrón anómalo, se debe caracterizar la mutación causante mediante esta técnica en el ADN original. En la tabla II se muestra el rendimiento de las diferentes técnicas para el diagnóstico molecular del CCHNP.

Una vez identificada la mutación patogénica en uno de los genes reparadores en una determinada familia, se ha de ofrecer la posibilidad de diagnóstico de confirmación y/o presintomático al resto de los miembros siguiendo las pautas correctas del consejo genético (véase más adelante).

Consejo genético en el cáncer colorrectal hereditario

Los nuevos conocimientos sobre las causas genéticas del CCR hereditario no sólo tienen importancia para el diagnóstico y el manejo de los pacientes, sino también para la estimación del riesgo de padecer la enfermedad y el consejo genético de las familias.

Es muy aconsejable una evaluación psicológica de los individuos en los cuales se va a proceder al análisis genético con el fin de valorar el impacto que pueden tener sus resultados. Asimismo, la estimación de riesgo mediante pruebas predictivas debe incluir siempre sesiones educativas o de consejo previas llevadas a cabo por personal especializado con el objetivo de informar ampliamente sobre los aspectos hereditarios de la enfermedad, las opciones de diagnóstico genético y sus posibles implicaciones. Del mismo modo, cuando se informe del resultado de la prueba genética debe hacerse con las máximas garantías de claridad y comprensión por parte del paciente, así como realizar una posterior sesión informativa en el caso de una prueba positiva con el fin de resolver cualquier duda referente a la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nusbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genetics in medicine. Philadelphia: WB Saunders; 2001.
2. Morson BC. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med.* 1974;67:451-7.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61:759-67.
4. Coleman WB, Tsongalis GJ. The molecular basis of human cancer. Totowa: Humana Press; 2002.
5. Jubb AM, Bell SM, Quirke P. Methylation and colorectal cancer. *J Pathol.* 2001;195:111-34.
6. Castells A, Marzo M, Bellas B, et al. Guía de práctica clínica sobre la prevención del cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol.* 2004;27:573-634.
7. GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Version 1.0. IARC CancerBase n.º 5. Lyon: IARC Press; 2001. Disponible en: <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>
8. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer.* 1999;83:18-29.
9. Cannon-Albright LA, Skolnick MH, Bishop DT, Lee RG, Burt RW. Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers. *N Engl J Med.* 1988;319:533-7.
10. Piñol V, Andreu M, Castells A, et al, and Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. 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.
11. Castells A, Harada H, Rustgi AK. Colorectal cancer. En: Brenner S, Miller JH, editors. *Encyclopedia of genetics.* London: Academic Press; 2001. p. 422-3.
12. Castells A, Piqué JM. Tumores del intestino. En: Farreras V, Rozman C, editores. *Medicina interna.* 15.ª ed. Madrid: Elsevier; 2004. p. 229-40.
13. Burt RW, Petersen GM. Familial colorectal cancer: diagnosis and management. En: Young GP, Rozen P, Levin B, editors. *Prevention and early detection of colorectal cancer.* London: WB Saunders; 1996. p. 171-94.
14. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology.* 2001;121:198-213.
15. Lynch HT, De la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:919-32.
16. Cruz-Correa M, Giardiello FM. Familial adenomatous polyposis. *Gastrointest Endosc.* 2003;58:885-94.
17. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* 1991;66:589-600.
18. Fearhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 2001;10:721-33.
19. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germline mutations in MYH. *N Engl J Med.* 2003;348:791-9.
20. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003;138:560-70.
21. Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21: 1174-9.
22. 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.
23. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the ICG-HNPCC. *Gastroenterology.* 1999;116:1453-6.
24. Rodríguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, 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.
25. 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;96:261-8.
26. Lynch HT, Riley BD, Weissman SM, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC) and HNPCC-like families: problems in diagnosis, surveillance, and management. *Cancer.* 2004;100:53-64.
27. Ponz de León M, Benatti P, Di Gregorio C, et al. Genetic testing among high-risk individuals in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2004; 90:882-7.
28. Piñol V, Castells A, Andreu M, et al; Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA.* 2005;293:1986-94.
29. Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, et al. Genomic deletions of *MSH2* and *MLH1* in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer.* 2002; 87:892-7.