

Carcinoma colorrectal con alteración de la vía reparadora. Claves para su identificación y relevancia clínica

Mismatch-repair deficiency colorrectal carcinoma. Identification keys and clinical relevance

Artemio Payá Romá¹, Cristina Alenda González¹, Rodrigo Jover Martínez², F. Ignacio Aranda López¹

RESUMEN

Un 7,5% de los carcinomas colorrectales (CCR) en España presenta alteraciones del sistema de reparación de errores de replicación del ADN (mismatch repair, MMR). De ellos, un 20% se desarrolla en pacientes que presentan el síndrome de Lynch. Para identificar a estos pacientes se utilizan criterios clínicos, moleculares, histopatológicos e inmunohistoquímicos. El análisis inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) ha demostrado ser una técnica válida para la detección de tumores con alteración del MMR. La generalización del uso de la inmunohistoquímica hace que actualmente el patólogo desempeñe un papel fundamental en la identificación de pacientes con síndrome de Lynch.

Palabras clave: Carcinoma colorrectal, inestabilidad de microsatélites, inmunohistoquímica, síndrome de Lynch.

SUMMARY

Colorectal carcinoma (CRC) in Spain shows mismatch-repair deficiency (MMR+) reaching a 7.5%. Twenty percent of them presents in Lynch syndrome. Identification of these patients is based on clinical, molecular, histopathologic and immunohistochemical criteria. Immunohistochemical analysis of mismatch-repair proteins (MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2) is a valid technique to detect MMR+ tumors. The generalized use of immunohistochemistry confers to pathologists a fundamental role in the identification of patients with Lynch syndrome.

Key words: Colorectal carcinoma, microsatellite instability, immunohistochemistry, Lynch syndrome.

Rev Esp Patol 2006; 39 (4): 201-208

INTRODUCCIÓN

El carcinoma colorrectal (CCR) es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres en nuestro medio después del cáncer de pulmón y de mama, respectivamente. Desde el punto de vista de las alteraciones genéticas, la mayoría (90%) de los CCR presenta activación de determinados oncogenes (*K-ras*) e inhibición de genes supresores (*DCC*, *APC*, *TP53*). Los tumores originados por esta asociación de alteraciones, denominada vía supresora, muestran entre sus características el ser aneuploides (inestabilidad cromosómica).

Existe una segunda vía oncogénica caracterizada por la alteración del sistema de reparación de errores durante la replicación del ADN, controlado por los genes MMR (*mismatch repair*), principalmente *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Los tumores desarrollados por esta vía

presentan cientos de mutaciones en secuencias altamente repetitivas denominadas microsatélites. Para denominarlos se han aplicado en la literatura diversos términos como tumores con inestabilidad de microsatélites (IMS+), tumores con alteración de la vía reparadora (MMR+), tumores con fenotipo RER+ (*replication errors*) o tumores con fenotipo mutador.

Los tumores MMR+ presentan un mejor pronóstico que los tumores sin alteración de la vía reparadora. Además, no se benefician de los tratamientos quimioterápicos basados en terapias con 5-fluorouracilo.

La IMS se observa en el 7,4% de los CCR de población no seleccionada en España. La gran mayoría de tumores con IMS (83% aproximadamente) son esporádicos, y el 17% restante se desarrolla en pacientes con Carcinoma Colorrectal Hereditario no Polipósico (CCHNP) o síndrome de Lynch.

Recibido el 27/6/06. Aceptado el 5/9/06.

Hospital General Universitario de Alicante

¹ Servicio de Patología.

² Servicio de Gastroenterología.

paya_art@gva.es

CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Los tumores MMR+ muestran una localización predominante en colon derecho (proximales a ángulo esplénico) y presentan algunos rasgos histológicos característicos, que ayudan a su identificación.

Tipo histológico

Un 44% de tumores MMR+ presenta tipos histológicos especiales. El más frecuente es el carcinoma mucinoso que supone un 34% de los tumores inestables. Además, en este tipo histológico la frecuencia está relacionada con su localización: son inestables un 60% de los tumores mucinosos localizados en el lado derecho y tan solo un 20% de los localizados en el izquierdo. El segundo tipo en frecuencia es el carcinoma medular (8%). Prácticamente todos los carcinomas medulares son MMR+. El carcinoma de células en anillo de sello es un tipo histológico raro que se asocia a inestabilidad en un 25% de casos y supone un 2,2% del total de tumores IMS+. Un aspecto frecuente en los tumores IMS+ es la combinación de varios tipos histológicos con transiciones abruptas entre ellos, patrón observado en un 45% de casos (fig. 1).

Linfocitosis intratumoral

La mayoría de los tumores MMR+ presenta linfocitosis intratumoral (79%). Aunque el porcentaje varía según el autor, la presencia de 3 o más linfocitos intraepiteliales por campo de gran aumento está altamente asociada al fenotipo MMR+. Si además el tumor presenta cualquier grado de diferenciación mucinosa o ausencia de necrosis intraglandular, la sensibilidad para la detec-

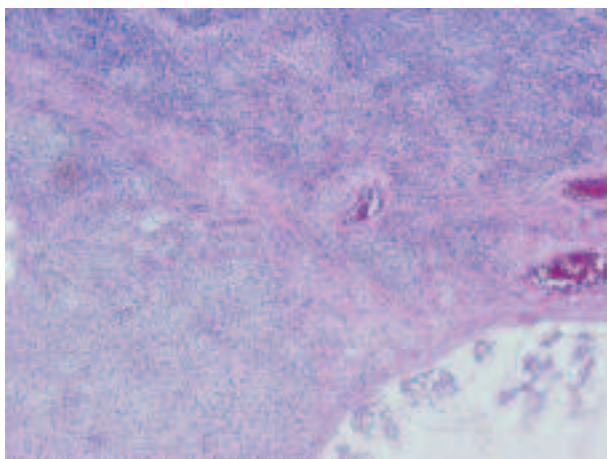


Fig. 1: CCR con patrón histopatológico mixto. Carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma medular y carcinoma mucinoso.

ción del fenotipo MMR+ es del 100%. En las áreas adenomatosas o de carcinoma in situ la linfocitosis intraepitelial no se asocia a inestabilidad y por tanto deben evitarse estas zonas para su valoración.

Margen expansivo

El 60% de los tumores MMR+ tiene margen expansivo. El margen de crecimiento tiene un valor pronóstico importante, por lo que la frecuente presencia de un crecimiento expansivo puede explicar en parte el mejor pronóstico asociado a los tumores inestables.

También se ha asociado al fenotipo MMR la reacción linfoide peritumoral tipo Crohn con folículos linfoides prominentes y la ausencia de necrosis intraglandular.

Una vez que se saben identificar las características asociadas a la inestabilidad, la impresión subjetiva del patólogo tiene un valor mayor que cualquiera de las características analizadas de forma individual para la detección de tumores MMR+.

SÍNDROME DE LYNCH

El síndrome de Lynch es el síndrome de CCR hereditario más frecuente. Muestra un patrón de herencia autosómica dominante y representa del 0,9-2% de todos los CCR. Se caracteriza por mutaciones germinales en alguno de los genes MMR (*MLH1* 50%, *MSH2* 39%, *MSH6* 7%, *PMS2*<4%). Los pacientes afectados muestran una predisposición a desarrollar diversos tumores, normalmente a temprana edad. Los más frecuentes son el carcinoma de colon, endometrio y estómago. Otros tumores asociados son de intestino delgado, vía biliar, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro y adenomas sebáceos cutáneos.

Los tumores desarrollados presentan IMS y pérdida de expresión inmunohistoquímica (IHQ) de la proteína mutada en la mayor parte de casos.

Originalmente el diagnóstico de HNPCC era clínico y se basaba en los criterios de Ámsterdam, publicados en 1990. En 1999 se ampliaron estos criterios (Ámsterdam II) añadiendo el resto de tumores asociados al síndrome (tabla 1). Aun con los criterios ampliados, la mayoría de pacientes con síndrome de Lynch (mutación germinal identificada) no cumple los criterios de Ámsterdam.

Para identificar un mayor número de pacientes afectados se crearon los criterios de Bethesda revisados (tabla 1). Estos criterios son menos restrictivos que los de Ámsterdam y se utilizan para seleccionar aquellos pacientes en los que debe realizarse el estudio de las alteraciones del MMR (análisis de microsatélites y/o inmunohistoquímica). Es importante destacar que uno de los criterios de Bethesda se basa en rasgos histopatológicos frecuentemente asociados a IMS (fig. 2).

TABLA 1. Criterios clínicos

Criterios de Ámsterdam II	Criterios de Bethesda revisados
<p>Tres o más familiares afectados de CCR o neoplasia asociada al CCHNP (endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Uno de ellos familiar de primer grado de los otros dos, y - Afectación de 2 generaciones consecutivas, y - Como mínimo un caso diagnosticado antes de los 50 años, y - Se excluye la Poliposis Adenomatosa Familiar - Confirmación histopatológica 	<ul style="list-style-type: none"> - CCR en paciente con < 50 años de edad. - Presencia de CCR sincrónico o metacrónico u otra neoplasia de la esfera asociada al CCHNP (estómago, intestino delgado, páncreas, vía biliar, endometrio, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro, adenomas sebáceos, querato-acantomas) con independencia de la edad. - CCR con infiltración linfocitaria, diferenciación mucinosa/ células en anillo de sello o patrón de crecimiento medular en paciente con < 60 años de edad. - Uno o más familiares de 1.^{er} grado con CCR o neoplasia de la esfera asociada al CCRHNP diagnosticada antes de los 50 años de edad. - Dos o más familiares de 1.^o ó 2.^o grado con CCR o neoplasia de la esfera asociada al CCHNP con independencia de la edad.

Aunque inicialmente considerados como muy específicos, recientes estudios han demostrado que sólo el 60% de los pacientes que cumple los criterios de Ámsterdam tiene mutaciones germinales en los genes MMR. Al gru-

po de pacientes que cumple estos criterios sin mutaciones germinales se le ha denominado por algunos autores CCR Familiar tipo X. No se conoce actualmente el sustrato genético de este síndrome.

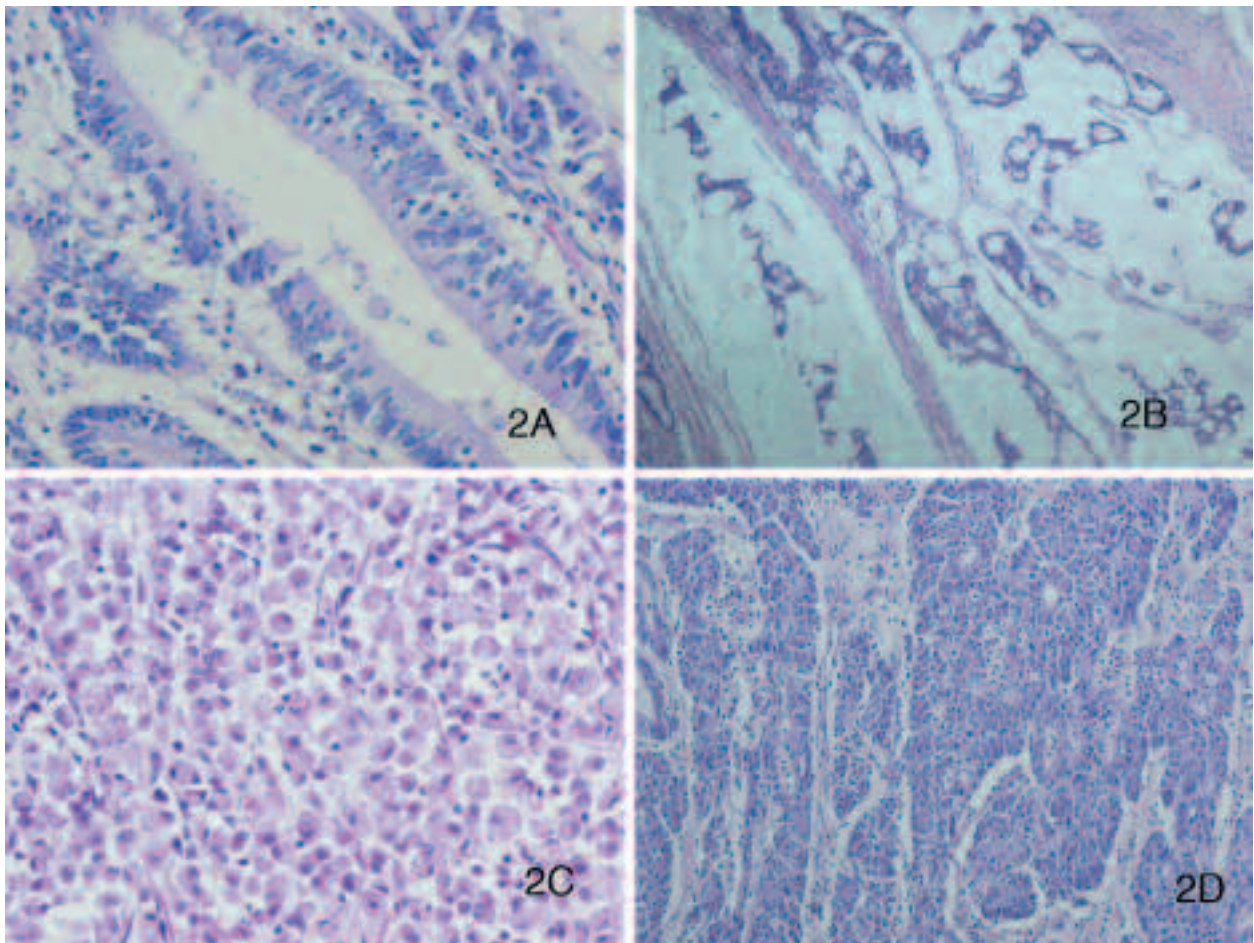


Fig. 2: Características morfológicas incluidas en los criterios de Bethesda Revisados. CCR con linfocitosis intraepitelial (2A), diferenciación mucinosa (2B), células en anillo de sello (2C) o patrón de crecimiento medular (2D).

FORMAS DE DETECCIÓN DE TUMORES MMR+

El estudio de las alteraciones del mecanismo de reparación puede realizarse a tres niveles: a) estudiando los genes directamente b) analizando la expresión de las proteínas codificadas o c) analizando microsatélites, que son la diana final donde actúan las proteínas reparadoras. Como el análisis de mutaciones germinales es costoso, habitualmente se seleccionan los pacientes con tumores MMR+ mediante el análisis de microsatélites y el análisis inmunohistoquímico.

Análisis de mutaciones germinales

El estudio se realiza mediante análisis de secuenciación y estudio de grandes reordenamientos en ADN genómico. En muchos centros se comienza con la detección de reordenamientos genómicos, por tratarse de una técnica relativamente sencilla y en caso de detectarse se obvia el cribado posterior de mutaciones. La detección de la mutación permite identificar a los portadores asintomáticos e incluirlos en los programas de detección precoz.

Análisis de microsatélites

En 1998 se acordó un panel de 5 marcadores microsatélites consenso (tabla 2) y los criterios para definir la inestabilidad. Se considera que un tumor presenta alta IMS (IMS-H) si muestra inestabilidad en 2 o más marcadores y baja IMS (IMS-L) si aparece en un marcador. Actualmente tiende a abandonarse el concepto de IMS-L porque se ha demostrado que este grupo presenta características superponibles a las de los tumores sin IMS. Excepto que se especifique lo contrario, el término IMS+ se refiere a los antes denominados IMS-H.

El análisis se realiza mediante PCR comparando en cada caso el tamaño de los alelos del tumor con su correspondiente ADN no tumoral. En los tumores con IMS pueden observarse con los marcadores dinucleótidos inserciones o deleciones en el ADN tumoral, mientras que con los mononucleótidos siempre son deleciones. Los marcadores más sensibles a la inestabilidad son

los mononucleótidos. En concreto con el BAT26 pueden detectarse más del 95% de tumores con IMS, por lo que en algunos trabajos se ha utilizado como único marcador. Tiene además la ventaja de que es prácticamente monomórfico, lo cual permite utilizar sólo ADN tumoral sin necesidad de comparar con ADN no tumoral. Todo ello simplifica la técnica, abarata costes y además permite realizar el análisis cuando no se dispone de tejido no tumoral (ej. biopsias endoscópicas). Actualmente se está planteando la necesidad de modificar los microsatélites utilizados en el panel consenso, aumentando el número de marcadores mononucleótidos por ser los más sensibles.

Análisis inmunohistoquímico

Bases moleculares de la inmunohistoquímica

El sistema MMR está controlado fundamentalmente por las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. Entre ellas forman complejos heterodiméricos. El más abundante y primero en actuar está formado por MSH2-MSH6. A este complejo se le une posteriormente otro formado por MLH1-PMS2. El complejo final escinde el error del ADN y lo repara. Si ambos alelos de alguno de estos genes se inactivan por cualquier mecanismo (deleción, mutación o metilación), los errores de replicación no se pueden reparar y se acumularán mutaciones en microsatélites, produciéndose IMS y desarrollándose el CCR. La inactivación de ambos alelos tiene como consecuencia la pérdida de expresión de la proteína, lo cual puede detectarse mediante inmunohistoquímica.

Los tumores esporádicos MMR+ se originan debido a inactivación por hipermetilación del promotor del gen MLH1. En estos casos siempre se observa pérdida de expresión inmunohistoquímica de MLH1.

En los tumores del síndrome de Lynch puede observarse pérdida de expresión de cualquiera de las proteínas MMR (MLH1 50%, MSH2 39%, MSH6 7%, PMS2<4%). Un mínimo porcentaje (5% aproximadamente) de pacientes con mutación germinal puede mostrar expresión conservada de las cuatro proteínas. Esto puede ser debido a la expresión de una proteína no funcional pero con conservación del epítipo reconocido por el anticuerpo, o bien, que la mutación esté en alguno de los otros genes que controlan el MMR (*PMS1* o *MLH3*).

La pérdida de expresión de MLH1 generalmente se asocia a pérdida secundaria de PMS2. De la misma forma, la pérdida de MSH2 suele asociarse a pérdida secundaria de MSH6. Las pérdidas aisladas de PMS2 o MSH6, indicativas de mutación en estos genes, son poco frecuentes y sólo deben considerarse tras haber observado expresión de MLH1 y MSH2.

TABLA 2. Marcadores microsatélites consenso

Marcador	Tipo	Localización
D2S123	Dinucleótido	2p21-2p16
D5S346	Dinucleótido	5q21-5q22
D17S250	Dinucleótido	17q11.2-17q12
BAT25	Mononucleótido	4q12
BAT26	Mononucleótido	2p16

Forma de valoración de la inmunohistoquímica

El estudio inmunohistoquímico se realiza sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina. Para su valoración siempre se dispone de controles internos positivos (estroma, linfocitos), necesarios para poder determinar que la ausencia de expresión en un tumor no es debida a un problema de la técnica. Un caso se considera con pérdida de expresión cuando no se observa inmunotinción en ninguna célula neoplásica. Frecuentemente la tinción obtenida es heterogénea. Por ello, siempre se debe valorar la pérdida de expresión en un campo de gran aumento que disponga de controles internos positivos (fig. 3).

El resultado inmunohistoquímico debe expresarse como presencia o ausencia de expresión de cada una de las proteínas o como no valorable si no se obtienen controles internos adecuados. No deben establecerse valoraciones semicuantitativas basadas en la intensidad y porcentaje de inmunotinción porque se ha demostrado que

esta semicuantificación no se correlaciona con la presencia de inactivación génica. Los términos positivo y negativo también deben evitarse, ya que pueden inducir a confusión.

Limitaciones de la inmunohistoquímica

En ocasiones existen limitaciones técnicas que dificultan la valoración de la inmunohistoquímica. Entre las más importantes están los problemas de fijación del tejido, el anticuerpo utilizado o la pérdida de antigenicidad en cortes almacenados más de 24 horas antes de la realización de la técnica. Las piezas de resección colorrectal si no son abiertas inmediatamente tras la cirugía, pueden presentar problemas de fijación.

Para detectar los casos de CCR esporádicos con IMS, la inmunohistoquímica tiene una sensibilidad y especificidad del 100%. En cambio, en el síndrome de Lynch,

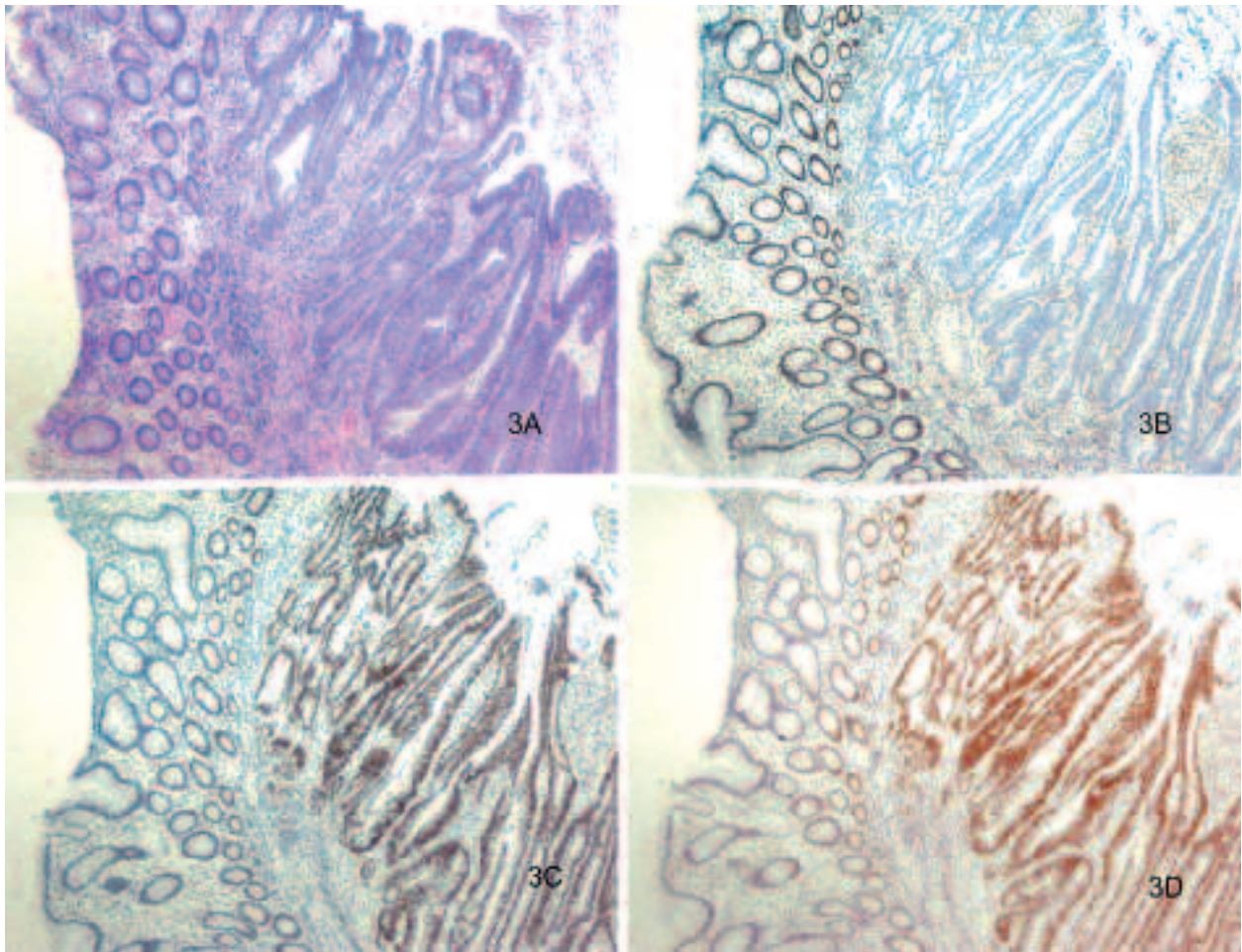


Fig. 3: Carcinoma colorrectal con pérdida de expresión de MLH1. 3A) H&E 200x. 3B) Pérdida de expresión de MLH1 200x (BD Pharmingen, clon G168-15, dilución 1:30). 3C) Expresión conservada de MSH2 200x (BD Transduction Laboratorios, clon 44, dilución 1:100). 3D) Expresión conservada de MSH6 200x (Calbiochem, clon FE11, dilución 1:30). Este caso mostraba también pérdida de expresión secundaria de PMS2 (BD Pharmingen, clon A16-4, dilución 1:100).

hasta en un 5% de los tumores no se detecta pérdida de expresión del gen mutado. Para detectar estos casos se hace necesario recurrir al análisis de microsatélites.

¿QUÉ MÉTODO UTILIZAR?

Tanto la IHQ como el análisis de microsatélites son técnicas igualmente válidas para el despistaje de tumores con fenotipo mutador y por tanto para la detección de pacientes con síndrome de Lynch. La IHQ como método inicial tiene la ventaja de que es una técnica sencilla y barata, fácilmente realizable en cualquier laboratorio en el que se hagan rutinariamente tinciones inmunohistoquímicas como es el caso de la mayoría de servicios de Anatomía Patológica. El análisis de microsatélites requiere un mayor equipamiento técnico, no disponible en todos los centros. Además, la inmunohistoquímica permite identificar la proteína no expresada y, por tanto, el gen afectado. También se ha visto que en tumores mucinosos la sensibilidad de la inmu-

nohistoquímica es mucho mayor que el análisis de microsatélites debido a la baja densidad de células tumorales, que dificulta la obtención de suficiente ADN para el estudio.

INDICACIONES PARA EL ANÁLISIS DEL FENOTIPO MUTADOR

Actualmente está consensuado que se realice el análisis de alteraciones del MMR en los pacientes que cumplan criterios de Bethesda revisados o Ámsterdam II. Recientemente se ha observado que hasta un 21% de pacientes con síndrome de Lynch no cumple criterios de Ámsterdam o Bethesda. Por esto, algunos autores opinan que, dado el bajo coste de la inmunohistoquímica, debería realizarse de forma rutinaria a todos los CCR, no sólo a los pacientes que cumplen los criterios clínicos. Nuestro grupo es de esta opinión y actualmente estamos realizando el análisis inmunohistoquímico a todos los CCR sin ningún criterio de selección.

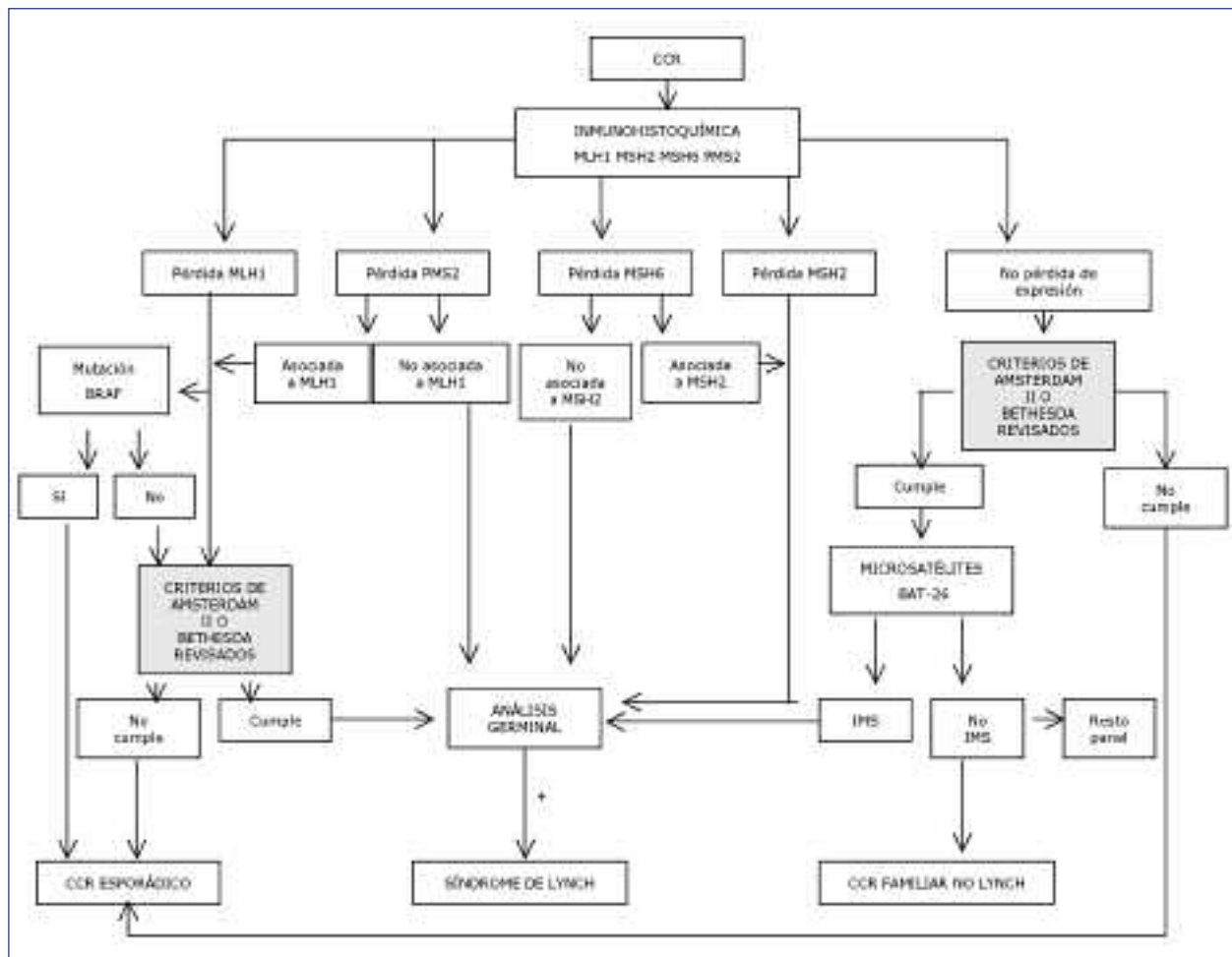


Fig. 4: Algoritmo para identificación de síndrome de Lynch partiendo del análisis inmunohistoquímico.

¿QUÉ PROTEÍNAS ESTUDIAR?

Las proteínas que más frecuentemente muestran pérdida de expresión son MLH1 y MSH2. En ocasiones se hace necesaria la valoración de MSH6 y PMS2, bien para confirmar la pérdida de las primeras en casos dudosos, o bien para detectar mutaciones aisladas de MSH6 o PMS2. Un 72% de pacientes con tumores IMS+ y sin pérdida de expresión de MLH1, MSH2 o MSH6 muestra pérdida de PMS2. Analizar las cuatro proteínas en un primer tiempo tiene un coste en tiempo y reactivos proporcionalmente menor que si se realizan primero MLH1/MSH2 y después MSH6/PMS2. Nuestro grupo ha realizado el estudio inmunohistoquímico en 1912 casos de CCR no seleccionados. En 125 casos (6,5%) se detectó pérdida de expresión de alguna de las proteínas: 96 MLH1 (77%), 24 MSH2 (19%), 3 MSH6 (2,4%) y 1 PMS2 (0,8%). En tan sólo un caso (0,8%) se detectó pérdida de MLH1 y MSH2.

IDENTIFICACIÓN DEL SÍNDROME DE LYNCH MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

Teniendo en cuenta que la inmunohistoquímica es una técnica disponible en todos los servicios de Patología y que tiene una alta concordancia con la IMS, un posible algoritmo para detectar pacientes con síndrome de Lynch, sin conocer la historia oncológica, es el que se propone en la figura 4. Ante un CCR se realiza el estudio inmunohistoquímico de las cuatro proteínas. En tumores con pérdida de expresión de MLH1, dado que la mayoría son esporádicos, el criterio para realizar o no el análisis germinal se basa en el cumplimiento de los criterios clínicos. Una alternativa para los centros que dispongan de la técnica, es el análisis de la mutación BRAF. Recientemente se ha demostrado que los tumores esporádicos presentan la mutación V600E en el gen BRAF, la cual está ausente en los casos con mutación germinal. Los casos con presencia de mutación del gen BRAF, por tanto, pueden excluirse del análisis germinal. En tumores con pérdida de MSH2, así como con pérdidas aisladas de PMS2 o MSH6, se realiza directamente la búsqueda de mutaciones germinales de la proteína no expresada, ya que en los tumores esporádicos nunca se inactivan estos genes. En los casos en los que no se detecte pérdida de expresión pero el paciente cumpla criterios clínicos hay que realizar el análisis de microsatélites, para detectar el pequeño porcentaje de tumores inestables sin pérdida de expresión proteica asociada.

En resumen, el patólogo desempeña un papel fundamental en la identificación de pacientes con síndrome de Lynch, reconociendo las características histopatológicas asociadas a los tumores inestables e interpretando, en el contexto clínico, el análisis inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras. El estudio inmunohistoquímico

permite dirigir la búsqueda al gen afecto, disminuyendo los costes del análisis genético y aumentando el número de pacientes con síndrome de Lynch.

BIBLIOGRAFÍA

1. Peltomaki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition. Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* 2004; 20: 269-76.
2. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998; 58: 1713-8.
3. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 609-18.
4. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, 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: 247-57.
5. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; 126: 394-401.
6. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubie-la J, et al. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut* 2006; 55: 848-55.
7. Pinol V, Castells A, Andreu M, Castellvi-Bel S, Alenda C, Llor X, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Jama* 2005; 293: 1986-94.
8. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352: 1851-60.
9. Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998; 42: 673-9.
10. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 2417-22.
11. Paya A, Alenda C, Jover R, Peiro F, Grupo de Oncología Digestiva, AEG. Clinico-pathologic Differences Regarding MLH1 and MSH2 Expression in Microsatellite Instability (MSI) Colorectal Carcinoma. *Mod Pathol* 2004; 17(S 1): 127A.
12. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1393-406.
13. Ogino S, Brahmandam M, Cantor M, Namgyal C, Kawasaki T, Kirkner G, et al. Distinct molecular features of colorectal carcinoma with signet ring cell component and colorectal carcinoma with mucinous component. *Mod Pathol* 2006; 19: 59-68.
14. Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, et al. Features of colorectal cancers with

- high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol* 2001; 159: 2107-16.
15. Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Miselevich I, Resnick MB, et al. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 563-70.
 16. Jass JR. HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer* 2004; 3: 93-100.
 17. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001; 158: 527-35.
 18. Aaltonen LA, Sankila R, Mecklin JP, Jarvinen H, Pukkala E, Peltomaki P, et al. A novel approach to estimate the proportion of hereditary nonpolyposis colorectal cancer of total colorectal cancer burden. *Cancer Detect Prev* 1994; 18: 57-63.
 19. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-32.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 261-8.
 23. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *Jama* 2005; 293: 1979-85.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 681-710.
 27. Ruskiewicz A, Bennett G, Moore J, Manavis J, Rudzki B, Shen L, et al. Correlation of mismatch repair genes immunohistochemistry and microsatellite instability status in HNPCC-associated tumours. *Pathology* 2002; 34: 541-7.
 28. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert M. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444: 135-41.
 29. Plaschke J, Kruger S, Pistorius S, Theissig F, Saeger HD, Schackert HK. Involvement of hMSH6 in the development of hereditary and sporadic colorectal cancer revealed by immunostaining is based on germ-line mutations, but rarely on somatic inactivation. *Int J Cancer* 2002; 97: 643-8.
 30. Plaschke J, Kruger S, Jeske B, Theissig F, Kreuz FR, Pistorius S, et al. Loss of MSH3 protein expression is frequent in MLH1-deficient colorectal cancer and is associated with disease progression. *Cancer Res* 2004; 64: 864-70.
 31. Niessen RC, Berends MJ, Wu Y, Si-jmons RH, Hollema H, Ligtenberg MJ, et al. Identification of mismatch repair gene mutations in young colorectal cancer patients and patients with multiple HNPCC-associated tumours. *Gut* 2006; 55: 1781-8.
 32. Jover R, Paya A, Alenda C, Poveda MJ, Peiro G, Aranda FI, et al. Defective mismatch-repair colorectal cancer: clinicopathologic characteristics and usefulness of immunohistochemical analysis for diagnosis. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 389-94.
 33. Gill S, Lindor NM, Burgart LJ, Smalley R, Leontovich O, French AJ, et al. Isolated loss of PMS2 expression in colorectal cancers: frequency, patient age, and familial aggregation. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6466-71.
 34. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espin E, et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 2005; 24: 3995-8.
 35. Domingo E, Espin E, Armengol M, Oliveira C, Pinto M, Duval A, et al. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 138-42.
 36. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41: 664-8.