

EREDITATEA ÎN CANCERUL COLO-RECTAL POLIPOZIC - SCREENING ȘI DIAGNOSTIC -

Elena Dajbog¹, L.P. Lefter^{1,2}, V. Scripcariu^{1,2}, C. Dragomir^{1,2}

¹Clinica a-III-a Chirurgicală Spitalul „Sf. Spiridon”

²Centrul de Cercetare în Chirurgie Oncologică
Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa” Iași

HEREDITY IN POLYPOSIS COLORECTAL CANCER (Abstract). The aetiology of colorectal cancer is heterogeneous, with environment or genetics playing varying key roles. About 80% of patients with colorectal cancer seem to have sporadic disease with no evidence of having inherited the disorder. In the remaining 20%, there seems to be a potentially definable genetic component. Evidence for a genetic contribution to colorectal cancer includes increased risk of colorectal malignancy in persons with a family history and familial aggregation of colorectal cancer consistent with autosomal dominant inheritance. In the past decade, germline genetic mutations conferring high lifetime risk of colorectal cancer in carriers have been found, accounting for 5%–6% of all colorectal cancer cases. Other gene mutations, some with lower lifetime risks, are continuing to be characterized. The translation into clinical practice of genetic discoveries related to hereditary colorectal cancer continues apace, primarily through improved risk assessment by genetic testing. This review analyzes succinctly the most encountered colorectal cancer genetic syndromes of familial adenomatous polyposis and the current availability of genetic tests, describing indications for use of genetic tests in the hereditary colorectal cancer.

KEY WORDS: COLORECTAL CANCER, POLYPOSIS.

Correspondență: Liviu Lefter, Clinica a III-a Chirurgicală, Spitalul „Sf. Spiridon”, Bd. Independenței nr. 1, Iași, 700111, România, E-mail: lilefter@gmail.com

Studiile genetice, epidemiologice și experimentale sugerează că apariția cancerului colo-rectal este rezultatul interacțiunii complexe dintre factorii de mediu și susceptibilitatea genetică. Eforturile de identificare a cauzelor și măsurilor de prevenire au condus la ipoteza că polipii adenomatoși sunt precursori pentru un mare număr de cancere colo-rectale, iar măsurile de scădere a incidenței polipilor au condus la o scădere a riscului de cancer colo-rectal.

Cancerul colo-rectal ereditar este o boală genetică care se desfășoară ca un proces evolutiv. În accepțiunea sa actuală, termenul de boală genetică definește entitățile nosologice, în al căror determinism intervin alterări cantitative și/sau calitative ale informației genetice. Acest fapt nu reprezintă un criteriu limitativ, deoarece sunt considerate boli genetice și afecțiunile cauzate de modificări ale ADN-ului din celulele somatice, dacă acestea sunt permanente și se transmit de la o generație celulară la alta (modificări mutaționale).

În formele sporadice leziunea genetică inițială apare spontan sau indusă de agenți din mediu în genomul unei singure celule stem colonice, care dobândește, astfel, avantaj proliferativ față de celulele înconjurătoare. Se constituie o clonă, adică o populație celulară, în care toate celulele au aceeași constituție genomică și, implicit, aceleași anomalii genice.

În cadrul acesteia apar noi modificări genetice, fiecare caracteristică a unei subclone, evoluând în detrimentul celei inițiale - evoluție clonală. Aceleași alterări moleculare pot exista în genomul celulelor germinale, situație în care, la descendenți apar cazuri ereditare de cancer colo-rectal. Studiul molecular și introducerea metodelor de diagnostic precoce au schimbat într-un mod radical înțelegerea oncogenezei colo-rectale și au permis individualizarea a numeroase forme etiopatogenice cu probleme particulare de diagnostic și prevenție. Cancerul colo-rectal ereditar poate fi clasificat ca polipozic și non-polipozic.

a. sindroame ereditare de polipoză adenomatoasă familială

- PAF (PAF atenuată, sindrom Turcot I)

b. sindroame ereditare de hamartomatoză colonică

- sindromul Peutz-Jeghers
- polipoza juvenilă
- sindromul Cowden
- sindromul Ruvalcaba-Myhre-Smith
- sindromul Cronkhite-Canada

c. cancerul colo-rectal discret ereditar***Citogenetica cancerului colo-rectal ereditar***

Se consideră că mai mult de 1/3 din genele fiecărui individ se află într-o formă diferită de cea prezentă la majoritatea populației. Acest remarcabil polimorfism genic explică pe de-o parte variația unor trăsături fizice ale indivizilor „normali”, iar pe de altă parte, abilitatea fiecărui individ de a evita factorii de mediu ce-i pot produce îmbolnăvirea.

În principiu, fiecare boală este considerată rezultatul interacțiunii dintre constituția genetică unică a individului și acțiunea factorilor de mediu. Bazele moleculare ale individualității genetice sunt reprezentate de totalitatea genelor ce formează genomul uman; analiza cromozomilor umani a permis stabilirea „hărții genomului uman” ce indică cu precizie locusul genei și funcția acesteia. Orice modificare la nivelul acizilor nucleici va avea drept rezultat apariția unor gene mutante ce se vor exprima clinic la nivel fenotipic. Aceste mutante se vor putea transmite descendenților sub formă: *autozomal dominantă* (când afecțiunea se manifestă în starea de heterozigot (o singură alelă mutantă), iar riscul de transmisibilitate este de 50%); *autozomal recesivă* (când afecțiunea se manifestă numai în starea de homozigot).

Atunci când nu se realizează aceste condiții pentru apariția bolii, individul rămâne „purtător” al genei mutante sau al unei predispoziții genetice ce îl face susceptibil pentru apariția bolii.

Multe boli au însă, origine multifactorială, în care elementul princeps este interacțiunea dintre încărcătura genetică și factorii de mediu. În aceste boli există o componentă poligenică reprezentată de o serie de gene care interacționează de o manieră cumulativă. Un individ care moștenește combinația acestor gene nu depășește pragul de risc la care componentele de mediu determină gradul de afectare clinică. Deoarece rudele de gradul I ale unui individ afectat au jumătate din genele acestuia, ele prezintă un risc crescut de a dezvolta același sindrom poligenic. Numărul de gene corespunzătoare unei afecțiuni poligenice nu este exact cunoscut, de aceea este dificil de calculat riscul de transmitere pentru o rudă a unui individ afectat, iar standardele de calcul se bazează pe valori empirice ale riscului care a fost estimat la 5-10% din rudele de gradul I. Mai mult, în contrast cu afecțiunile mendeleene, riscul de recurență al afecțiunilor multifactorial, variază de la o familie la alta, iar estimarea sa este influențată semnificativ de doi factori: numărul de persoane afectate existente în familie și severitatea bolii la cazul revelator [1].

Cu cât este mai mare numărul rudelor afectate și cu cât afecțiunea este mai severă, riscul va fi mai crescut pentru celelalte rude [1,2].

Ipoteza unei componente poligenice în transmiterea bolilor multifactoriale a fost consolidată prin demonstrarea faptului ca peste 1/3 din locusurile genetice poartă alele polimorfe, ce reprezintă substratul variației predispoziției genetice în interacțiunea cu factorii de mediu înconjurător. Până în prezent, locusurile genetice cel mai clar asociate cu predispoziția pentru anumite boli, sunt cele care constituie sistemul HLA (sistem major de histocompatibilitate). Deși genomul uman cuprinde până la 100.000 de gene ce codifică întreaga informație umană, marea majoritate a variațiilor ADN-ului probabil că nu au efecte

fenotipice sau acestea sunt minime, cu toate că ele reprezintă markeri cu utilitate clinică deosebită; se consideră că 60% din populație va suferi în cursul vieții de pe urma bolilor cu determinism genetic, însă de multe ori este dificil de delimitat între individualitatea benignă și cea cu implicații medicale [3].

Modelul molecular al tumorigenezei colo-rectale s-a constituit prin disecția moleculară a secvenței „adenom-carcinom”; genele alterate acționează prin trei mecanisme principale.

- Primul implică *protooncogenele*, mutația uneia din cele două alele normale, determină activarea lor în oncogene care produc transformarea celulară.
- Al doilea implică *genele de supresie a creșterii tumorale* (GSCT), denumite și antioncogene: inactivarea ambelor alele determină creșterea și proliferarea celulară necontrolată.
- Al treilea mecanism de malignizare constă în *alterarea unor gene „antimutatoare” sau „de stabilitate”*: mutațiile lor conduc la repararea defectuoasă a leziunilor ADN ceea ce are drept rezultat acumularea unui număr impresionant de mutații în genomul colonocitelor pe calea de transformare MMR (mismatch repair genes). Secvența „epiteliu normal-adenom-carcinom” necesită acumularea într-o anumită ordine a unor leziuni genice specifice și, de aceea, se constituie într-un interval mare de timp, 5-10 ani pentru apariția adenoamelor mari, și încă 3-5 ani pentru dobândirea caracterului metastazant [4-6].

Principii generale de testare

Teste care detectează mutațiile genelor responsabile de majoritatea cazurilor sindroamelor ereditare de sunt cancer colo-rectal disponibile actualmente pentru testarea clinică de rutină. Teste genetice comercializate sunt disponibile pentru diagnosticare polipozei adenomatoase familiale, polipozei juvenile și sindromului Peutz-Jeghers. Identificarea cauzelor genetice pentru alte cazuri de cancer colo-rectal cu risc moderat sau crescut sunt încă în studiu. Laboratoarele utilizează metodologie diversă în identificarea mutațiilor genetice fiind necesară o cunoaștere aprofundată a acestora pentru interpretarea optimă a rezultatelor [8,9].

Principiile care guvernează utilizarea testării genetice sunt valabile și în cazul testării pentru cancer colo-rectal. Sfatul genetic ar trebui să fie o componentă a oricărei testări genetice pentru a se evidenția istoricul familial, element esențial în evaluarea riscului de a dezvolta cancer colo-rectal. Guidelines-urile actuale pentru utilizarea testării genetice în neoplaziile familiale indică că: testarea genetică ar trebui oferită doar indivizilor cu un istoric familial pentru cancer colo-rectal doar în cazul în care se poate oferi o interpretare corespunzătoare a testelor și atunci când testul va influența screening-ul și managementul clinic ulterior al pacientului.

Specific pentru sindroamele de cancer familial ereditar este faptul că familiile supuse investigațiilor ar trebui să îndeplinească cel puțin criterii clinice pentru polipoza adenomatoasă familială, sindromul Peutz-Jeghers, sau sindromul polipozei juvenile familiale. Indivizii testați ar trebui să urmeze protocoalele clinice standard de follow-up al afecțiunii recomandate de rezultatul testelor. Dacă aceste teste moleculare sunt utilizate corect pot îmbunătăți substanțial acuratețea evaluării riscului de apariție a cancerului colo-rectal și în același timp vor duce la identificarea membrilor unei familii care ar trebui supravegheați printr-un program de screening. Aceste persoane ar trebui evaluate medical și chirurgical și ulterior ar trebui eventual supuse planning-ului familial. Se recomandă de asemenea obținerea unui acord informat în scris al pacientului.

Testarea genetică ridică probleme suplimentare legate de efectele psihologice, financiare și etnoculturale care vor afecta atât individul cât și familia sa. În consecință se recomandă să se asigure counseling genetic pretestare și posttestare care să explice avantajele

și dezavantajele testării genetice. O altă problemă care se impune este aceea a interpretării corecte a testării ADN a liniilor germinative. Indicația primară pentru testarea genetică în cazul familiilor cu sindrom de cancer colo-rectal familial este aceea de a îmbunătăți evaluarea riscului indivizilor din aceste familii [10].

Testarea genetică pentru detectarea mutațiilor liniilor germinative permite definirea precisă a riscului de cancer colo-rectal în comparația cu estimarea care bazată pe screening-ul populațional clasic. Totuși o interpretare incorectă a rezultatelor acestor teste va duce la dezinformarea pacientului prin obținerea unor rezultate fals negative. Riscul interpretării necorespunzătoare a testului genetic este substanțial datorită faptului că testarea genetică implică uneori imposibilitatea evidențierii unei mutații sau descoperirea unei ambivalențe mutagene la un pacient cu risc. Rezultatul testelor genetice va duce la susținerea recomandărilor pentru sfat genetic care vor optimiza activitatea de screening ulterioară.

Un aspect nou al testării genetice care ar trebui luat în considerare când se interpretează și se elaborează managementul clinic și paraclinic pentru indivizii testați este reprezentat de utilizarea ADN-ului din băncile genetice [8]. La pacienții care au rezultate negative sau incerte în ceea ce privește evidențierea mutației este potrivită propunerea depozitării ADN-ului tumoral în bănci genetice astfel încât probe care provin de la indivizii afectați dintr-o familie să fie disponibile în eventualitatea descoperirii unor noi metode de testare în viitor.

1. Cancerul colo-rectal ereditărilor polipozic

Studiul comparativ al frecvențelor cu, care sunt identificate alterările genice specifice adenoamelor și carcinoamelor, a sugerat existența unei ordini preferențiale de apariție a leziunilor ADN-ului. Studiile epidemiologice indică o incidență a tumorii dependentă de vârstă, care pledează pentru pași independenți multipli, iar datele citogenetice indică faptul că multe tumori dobândesc alterări cromozomiale odată cu progresia bolii, ceea ce reflectă o evoluție clonală în care sunt selecționate cele mai multe celule maligne.

Evenimentul inițiator, în mucoasa de aspect normal, este același în ambele forme - polipozic și nonpolipozic – și anume inactivarea prin mutații nonsens a genei de supresie tumorală APC (adenomatous polyposis coli) și sinteza unei proteine APC anormale. În celulele colonice normale, APC activează o proteinkinază din calea de semnalizare a oncogenei Wnt 1 care degradează b-catenina, proteina implicată în transducția intracelulară a semnalelor. În celulele maligne, proteina anormală APC este inactivă, ceea ce are ca rezultat acumularea intracelulară de b-catenină și activarea unor factori de transcriere. Consecința finală este exprimarea inadecvată a unor gene țintă care alterează programele celulare fundamentale - reducerea apoptozei cu acumularea de celule mutante în epiteliul colonic.

În stadiul de adenom mic apar deleții și mutații punctiforme ale GSGT-MCC (mutated in colorectal cancer) și amplificarea oncogenei c-myc; în 50% dintre adenoamele mari au fost identificate deleții ale genei K-ras și deleția genei DCC. Gena DCC codifică o proteină omologă cu adezinele celulare astfel încât inactivarea acesteia este răspunzătoare de pierderea adezivității și implicit de dobândirea capacității de metastazare - modificări întâlnite exclusiv în formele sporadice ale cancerului colo-rectal. Gena MCC - localizată pe brațul lung al cromozomului 5 - codifică o proteină a cărei inactivare dereprează activitățile de semnalizare și stimulează consecutiv proliferarea celulară. Perturbarea proliferării celulelor criptelor colonice consecutive acestor alterări este potențial reversibilă fie spontan, fie terapeutic (sub influența antiinflamatoriilor non/steroidiene). Dobândirea genotipului malign este precedată în 80% din cazuri de alterări ale genei p53; deoarece în majoritatea cazurilor transformarea ireversibilă adenom - carcinom nu pare să necesite existența unui factor de mediu, ea este considerată secundară unui proces mutațional intrinsec adenomului uman. Alterarea p53 apare ca o etapă limitată a ratei la care se desfășoară procesul malignizării colo-

rectale deoarece proteina normală p53 blochează proliferarea aberantă celulară, iar dispariția ei din anumite celule adenomatoase permite selecția evolutivă a acestora ca urmare a stimulării exagerate, a proliferării și a dispariției apoptozei. Mutațiile proteinei p53 reprezintă cea mai frecventă modificare genetică întâlnită în cancere umane [6,7].

În progresiunea fenotipului malign, un rol important este atribuit delețiilor genelor supresoare DCC (75%), DPC4 (25%) și SMAD2 (7%) din regiunea cromozomială 18q21; ultimele două codifică proteinele implicate în etapele finale de transducție a semnalelor pe calea TGF- β (transforming growth factor- β), ceea ce explică absența efectelor inhibitoare asupra creșterii tumorale ale acestui factor de creștere la unele cancere colo-rectale. Bazele genetice ale procesului de metastazare sunt mai puțin cunoscute, cu implicare mai deosebită fiind gena nm23 care inhibă realizarea inadecvată ontogenetic a programului celular de invazivitate, iar diminuarea expresiei sau deleția ei este asociată cu un potențial metastatic ridicat.

O altă genă descoperită inițial la șoareci - gena MIN (neoplazie intestinală multiplă), are rol în dezvoltarea de adenom la nivelul întregului intestin. O genă similară numită MIN1 a fost identificată pe cromozomul 1 uman, apărând frecvent alterată în cazul unor tumori cu prognostic sever la om. În plus, studiile sugerează că ciclooxygenaza 2 (COX2) are un rol inhibitor selectiv al tumorigenezei, ceea ce indică utilizarea inhibitorilor selectivi de COX2, ca o nouă grupă de agenți în terapia profilactică a polipozei și a cancerului colo-rectal [7].

2. Cancerul colo-rectal discret ereditar

Reprezintă o entitate incomplet definită care include două tipuri de pacienți:

1) Membrii unor familii în care au fost diagnosticate adenoame colonice solitare și tumori maligne recto-colonice, modul de transmitere fiind autosomal dominant. La acești pacienți adenoamele au o evoluție naturală asemănătoare neoplaziei sporadice, carcinoamele apărând la o vârstă asemănătoare cu cea a populației martor.

2) Pacienții cu cancer colo-rectal tip familial: studii largi prospective au identificat o creștere de 2- 3 ori a riscului de cancer colo-rectal la indivizii cu istoric familial pozitiv pentru rudele de gradul I, în absența unei transmiteri mendeleene. Riscul este mai mare dacă se consideră persoanele sub 45 de ani (risc relativ 5,37) sau cei cu mai mult de 2 rude cu cancer colo-rectal (risc relativ 2,75). Din totalul cazurilor cu cancer colo-rectal, forma familială reprezintă aproximativ 10% dacă nu se ține cont de vârsta și aproximativ 25% din cazuri care sunt diagnosticate sub vârsta de 45 de ani.

Descoperirile mutațiilor genetice au implicații în practica clinică ducând la o evaluare mai precisă a gradului riscului. Introducerea în practica clinică a testării genetice pentru evaluarea riscului de cancer colo-rectal a dus la stabilirea unor protocoale clinice funcționale.

Indivizii care sunt rude gradul I cu persoane care prezintă adenomatoză colonică sau cancer colo-rectal au un risc de două ori mai mare de a dezvolta cancer de colon în comparație cu populația generală. Susceptibilitatea ereditară pentru cancer colo-rectal crește cu numărul de rude afectate, proximitatea gradului de rudenie al acestora scăzând cu vârsta membrilor afectați ai familiei în momentul diagnosticului. Genele specifice responsabile de majoritatea cazurilor cu risc moderat sunt încă în studiu. Cazurile cu risc crescut de a dezvolta cancer colo-rectal reprezintă aproximativ 3%-5% din totalitatea neoplaziilor colo-rectale incluzând sindroamele predispozante bine definite de cancer colo-rectal ereditar. Utilizarea screening-ului genetic poate confirma diagnosticul la nivel molecular care este util în particular pentru acele cazuri ambigui reușind în același timp să îmbunătățească strategiile de supraveghere a pacienților cu risc crescut.

3. Polipoza adenomatoasă familială - PAF

PAF este un sindrom autozomal dominat cauzat de mutația liniei germinative a genei APC. Reprezintă 1% din totalitatea cancerelor colo-rectale. Deși neobișnuită recunoașterea sindromului este importantă datorită riscului de 100% al indivizilor de a dezvolta cancer colo-rectal. Adicional polipozei colonice pacienții cu PAF pot prezenta o mare varietate de manifestări extracolice. Acestea includ: adenoame ale intestinului subțire, și stomacului, leziuni cutanate (lipoame, fibroame, chisturi sebacee și epidermoide), tumori desmoide, osteoame, leziuni radioopace ale mandibulei, anomalii dentare, hipertrofie congenitală a epiteliului retinian pigmentar, angiofibroame naso-faringiene. La acești pacienți pot apare sindroame maligne extracolice: hepatoblastoame, neoplazii ale duodenului, ariei periampulare, rar ale jejunului, cancer tiroidian, cancer al arborelui biliar, al pancreasului și cerebral.

Asocierea PAF clasic cu manifestările extracolice în terminologia medicală mai veche poartă numele de sindrom Gardner. Indivizii cu sindrom Gardner prezintă același risc pentru cancer colo-rectal ca și în cazul PAF clasic. PAF este estimat să apară la 1: 8300-4,0251 de nașteri și afectează în mod simetric ambele sexe. Aproximativ 30% din cazuri sunt reprezentate de mutații spontane. Recent identificarea mutațiilor MYH (base excision repair gene) bialelice la un grup de pacienți cu fenotip PAF a evidențiat că aceștia pacienți cu „mutații spontane” PAF pot prezenta o maladie autosomal recesivă cauzată de moștenirea mutațiilor la nivel MYH. MYH este o genă ADN de reparare care îndepărtează adeninele din genele neperechi ce conțin 8-oxoguanină ce apare în timpul procesului de replicare a ADN-ului oxidat. În PAF, polipii apar de obicei în jurul vârstei de 16 ani (medie 7-36 ani) cancer colo-rectal apărând în jurul vârstei de 39 (\pm 5) de ani.

Diagnosticul clinic al PAF se poate stabili când un individ prezintă mai mult de 100 de adenoame colonice sau când are mai multe adenoame și este rudă de gradul I cu o persoană diagnosticată cu PAF fiind rudă cu partea afectată a familiei [11].

Persoanele care întrunesc aceste criterii ar trebui să intre într-un program de screening genetic pentru determinarea mutațiilor liniilor germinative ale APC ca standard optim în managementul PAF. Persoanele cu PAF prezintă adesea adenoame duodenale, polipi situați la nivelul glandelor fundusului gastric și au un risc crescut pentru adenocarcinomul de intestin subțire.

S-a descris o formă medie de PAF numită „PAF atenuat” care se caracterizează prin apariția doar a unui număr mic de adenoame colonice în comparație cu PAF-ul clasic. Când polipii apar predominant la nivelul colonului proximal, vârsta apariției fiind mai avansată în acest caz, momentul apariției cancer colo-rectal fiind în decada a șasea de viață. Nu este definit nici un standard în ceea ce privește numărul de adenoame colo-rectale care ar trebui evidențiate pentru a se diagnostica PAF-ul atenuat. Există însă specialiști care susțin că orice persoană care prezintă mai mult de 20 de adenoame colo-rectale ar trebui să intre în programul de screening pentru PAF [11,12].

Ca rezultat al riscului crescut pentru cancer extracolonic, tiroidian, pancreatic, duodenal, ampular, gastric și colonic managementul optim în cazul PAF și PAF atenuat este reprezentat de supravegherea permanentă a funcțiilor tiroidiene, hepatice, executarea de endoscopie digestivă superioară, colonoscopie.

Testarea genetică pentru PAF

APC - genetica moleculară.

Se consideră că toate cazurile de PAF și variantele sale se datorează mutațiilor liniei germinative a genei APC de la nivelul cromozomului 5q21 [12]. Este de menționat existența unui grup de indivizi cu PAF și adenoame colo-rectale multiple (15-100 adenoame) care prezintă mutații bialelice la nivelul MYH. Totuși în acest moment datele clinice sunt

insuficiente pentru a se evidenția cu certitudine rolul mutațiilor MYH în acest grup, rolul testării genetice pentru detecția mutațiilor liniei germinative MYH la persoane cu polipoză adenomatoasă fiind încă incert în ceea ce privește evaluarea pacienților și managementul viitor. Unul dintre efectele promotore tumorale ale inactivării bialelice ale APC este acela de a conduce la o supraactivare a căii de semnalizare Wntless/Wnt cu exprimare secundară a genelor care favorizează creșterea celulară. Calea semnalizatoare Wnt este supraactivată de mutațiile APC, acestea distrugând abilitatea APC-ului de a media degradarea β -cateninei ducând la o creștere a transcripției β -cateninei Tcf - mediată.

Studii moleculare avansate au raportat peste 300 de afecțiuni asociate cu diverse mutații ale genei APC [11,12]. De curând s-au evidențiat existența unor deleții intragenice extinse la nivelul APC și mutații bialelice la nivelul MYH, semnificative în unele cazuri de PAF și PAF atenuat care au testat negativ la utilizarea metodelor standard de detecție a mutațiilor. Majoritatea mutațiilor care clasice din PAF apar la nivelul APC între codonii 169 și 1393, cea mai frecvent întâlnită mutație APC fiind deleția AAAAG în codonul 1309 (10% din pacienții cu PAF). Mutațiile care reduc producția proteinelor APC pot deasemenea conduce la PAF. În PAF s-a evidențiat corelarea dintre manifestările clinice specifice și locația mutației la nivelul genei APC, denumită corelație genotip/fenotip.

Polimorfismul genei APC, (I1307K și E1317Q) se asociază cu riscul crescut pentru cancer colo-rectal dar, nu se implică în apariția polipozei colonice. Polimorfismul I1307K, se întâlnește exclusiv la descendenții unui anumit grup etnic, evreii Ashkenazi și constă în existența unui risc de două ori mai mare la aceste persoane de a dezvolta adenoame colonice și adenocarcinoame colo-rectale comparativ cu populația generală. Polimorfismul I1307K rezultă dintr-o tranziție de la T la A la nivelul nucleotidului 3920 la nivelul genei APC părănd a crea o regiune cu o capacitate mutagenă crescută. Teste clinice care să determine polimorfismului genei APC în acest caz sunt disponibile [13].

Testele utilizează de obicei procedee de secvențializare directă a ADN-ului și au o acuratețe de diagnostic crescută. În acest moment statusul de purtător nu hotărăște vârsta includerii persoanei într-un program de screening, frecvența testărilor sau alegerea strategiei de screening.

Testarea clinică pentru determinarea mutațiilor APC

Testele care determină existența mutațiilor la nivelul liniilor germinative ale APC există astăzi atât în laboratoarele universitare cât și în cele comerciale [14]. Persoanele cu PAF și PAF atenuat precum și membrii familiilor lor sunt candidații potriviți pentru testarea genetică. Testarea genetică moleculară este utilizată adesea în diagnosticarea precoce a membrilor familiilor cu risc crescut și pentru confirmarea diagnosticului de PAF sau a variantelor sindromului PAF la pacienți cu clinică sugestivă. Membrii familiilor cu risc crescut de a dezvolta cancer colo-rectal sunt cei care prezintă posibilitatea de a avea (50%) alele APC mutante moștenite [14]. Tipic aceste persoane reprezintă acea parte afectată a familiei, rude de gradul I cu indivizi cu PAF. În funcție de elementele structurale mutagene individuale și de rezultatul testelor genetice a rudelor de gradul I, alți membri ai familiei pot fi incluși în protocolul de testare. Aproximativ 70%-80% dintre indivizii cu PAF au un părinte afectat, copii persoanelor cu PAF având un risc de 50% de a moșteni sindromul (transmitere autozomal dominantă).

Testarea prenatală este posibilă dacă mutația cauzatoare este identificată la membrii afectați din familie; totuși testarea prenatală pentru detecția unei afecțiuni instalată la maturitate nu este o practică standard necesitând counseling genetic [13,14]. Testele ADN utilizate care au ca princiul de bază procedee diverse: secvențializarea întregii gene, combinația dintre screeningul prin imunostaining și truncarea proteică, doar truncarea proteică și analiza de linkage. Secvențializarea directă a ADN-ului este tipul de test cu cea

mai înaltă acuratețe de diagnostic (detectează 95% dintre mutații) [14]. O trăsătură care poate complica secvențializarea este detecția a numeroase alterări în secvențele de aminoacizi (mutații fără sens), a căror semnificație nu este cunoscută. Aceste modificări ar trebui considerate noninformative mai ales dacă studiile de linkage pot fi executate pentru a confirma asocierea modificării perechii de baze și PAF-ul în familie.

Strategia combinării dintre detecția mutațiilor utilizând electroforeza în plaje de gel și testarea prin troncarea proteică este disponibilă în anumite laboratoare și are o rată de detecție a mutațiilor de 80%-90%. Scanarea mutațiilor urmată de secvențializarea genică se poate utiliza pentru evaluarea exonilor de la 1 la 14 de la nivelul APC, prin troncarea proteică evaluându-se exonul 15. Unele laboratoare utilizează doar testarea prin troncarea proteică, deoarece cele mai multe mutații APC realizează troncarea precoce a proteinei. Această metodă este mai puțin sensibilă decât secvențializarea detectând doar 80% dintre mutațiile APC. Totuși dacă mai mulți membri ai unei familii făcând parte din mai multe generații sunt afectați analiza linkage poate fi efectuată chiar în familii care au testat negative pentru mutații APC. Indicațiile studiilor de linkage se bazează pe un diagnostic clinic precis și pe o corectă înțelegere a interconexiunilor genetice în cadrul familiei.

Markerii utilizați pentru analiza linkage sunt strâns legați de locusul APC-ului și pot fi utilizați la mai mult de 95% din membrii unei familii cu o acuratețe a determinării de 95%. Testarea linkage nu este disponibilă familiilor cu un singur individ afectat, fenomen întâlnit în peste 25% din cazurile de PAF. Este importantă conștientizarea faptului că testarea genetică pentru detectarea mutațiilor liniilor germinative APC în cazul persoanelor care nu au mai fost testate nu are o acuratețe de 100% indiferent de procedeul utilizat [14].

În concluzie, există diferite teste disponibile pentru detecția mutațiilor APC, alegerea celui mai potrivit test realizându-se în funcție de situația clinică.

Metodologia testării clinice pentru determinarea mutațiilor APC

Vârsta medie de diagnostic a PAF este 29 ani, iar a cancerului colo-rectal din PAF de 39 ani. Studiile de screening și autopsiile au relevat faptul că polipii adenomatoși pot fi prezenți la circa 30% din indivizii de vârstă medie sau la vârstnici. Având în vedere această prevalență și incidență cunoscută a cancerului colo-rectal, se pare că mai puțin de 1% dintre polipi malignizează. Perioada medie necesară evoluției secvenței “polip-cancer in situ-cancer invaziv” și distribuția ratei de progresie nu sunt cunoscute exact, estimarea acestora făcându-se prin date indirecte: observația directă a unor polipi benigni a arătat că transformarea malignă a necesitat un interval de 10-15 ani, “studiile portret” înregistrând vârsta medie a pacienților cu polipi aflați în diferite stadii de evoluție și a celor cu cancer invaziv. Observația directă a pacienților cu polipectomii în antecedente a arătat că apariția și degenerarea polipilor adenomatoși are loc foarte rar înaintea unui interval mai mic de 3 ani [15].

Indivizii cu istoric de PAF vor fi supuși testelor genetice pentru a afla în ce măsură sunt purtători ai genelor de risc, examene care se vor efectua întregii familii. La pacienții PAF se practică sigmoidoscopie începând cu vârsta de 10-12 ani, anual până la vârsta de 30 de ani, ulterior la fiecare 3-5 ani sau până când mutația liniei germinative este exclusă.

Pacienții cu risc (rudele de gradul I a indivizilor cu PAF) crescut ar trebui să intre în programul de screening pentru PAF începând cu vârsta de 10-12 ani. Dacă un test genetic informativ nu poate fi efectuat acești pacienți sunt îndrumați să recurgă la screeningul endoscopic, efectuând o sigmoidoscopie anual începând cu vârsta de 12 ani frecvența testării diminuându-se cu fiecare decadă care urmează. După vârsta de 50 de ani acești pacienți vor urma indicațiile *American Gastroenterology Association* pentru screeningul pacienților cu risc mediu.

Pentru pacienții cu PAF discret se practică colonoscopie anual începând cu vârsta de 10-17 ani [15].

4. Sindromul polipozei juvenile – SPJ

SPJ este sindromul polipozei hamartomatoase care se asociază cu risc crescut de cancer colo-rectal. Față de polipoza juvenilă care apare la 2% din copii, SPJ reprezintă un sindrom dominant autosomal de hamartomatoză gastro-intestinală polipoidă cu un risc care se asociază cu un risc crescut pentru cancer gastro-intestinal. Polipoza juvenilă are o marcă histologică caracteristică reprezentate de chisturi dilatate pline cu mucus, laminei proprii lipsindu-i stratul muscular neted [16]. Diagnosticul clinic de SPJ se stabilește pe următoarele criterii: mai mult de 3-10 polipi juvenili colonici, prezența polipilor juvenili la nivelul întregului tract gastro-intestinal și polipi juvenili (în orice număr) la pacienți cu istoric de polipoză juvenilă

Variantele clinice de ale SPJ includ SPJ cu afectare colonică primară, SPJ cu afectare gastrică și SPJ generalizat al tractului gastro-intestinal. Polipii juvenili pot apare și în cadrul sindroamelor Cowden, Gorlin și Bannayan-Ruvalcaba-Riley, afecțiuni care trebuiesc excluse înainte de stabilirea diagnosticului clinic de SPJ.

Sindromul polipozei mixte ereditare (HMPS) care a fost propus ca variantă a SPJ se caracterizează prin apariția de polipi juvenili atipici, adenoame colonice, carcinoame colo-rectale și un potențial crescut de apariție a polipilor inflamatori hiperplastici. Acest sindrom ar trebui luat în considerare când se pune problema diagnosticării SPJ. HMPS se a fost asociat cu o modificare a unui locus de pe cromozomul 3q deși gena responsabilă de manifestările clinice nu a fost identificată. Analiza de linkage a identificat un locus responsabil de HMPS la nivelul 6q [16,17].

Atitudinea actuală este aceea de a recolta de la acești indivizi ADN pentru a fi păstrat într-o bancă de țesuturi pentru eventuala reevaluare a diagnosticului [17].

Complicațiile benigne ale polipozei intestinale sunt reprezentate datorate polipozei intestinale se datorează hemoragiilor gastro-intestinale, obstrucției și invaginării și apar de obicei în primele trei decade de viață și sunt urmate de complicații maligne care apar de obicei după a cea de a patra decadă de viață. SPJ este asociat cu un risc de 10%-38% de a dezvolta cancer colo-rectal, neoplazia pare a avea originea la nivelul componentei adenomatoase prezentă în polipoza juvenilă. Posibilitatea apariției cancerului la nivelul stomacului sau duodenului este mai scăzută (15%-21%) și datorită localizărilor mai reduse a polipilor la nivelul tractului digestiv superior [17].

Testarea genetică pentru SPJ

Studiile efectuate de Howe și alții între 1998-2001 au evidențiat 2 loci diferiți (18q21.1 și 10q22q-23) care au arătat a avea un linkage puternic în familiile cu SPJ și au evidențiat faptul că genele cauzatoare care erau situate în acești loci erau MADH4/SMAD4/DPC4 și BMPR1A (receptorii proteinei osoase morfogenetice), respectiv SMAD4 (the human homologue of the Drosophila) și MADH4 care codează proteina Smad4, care este membru al familiei proteinelor Smad, o familie de proteine înalt conservată care servesc ca mediatori intracelulari cu reglarea semnalului transformării familiei factorului tumoral de creștere (TGF)- β . Identificarea mutațiilor MADH4 în familiile SPJ a implicat inactivarea semnalizării familiei TGF- β . Această superfamilie include nu numai TGF- β 1, TGF- β 2 și TGF- β 3 dar și proteinele osoase morfogenetice activina și inhibina [17]. Cele mai recente identificări de mutații în linia germinativă a unuia dintre receptorii proteinei osoase morfogenetice, BMPR1A, în cazul persoanelor cu SPJ a sugerat că SPJ se datorează disrupției de semnalizare a acestei subclase nespecifice de liganzi TGF- β , proteine morfogenetice osoase.

Teste pentru detectare a SPJ în momentul actual sunt disponibile doar într-un singur laborator în SUA. Persoanele cu SPJ și membrii familiei lor sunt candidați potriviți pentru testarea genetică în vederea determinării existenței MADH4 și BMPR1A mutante. Friedl et al

au observat un risc crescut de polipoză gastro-intestinală la indivizii la care s-au identificat mutații MADH4 care reprezintă prima corelare a genotip/fenotip făcută pentru SPJ [17,18]. În momentul actual se pare că nu există nici o dovadă pentru susținerea acestui tip de testare în vederea prezicerii vârstei de instalare, severității, tipului de simptome sau a ratei de progresie a neoplaziei la pacienții asimptomatici.

Identificarea mutației liniei germinative este importantă pentru stabilirea indicațiilor corecte în vederea intrării acestor pacienți într-un program de screening endoscopic. Ca și în cazul altor strategii de testing genetic dacă nici o mutație nu este identificată la nici unul din membrii afectați ai unei familii atunci rezultatele nu au rol informativ pentru îndreptarea către screening genetic a altor membri ai familiei care ar putea avea un risc crescut de a dezvolta neoplazii colo-rectale. Acest rezultat nu certifică inexistența susceptibilității moștenite a riscului crescut de a dezvolta cancer colo-rectal, ci induce faptul că testul nu a fost suficient de sensibil pentru a detecta mutația.

Algoritm de screening pentru SPJ

Vârsta de diagnostic are, două vârfuri: unul în copilărie iar al doilea în jurul vârstei de 28 ani. SPJ multiplă necesită polipectomie colonoscopică în cazul pacienților cu un număr mic de polipi deoarece riscul de apariție al complicațiilor (hemoragie, obstrucție) se reduce semnificativ. În cazul formelor severe se indică colectomie totală cu anastomoză ileo-rectală. Mucoasa rectală necesită a fi îndepărtată la pacienții cu formă difuză de SPJ datorită riscului remanent de a dezvolta cancer pe rectul restant. Pacienților cu SPJ le este indicată efectuarea colonoscopiei începând cu vârsta de 15-18 ani anual sau odată la 2 ani, chiar mai devreme dacă simptomatologia o necesită [18].

5. Sindromul Peutz - Jeghers - SPJGH

SPJGH este un sindrom de polipoză hamartomatoasă și se caracterizează prin polipoză hamartomatoasă gastro-intestinală și macule melanocitare la nivelul buzelor, mucoasei bucale și degetelor. Este un sindrom autosomal dominant care apare 1: 200000 de nașteri. Polipii hamartomatoși care apar în acest sindrom sunt caracterizați prin benzi de țesut muscular neted prezent în lamina proprie. Diagnosticul clinic de SPJGH se poate suspiciiona dacă se evidențiază doi sau mai mulți polipi de tip Peutz-Jeghers în tractul gastro-intestinal sau dacă un polip Peutz-Jeghers se asociază cu pigmentare caracteristică sau cu antecedente heredo-colaterale de SPJGH [19].

Clinic se observă:

a) *pigmentație cutanată*: 1) macule melanice de culoare maron închis, situate la mănecă mucoasei labiale, la nivelul mucoasei bucale și digestive; 2) mai puțin frecvent macule melanice se întâlnesc la nivelul tegumentului periorbital, perinazal, auricular, perianal, vulvar; 3) maculele melanice nu se regăsesc la naștere, apar în copilărie atingând un maxim de intensitate la pubertate; 4) pot degenera odată cu înaintarea în vârstă dar nu s-au raportat cazuri de malignizare [19]

b) *polipoza intestinală*: simptomatologia este reprezentată de dureri abdominale și invaginație recurentă; ± anemie hipocromă, melenă sau rectoragii, hematemeză; localizarea cea mai frecventă este situată la nivelul colonului.

Aproximativ 50% dintre pacienții cu SPJGH nu au antecedente familiale. Persoanele care prezintă însă un istoric familial sugestiv penetrația este aproape completă. În afară de predispoziția pentru cancer colo-rectal, SPJGH este asociat cu un risc crescut pentru anumite neoplasme, cancer pancreatic, pulmonar, uterin, gastric, cancer de sân, melanoame. Datorită posibilității apariției unor cancere care au origine în diferite țesuturi este necesar un program de supraveghere extins. Acest program de supraveghere este bazat pe recomandările din „*St. Mark's Polyposis Registry*” care s-au elaborat pe baza unor opinii ale experților în materie și

nu pe baza unor dovezi provenite din trialuri clinice. Aceste criterii au fost reevaluate de curând în vederea detalierii testelor specifice și specificării intervalelor de testare recomandate [18,19].

Testarea genetică pentru SPJGH

Managementul SPJGH a fost îmbunătățit semnificativ în 1998 prin identificarea genei implicate în aproximativ 40%-60% din cazurile de SPJGH (STK11/LKB1). STK11 este o serin treonin kinază care se poate localiza în nucleu, rolul său în reglarea funcțiilor este parțial cunoscut. STK11 (gena serine/threonine kinase 11) prezintă 9 exoni care codează 436-aminoacid serin treonin kinaza care poate fi implicată în încetarea ciclului celular G1. Activitatea kinazică a STK11 pare a fi importantă în efectul său supresor tumoral. Într-adevăr mutațiile fără sens care prezic eliminarea activității kinazice ale LKB1 dar nu și ale structurii au fost observate la pacienții cu SPJGH. Karuman et al. au arătat ca LKB1 se asociază cu p53 având rol în reglarea specifică a căilor apoptotice p-53 dependente [19].

Testarea genetică pentru SPJGH se poate realiza, actualmente existând teste care detectează mutația STK11, aceasta fiind singura genă identificată a fi implicată în producerea SPJGH. Persoanele cu SPJGH și rudele lor sunt candidații cei mai potriviți pentru testarea genetică utilizându-se teste care evaluează mutațiile STK11. Analizarea mutațiilor STK11 se face de obicei prin secvențializarea ADN-ului, care are o sensibilitate de aproximativ 70% în familiile cu SPJGH cunoscute pentru linkage-ul cu STK11. Analizarea ADN-ului pare a avea o sensibilitate analitică scăzută printre acei indivizi cu SPJGH sporadic. Mutațiile identificate sunt reprezentate de mutațiile fără sens, mutațiile cu sens greșit, mutațiile deleție-inversie. Mutațiile cu sens greșit reprezintă 35% dintre mutațiile detectate prin secvențializarea ADN-ului. Aceste mutații pot avea o semnificație necunoscută și pot avea o valoare limitată în managementul pacienților în funcție de localizarea schimbării și tipului de schimbare a aminoacidului [19,20].

Aproximativ 50% dintre cazurile de SPJGH par a fi cauzate de mutațiile STK 11. Testarea în acest caz nu are rol în evaluarea vârstei de instalare, severitatea, tipul de sindrom sau rata progresiei la pacienții asimptomatici. Identificarea unei mutații STK11 poate fi motivul recomandării intrării într-un program de supraveghere a persoanelor purtătoare. Ca în toate sindroamele de polipoză intestinală testarea genetică pentru diagnosticarea SPJGH ar trebui să înceapă prin testarea unui membru afectat al familiei testate. Dacă mutația SRK11 este evidențiată se indică testarea genetică a părinților neafecțați, a rudelor mai ales dacă unul dintre părinți prezintă o mutație STK11.

Algoritm de screening

În sindromul Peutz-Jeghers [20] se recomandă efectuarea colonoscopiei începând cu vârsta de 18 (sau mai devreme dacă simptomatologia o impune), o dată la 3 ani. Se practică polipectomia, în special când polipii au peste 1,5 cm iar postoperator se recomandă colonoscopia pentru depistarea recurențelor. Se recomandă screening periodic pentru sân, cervix uterin, testicule, ovare, tract gastrointestinal superior, pancreas.

6. Sindromul Cowden

Este o afecțiune autozomal dominantă cauzată de o mutație localizată pe brațul lung al cromozomului 10 caracterizat prin multiple leziuni hamartomatoase situate la nivelul tegumentelor, mucoaselor, sân, tiroidă, tractului gastro-intestinal având o incidență crescută pentru cancer mamar și tiroidian.

Leziuni cutanate și mucoase: la nivelul tegumentului – papule faciale, cheratoză, fibroame scleroase multiple; papilomatoza mucoasei orale.

Manifestări extra gastro-intestinale: adenomatoză tiroidiană, adenocarcinom folicular,

3-12%; carcinom mamar de tip ductal (25-50% din cazuri), frecvent bilateral

Polipoza gastro-intestinală: manifestă la 40-70% dintre pacienți; polipi sesili de mici dimensiuni cu proliferare exofitică minoră și modificare minoră a muscularis mucosae.

Manifestări la nivelul S.N.C.: macrocefalia, gangliocitom cerebelar, retard mintal [20,21]

7. Sindromul Ruvalcaba-Myre-Smith

Sindrom care se caracterizează prin microcefalie, disfuncție cognitivă și motorie, lipoame viscerale și subcutanate, hemangioame, macule pigmentare și polipoză de tip adenomatos juvenil la nivelul colonului. Nu este documentată transformarea malignă leziunilor anterioare.

Ca și în sindromul Cowden prezintă o modificare la nivelul brațului lung al cromozomului 10 (10q21-23) ceea ce făcut să fie considerat ca o expresie a aceleiași maladii [20,21].

CONCLUZII

Viitorul tratamentului cancerului colo-rectal este reprezentat de screening-ul efectuat în timp util și la persoanele strict recomandate.

Este important de subliniat dezvoltarea testelor genetice, care au început să aibă o specificitate din ce în ce mai mare odată cu descifrarea hărții genomului uman. Indivizilor cu rezultate incerte sau pozitive ale testelor genetice pe viitor trebuie să fie informați de necesitatea recoltării de probe de ADN modificat pentru a fi disponibile ulterior la apariția eventualelor noi metode de investigare.

Strategiile de screening vor trebui îndreptate spre detecția cancerelor precoce pentru a reduce morbiditatea și mortalitatea, și de asemenea spre rezecția polipilor premaligni pentru a reduce incidența cancerului colo-rectal.

Stabilirea exactă a carcinogenezei colo-rectale va aduce multiple beneficii ce includ: diagnosticul presimptomatic al cancerului colo-rectal ereditar, evaluarea potențialului malign tumoral, individualizarea procedeelelor operatorii și a sensibilității la chimioterapice, predicția posibilității de apariție a unui al doilea cancer primar [21].

BIBLIOGRAFIE

1. Terdiman J.P., Conrad P.G., Sleisenger M.H.: Genetic testing in hereditary colorectal cancer: indications and procedures, *Am J Gastroenterol* 1999, 94:2344–2356.
2. Shields P.G., Harris C.C.: Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions, *J Clin Oncol* 2000, 18:2309–2315.
3. Johns L.E., Houlston R.S.: A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk, *Am J Gastroenterol*, 200, 96: 2992–3003.
4. Giardiello F.M., Brensinger J.D., Petersen G.M.: AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing, *Gastroenterology*, 2001, 121:198–213.
5. Jones S., Emmerson P., Maynard J., et al: Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G: C 3 T: A mutations, *Hum Mol Genet* 2002; 11:2961–2296.
6. Sieber O.M., Lipton L., Crabtree M. et al.: Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH, *N Engl J Med*, 2003, 348:791–799.
7. Yao M., Lam E.C., Kelly C.R., Zhou Wet al.: Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer, *Br J Cancer*, 2004, 90:712–719.
8. Peters U., Chatterjee N., Yeager M., et al.: Association of genetic variants in the calcium-sensing receptor with risk of colorectal adenoma, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13: 2181–2186.
9. Coreea M.C., Hengmi C.U.I., Francis M., Giardiello F. M., et al.: Loss of Imprinting of Insulin Growth Factor II Gene: A Potential Heritable Biomarker for Colon Neoplasia Predisposition, *Gastroenterology*, 2004, 126: 964-970.
10. Solomon C.H., Pho L.N., Burt R.W.: Current status of genetic testing colorectal cancer susceptibility, *Oncology* (Huntingt) 2002, 16:161–171.

11. Jaiswal A.S., Balusu R., Narayan N.: Involvement of adenomatous polyposis coli in colorectal tumorigenesis, *S.Front Biosci*, 2005, 10:1118-1134.
12. NCCN colorectal cancer screening practice guidelines National Comprehensive Cancer Network.Oncology (Huntingt), 1999, 13:152-179.
13. Laken S.J., Petersen G.M., Gruber S.B.: Familial colorectal cancer in Ashkenazi due to a hypermut-able tract in APC, *Nat Genet*, 1997, 17:79–83.1997; 113:1146-1158.
14. Winaver S., Fletcher R., Rex D.: Colorectal Cancer Screening and Surveillance: Clinical Guidelines and Rationale - Update Based on New Evidence, *Gastroenterology*, 2003, 124:544 -560.
15. AGA Technical Review on Hereditary Colorectal Cancer and Genetic Testing, *Gastroenterology* 2001, 121:198-213.
16. Canaletti M., Fornaro R., Davini et al.: Report of a case of Gardner's syndrome: clinical and epidemiologic considerations and review of the literature, *Chir Ital*, 2003; 55(5):741-751.
17. Jass J.R., Williams C.B., Bussey H.J., Morson B.C., Juvenile polyposis—a precancerous condition, *Histopathology*, 1988, 13:619-630.
18. Howe J.R., Shellnut J., Wagner B., Ringold J.C. et al.: Common deletion of SMAD4 in juvenile polyposis is a mutational hotspot, *Am J Hum Genet*, 2002, 70:1357-1362.
19. Abed A.A., Gunther K., Kraus C.: Mutation screening at the RNA level of the STK11/LKB1 gene in Peutz-Jeghers syndrome reveals complex splicing abnormalities and a novel mRNA isoform (STK11 c.597 (insertion mark) 598insIVS4), *Hum Mutat*, 2001, 18:397-410.
20. Giardiello F.M., Brensinger J.D., Tersmette A.C., et al.: Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome *Gastroenterology*, 2000, 119: 1447-1453.
21. Winaver S., Fletcher R., Rex D.: Colorectal Cancer Screening and Surveillance: Clinical Guidelines and Rationale - Update Based on New Evidence, *Gastroenterology*, 2003, 124:544 -560.