

## ELEMENTE DE DIAGNOSTIC AL CANCERULUI COLO-RECTAL EREDITAR NON-POLIPOZIC

Elena Dajbog<sup>1</sup>, L.P. Lefter<sup>1</sup>, V. Scripcariu<sup>1</sup>, P. Stanton<sup>2</sup>, C. Dragomir<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica a-III-a Chirurgie, Spitalul „Sf. Spiridon” Iași

Centrul de Cercetare în Chirurgie Oncologică

Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa” Iași

<sup>2</sup>Royal Hobart Hospital, University of Tasmania, Australia

**DIAGNOSIS FEATURES IN NON POLIPOSYS HEREDITARY COLORECTAL CANCER (Abstract):** Non polyposis colorectal cancer has been identified as an appropriate candidate for early detection and treatment. Incidence of colorectal cancer among persons at average risk is sufficiently high to justify an early diagnosis. The introduction into clinical practice of genetic testing for the assessment of colon cancer risk has led to more effective management for patients with high-risk colorectal cancer and has new features of challenge. This review presents complex elements in the non polyposis colorectal cancer assessment.

KEY WORDS: NON POLYPOSIS COLO-RECTAL CANCER, SCREENING, EARLY DIAGNOSIS.

Correspondență: Dr. Elena Dajbog, Clinica a III-a Chirurgie, Spitalul „Sf. Spiridon” Iași, Bd. Independenței, nr. 1, Iași, 700111; e-mail: lilefter@gmail.com\*

### INTRODUCERE

Aproximativ 5-10% din totalul pacienților cu cancer colo-rectal fac parte din familii cu cancer colo-rectal nonpolipozic ereditar (HNPCC). În anumite familii cu risc crescut pentru cancer colo-rectal malignitatea nu este asociată cu un număr excesiv de polipi colonici, de aceea termenul de “non-polipozic” se referă la prezența unui număr mic de polipi (mai mic de 100), frecvent solitari și cu aspect macroscopic plat; transformarea malignă a acestora este mai rapidă decât cea a polipilor colo-rectali diagnosticați în populația generală.

Sindromul Lynch I cuprinde doar pacienții cu risc crescut de dezvoltare a cancerului colo-rectal, iar sindromul Lynch II pe aceia care asociază și un risc crescut de apariție a unor cancere extracolonică (ovar, endometru). Varietăți genetice ale HNPCC sunt sindromul Muir-Torre (manifestarea extracolonică fiind cancerul cutanat) și sindromul Turcot II (asocierea oligopolipozei cu glioblastoame).

Cancerul colo-rectal ereditar non-polipozic a fost descris prima dată în 1913 și ulterior în 1966 de Lynch [1]. Sub numele de „sindromul cancerului familial” HNPCC se caracterizează prin apariția precoce a cancerului colo-rectal și a unor cancere extracolonică (ex. cancer de endometru, ovar, stomac, tract urinar, renal, biliar sau al vezicii biliare, sistem nervos central, intestin subțire) la mai mulți dintre membrii unei familii. Ceea ce este sugestiv pentru diagnosticul de HNPCC este apariția unor cancere colonice sincrone sau metacrone în special la nivelul colonului drept la mai mulți indivizi făcând parte din aceeași familie. La aproximativ 45% din membrii afectați ai unei familii cancerurile colo-rectale multiple sincrone sau/și metacrone vor apare la mai puțin de 10 ani de la rezecția tumorii inițiale. În ciuda denumirii, aceste cancere colo-rectale nu se dezvoltă ca leziuni de novo ci apar la nivelul unor adenoame care par a avea o rată de transformare malignă extrem de accelerată [2]. Adenoamele descoperite la pacienții cu HNPCC sunt frecvent diagnosticate într-un stadiu histologic avansat și prezintă arii întinse de displazie severă. Criteriile de diagnostic clinic care definesc HNPCC s-au modificat treptat din 1990 când erau reprezentate de criteriile

---

\* received date: 20.04.2006  
accepted date: 15.05.2006

Amsterdam. Acestea au fost create încercând să se stabilească un set de elemente clinice consistente care să definească HNPCC. Din momentul descoperirii etiologiei genetice a majorității tipurilor de HNPCC a fost acceptat faptul că prin aplicare în procesul de diagnosticare doar a criteriilor Amsterdam o parte dintre familiile care sunt purtătoare ale mutațiilor linilor germinative de la nivelul MLH1 și MSH2 ar putea fi excluse [3]. Consecința acestor concluzii în 1996 au fost elaborate criteriile Bethesda. Acestea au o sensibilitate crescută în comparație cu criteriile Amsterdam și pot fi utilizate pentru identificarea pacienților care ar trebui să intre într-un program de screening genetic pantru HNPCC, specificitatea fiind însă mult mai scăzută. Un al treilea set de criterii a fost elaborat în 1999 - Amsterdam II- pentru a modifica strictetea criteriilor Amsterdam și a optimiza specificitatea scăzută a criteriilor Bethesda [3, 4].

## CRITERIILE CLINICE DE DIAGNOSTIC PENTRU HNPCC

### ***I. Criteriile Amsterdam*** (diagnosticul este pozitiv când sunt îndeplinite toate criteriile)

1. Un membru al familiei diagnosticat cu cancer colo-rectal înainte împlinirii vârstei de 50 de ani;
2. Existența două generații consecutive afectate;
3. Trei rude afectate, una dintre ele fiind rudă de gradul I cu celelalte două;
4. FAP trebuie să fie exclus;
5. Diagnosticul de cancer colo-rectal trebuie stabilit anatomo-patologic.

### ***II. Criteriile Amsterdam II*** (diagnosticul este pozitiv când sunt îndeplinite toate criteriile)

1. Existența a cel puțin trei rude cu un cancer HNPCC asociat (cancer colo-rectal sau un cancer de endometru, intestin subțire, ureter sau pelvis renal);
2. Unul dintre membrii familiei diagnosticat cu cancer colo-rectal trebuie să fie rudă de gradul I cu ceilalți doi;
3. Cel puțin două generații succesive trebuie să fie afectate;
4. Cel puțin unul dintre membrii diagnosticați ai unei familii trebuie să aibă sub 50 de ani;
6. FAP ar trebui să fie exclus în cazurile cu cancer colo-rectal;
7. Diagnosticul de cancer colo-rectal trebuie stabilit anatomo-patologic .

### ***III. Bethesda guidelines*** (oricare dintre criteriile de mai jos este suficient pentru diagnostic)

1. Membru al unei familii în care s-au diagnosticat neoplazii și îndeplinește criteriile Amsterdam;
2. Persoane cu două rude afectate de neoplazii care pot însoți HNPCC, inclusiv cancere colo-rectale sincrone și metacrone sau cancere extracolice asociate (cancer endometrial, ovarian, gastric, hepato-biliar, de intestin subțire, carcinom celular tranzițional al pelvisului renal sau ureter);
3. Persoane cu cancer colo-rectal cu rude de gradul I cu cancer colo-rectal și/sau cancer extracolonic ce însoțește HNPCC și sau adenoame colo-rectale; unul dintre cancere diagnosticat la o vârstă mai mică de 45 de ani, iar adenoamele diagnosticate la o vârstă mai mică de 40 de ani;
4. Persoane cu cancer colo-rectal sau endometrial diagnosticat la o vârstă mai mică de 45 ani;
5. Persoane cu cancer colo-rectal la nivelul colonului drept de tip nediferențiat (solid/cribriform) cu vârstă mai mică de 45 de ani. (Notă: solid/cribriform definește un

- carcinom nediferențiat sau slab diferențiat alcătuit din teci solide neregulate de celule eozinofile ce conțin spații mici de tip glandular);
6. Indivizi cu cancer colo-rectal cu celule în inel cu pecete diagnosticat la vârstă mai mică de 45 de ani;
  8. Indivizi cu adenoame colo-rectale diagnosticate la vârste mai mici de 40 de ani [5].

În consecință, actualmente se utilizează 3 tipuri de criterii clinice pentru diagnosticul HNPCC toate fiind create în tentativa de a crește acuratețea diagnosticului clinic în vederea identificării indivizilor cu o probabilitate crescută de a prezenta gene MMR (mismatch repair). Când posibilitatea de a exista mutații în liniile germinative MLH1, MLH2 este cuantificată criteriile Amsterdam sunt cele mai stricte urmate de celelalte două tipuri de criterii. Dacă criteriile Amsterdam sunt îndeplinite există posibilitatea de 25%-85% să se descopere mutații ale liniilor germinative MSH2 sau MLH1. Totuși dacă HNPCC este suspectat dar criteriile Amsterdam nu sunt îndeplinite doar 16%-30% dintre familiile suspectate vor prezenta mutații detectabile ale liniilor germinative MMR. Elaborarea a 3 seturi diferite de criterii clinice pentru stabilirea diagnosticului de HNPCC a condus la efectuarea unor studii care să stabilească care set de criterii este optim în identificarea pacienților care vor recurge ulterior la teste genetice care să descrie existența mutațiilor liniilor germinative caracteristice în HNPCC. Anumiți experți recomandă pentru testare genetică persoanele care îndeplinesc primele 3 criterii Bethesda, în timp ce alții recomandă întâi testarea țesutului tumoral pentru detectarea MSI (instabilitate microsatelită) [6].

### INSTABILITATEA MICROSATELITĂ

Neoplaziile și majoritatea adenoamelor care se descriu în cadrul HNPCC prezintă o modificare moleculară care poartă numele de instabilitate microsatelită. MSI se recunoaște prin frecvența apariției mutațiilor de inserție și deleție în repetările microsatelite, care sunt un număr variabil de secvențe repetitive de mononucleotide, dinucleotide și trinucleotide care se găsesc la nivelul genomului uman. Recunoașterea MSI la nivelul tumorilor care se dezvoltă în familiile HNPCC nu duc numai la descoperirea genelor care cauzează HNPCC dar conduc și la identificarea familiilor suspectate de HNPCC care pot fi purtătoare ale mutațiilor liniilor germinative din MLH1 sau MSH2. MSI se identifică clinic, utilizându-se teste de laborator care au ca bază ADN extras din țesut proaspăt sau inclus la parafină provenind din tumori ale indivizilor suspectați a avea HNPCC. Identificarea MSI în diagnosticarea HNPCC a dus la adoptarea unei strategii de diagnostic genetic care utilizează:

- teste care se bazează pe analizarea de probe sangvine pentru detecția mutațiilor liniilor germinative;
- teste care se efectuează pe material tumoral recoltat prin care se urmărește detectarea pierderii funcției de producție a genei la nivel tumorilor indivizilor afectați.

Determinarea MSI tumorale poate fi utilizată pentru diagnosticul diferențial dintre FAP (polipoza adenomatoasă familială) și HNPCC în situațiile în care elementele clinice de diagnostic sunt ambigui [7].

### TESTAREA GENETICĂ PENTRU DIAGNOSTICAREA HNPCC

#### *Mutația genelor de reparare (MMR)*

Testarea genetică în familiile HNPCC se utilizează de rutină deoarece poate susține diagnosticul de HNPCC într-o familie suspectă, important fiind faptul că se poate utiliza în testarea membrilor asimptomatici a unei familii cunoscută ca fiind purtătoare a mutației liniei germinative.

**Evaluarea riscului genetic** - în vederea diagnosticului de HNPCC debutează cu:

- evidențierea antecedentelor familiale de neoplazie colonică,
- determinarea existenței altor cancere care pot fi întâlnite în HNPCC,
- descoperirea unui istoric familial tipic, cu cancere sincrone și metacrone
- stabilirea vârstei instalării acestor cancere [8].

Istoricul medical familial poate fi utilizat pentru a orienta testarea genetică, posibilitatea determinării unei mutații a liniei germinative a unei gene implicate în HNPCC depinzând în principal de istoricul familial și vârsta la care s-a instalat neoplazia. Actualmente se apreciază că multe cazuri de HNPCC se datorează inactivării procesului mutațiilor MMR datorită defectelor unor gene ale liniilor germinative ale genelor care codează componentele cheie ale complexelor de reparare MMR. Sistemul MMR al ADN-ului este alcătuit dintr-un complex de proteine care recunoaște și repară perechile de baze MM care apar în timpul replicării ADN-ului. Cel puțin 8 gene, incluzând 7 care codează proteinele implicate în sistemul MMR, au fost implicate cauzal HNPCC-ul familial cât și în HNPCC-ul familial atipic. Aceste gene sunt în ordine crescătoare a frecvenței apariției: EXO1, TGFBR2, PMS2 (la nivelul cromozomului 7q 11), PMS1 (la nivelul cromozomului 2q 31), MLH3, MSH6, MSH2 (la nivelul cromozomului 2p16), MLH1 (la nivelul cromozomului 3p21). Se pare că există o corelație între anumite mutații genetice fenotipul maladiei [9]. Mutațiile liniei germinative în cazul MSH6 sunt asociate cu forme atipice de HNPCC care adesea nu îndeplinesc criteriile Amsterdam datorită vârstei mai înaintate de apariție a neoplaziilor și a tumorilor care prezintă un nivel scăzut de MSI [9,10].

Famiiliile cu HNPCC prezintă mutații ale liniei germinative MSH2, MSH1 în 45%-70% dintre familii care îndeplinesc criteriile clinice de HNPCC. În mai mult de 95% dintre cazurile de HNPCC în care s-a practicat diagnosticul molecular s-a observat că afecțiunea era secundară mutațiilor liniilor germinative MLH1, MSH2. Mutațiile care apar la nivelul acestor gene tind să fie mutații punctiforme care reprezintă substituția unei singure perechi de baze, deleții sau inserții. Există un număr de mutații recurente care au fost identificate la membrii familiilor cu HNPCC. Totuși nu s-a evidențiat un anumit punct mutagen care să permită crearea unui test screening. Secvențializarea ADN-ului este tehnica disponibilă cea mai precisă pentru identificarea mutațiilor genetice. Datorită faptului că o singură alelă este suficient să mențină activitatea MMR teste funcționale care să detecteze purtătorii mutației genei MMR nu au fost elaborate pentru uzul clinic. Studii recente au evidențiat că în viitor este posibilă apariția unui astfel de test prin forțarea unei celule la un status hemizigot, conversie tehnologică, caz în care o alelă MMR mutantă ar putea fi detectată cu test funcțional de screening [10].

#### **Testarea instabilității microsatelite**

Neoplaziile care apar în familiile care sunt suspectate ca ar avea HNPCC pot fi evaluate pentru MSI. Utilizarea testării MSI este importantă în evaluarea HNPCC deoarece îmbunătățește raportul cost/eficiență al strategiei de diagnostic molecular a HNPCC. Analiza mutațiilor directe ale MLH1 și MSH2 este foarte costisitoare motiv pentru care s-a elaborat un algoritm de diagnostic care utilizează testarea MSI tumorale încercând îmbunătățirea posibilității de identificare a mutației liniei germinative. S-a dovedit faptul că analizarea directă a mutațiilor este eficientă pentru familiile care îndeplinesc criteriile Amsterdam. Familiile care îndeplinesc criteriile Amsterdam II și Bethesda sau cel puțin unul din criteriile esențiale de diagnostic ar trebui testate primele pentru MSI tumorală [8, 9, 10]. Aceste familii care prezintă MSI tumorală ar trebui să fie supuse testărilor pentru detecția prezenței eventualelor mutații. Inițierea testării genetice în cazul familiilor suspectate a avea HNPCC la care s-a efectuat testarea MSI se realizează dacă sunt îndeplinite următoarele criterii:

1. persoane cu cancer de colon care au vârsta mai mare de 45 de ani;

2. persoane având cancer de colon localizat la nivelul colonului drept cu o componentă mucinoasă;
3. persoane diagnosticate cu cancer de colon care au o rudă de gradul II care are cancer de colon sau o rudă cu cancer de colon care are vârsta mai mică de 50 de ani [9,10].

Wijnen et al., a sugerat faptul că dacă există posibilitatea de a exista 20% șanse de a evidenția o mutație a liniei germinative, ar trebui efectuată analiza directă a liniei germinative și nu testarea MSI tumorală a membrilor familiei afectate. Deoarece MLH1 și MSH2 sunt genele cele mai frecvent afectate în familiile cu HNPCC, utilizarea immunostaining pentru determinarea pierderii expresiei MLH1 și MSH2 în cancerul de colon a fost propusă ca test de bază în determinarea tumorilor pentru identificarea familiilor care ar trebui testate pentru suspiciunea de mutații a liniei germinative. Pierderea expresiei pentru proteine ar trebui corelată cu prezența MSI și poate sugera ce genă specifică MMR este modificată la un anumit pacient [11].

Fiecare din acești algoritmi are avantaje și dezavantaje de aceea este necesară adresarea familiilor suspectate de a avea HNPCC unor centre specializate în testing genetic. Trebuie menționat faptul că inactivarea somatică a MLH1 prin metilare aberantă a precursorului MLH1 produce o creștere cu 15% a apariției cancerelor sporadice de colon. Atât în cazul HNPCC cât și a metilării somatice a MLH1 neoplaziile exprimă MSI. Deci identificarea MSI în cancerule de colon poate fi utilizată pentru precizarea probabilității detecției mutațiilor liniei germinative ale MLH1, MSH2 neputând fi utilizată ca marker surogat pentru detecția mutației liniei germinative într-o genă MMR.

În ceea ce privește detecția MSI aceasta este realizată prin analizarea ADN-ului recoltat din adenoamele și cancerule de colon ale pacienților afectați care prezintă alterări ale locilor de MSI care frecvent sunt modificați în procesul de inactivare a MMR. Multe cancerule de colon prezintă mutații standard într-un mic procentaj de repetări microsatelite. Diagnosticul molecular de adenocarcinom de colon pe baza prezenței MSI se raportează la detectarea a doi loci instabili din cei 5 loci posibil instabili care au fost selectați de *National Cancer Institute, USA* [12]. Cancerule care prezintă unul din cei cinci loci instabili sunt de obicei testate pentru încă cinci markeri și ulterior retestate. Dacă o tumoră prezintă markeri de instabilitate în proporție de peste 30%-40% este clasificată ca având MSI înaltă iar dacă mai puțin de 30% dintre markeri sunt instabili tumora este considerată ca fiind cu MSI scăzută. Dacă nici unul dintre loci nu este instabil tumora este considerată ca fiind microsatelit stabilă iar probabilitatea identificării mutațiilor MLH1 sau MSH2 este foarte scăzută. Majoritatea tumorilor HNPCC vor fi cu MSI înaltă.

O aplicație recentă a testării MSI este testul PreGen 26 (EXACT Sciences, Maynard, MA). Acest detectează MSI ADN în probe de scaun utilizând un test care detectează instabilitatea la nivelul locusului BAT-26, care este un locus de instabilitate în mai mult de 90% din cancerule MSI. Acest test este comercializat fiind utilizat actualmente pentru supravegherea evoluției pacienților cu HNPCC, deși rolul său în managementul HNPCC nu a fost clarificat încă [13].

#### ***Teste și testarea genetică în HNPCC***

Obiectivul principal al testării genetice este de a determina dacă elementele clinice care au dus la indicația de testare sunt suficiente pentru un examen molecular amănunțit. Dacă nu sunt îndeplinite suficiente criteriile clinice se va recomanda efectuarea inițială a unui test de detectare a MSI la nivelul tumorilor colo-rectale ale membrilor afectați de neoplazie (dacă este posibil). Dacă criteriile clinice de testare sunt îndeplinite se recomandă efectuarea mai întâi testarea liniei germinative pentru detectarea mutațiilor MLH1 și MSH2. Dacă o familie nu satisface criteriile clinice de testare, este „MSI low” dar totuși suspiciune de HNPCC persistă atunci se recomandă testarea mutațiilor liniei germinative MSH6.

Dacă o mutație este identificată la o persoană afectată testarea aceleiași mutații se recomandă să fie făcută la toți membrii familiei considerați a fi cu risc înalt. Dacă nu se identifică nici o mutație la un membru afectat al unei familii atunci rezultatele nu pot indica testarea unor rude care ar putea avea risc crescut de HNPCC. Un rezultat ambiguu nu indică faptul că membrii familiei suspecte nu ar putea prezenta susceptibilitate moștenită pentru cancer de colon ci mai curând sugerează faptul că testul nu este suficient de sensibil pentru a detecta gena mutantă [12].

Sensibilitatea actuală a testării pentru detecția mutațiilor MLH1 și MSH2 la familiile suspectate a prezenta HNPCC este situată între 50% și 90% în funcție de metoda de testare utilizată. Un alt motiv pentru imposibilitatea detectării mutațiilor este faptul că există posibilitatea dezvoltării și a unor cancere sporadice la persoanele suspectate de a avea HNPCC deși în cadrul familiei majoritatea membrilor au neoplazii apărute în cadrul HNPCC.

Eșecul detecției unor mutații pot să exprime și faptul că într-adevăr familia nu prezintă un risc crescut de HNPCC în ciuda criteriilor clinice care ar sugera acest fapt. Dacă nici o mutație nu poate fi identificată testarea ulterioară nu este obligatorie pentru ceilalți membri ai familiei. Membrii unei familii care prezintă risc crescut pentru HNPCC ar trebui considerați a avea un risc crescut pentru apariția cancerului colo-rectal și de aceea ar trebui îndreptați către efectuarea unui screening intens în comparație cu populația generală [12].

## CONCLUZII

Sindroamele ereditare non-polipozice sunt caracterizate prin instabilitate genetică. Cancerele de colon sporadice neereditare au o prevalență crescută și au trăsături comune, cele două fenotipuri genetice mutaționale fiind bine definite. Căile utilizate de celulele maligne în neoplaziile sporadice sunt similare celor utilizate de sindroamele ereditare. În timp ce recurența locală a cancerului colo-rectal este atipică, reparația polipilor premaligni este clasică și la fel de predictibilă ca și cancerele secundare ale plămânului, capului și gâtului. Scopul prevenției ar trebui să fie reprezentat de inhibarea apariției și progresiei leziunilor premaligne.

Actualmente, există definit în ghidurile de screening un consens în ceea ce privește faptul că screening-ul pentru depistarea cancerului colo-rectal este eficient, reducând mortalitatea când este efectuat corespunzător. Totuși, deși aceste ghiduri au un mesaj standard, recomandările specifice diferă.

## BIBLIOGRAFIE

1. Grady MW. Genetic Testing for High-Risk Colon Cancer Patients. *Gastroenterology* 2003; 124: 1574-1594.
2. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M, Gruenthal K, Leppert MF, Slattery ML. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 2001; 121: 830-838.
3. Ravnik-Glavac M, Potocnik U, Glavac D. Incidence of germline hMLH1 and hMSH2 mutations (HNPCC patients) among newly diagnosed colorectal cancers in a Slovenian population. *J Med Genet* 2000; 37: 533-536.
4. 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: 424-425.
5. Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T, Hodgson SV, Harocopos CJ, Bodmer WF. Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary non-polyposis colorectal cancer even if the Amsterdam criteria are not fulfilled. *Br J Surg* 1997; 84: 233-237.
6. Wang Q, Lasset C, Desseigne F. Prevalence of germline mutations of hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, and hMSH6 genes in 75 French kindreds with nonpolyposis colorectal cancer. *Hum Genet* 1999; 105: 79-85.
7. Nystrom-Lahti M, Perrera C, Raschle M, Panyushkina-Seiler E, Marra G, Curci A, Quaresima B, Costanzo F, D'Urso M, Ventuna S, Jiricny J. Functional analysis of MLH1 mutations linked to hereditary nonpolyposis colon cancer. *Genes Chromosom Cancer* 2002; 33: 160-167.

8. Yan H, Papadopoulos N, Marra G, Perrera C, Jiricny J, Boland CR, Lynch HT, Chadwick RB, de la Chapelle A, Berg K, Eshleman JR, Yuan W, Markowitz S, Laken SJ, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Conversion of diploidy to haploidy. *Nature* 2000; 403: 723-724.
9. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1481-1487.
10. Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, Manno M, Selander T, Aronson M, Redston M, Cotterchio M, Knight J, Gryfe R, Gallinger S. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(21): 1631-1634.
11. Hoang J-M, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 300-303.
12. AGA Technical Review on Hereditary Colorectal Cancer and Genetic Testing. *Gastroenterology* 2001; 121: 198-213.