

Instituto Nacional de Gastroenterología

## La inestabilidad en microsatélites: algunos aspectos de su relación con el cáncer colorrectal hereditario no-polipoide

*Lic. Darwyn Toledo González y Lic. Diana Cruz-Bustillo Clarens*

### Resumen

Se hizo una revisión sobre el cáncer colorrectal hereditario no polipoide, el cual presenta la mayor incidencia dentro de los síndromes hereditarios que predisponen al cáncer colorrectal. Se caracteriza por manifestarse a edades tempranas, por la presencia de lesiones neoplásicas en el colon y otros órganos y por inestabilidad en microsatélites. Los microsatélites son repeticiones múltiples de 1 a 5 nucleótidos que están distribuidos por todo el genoma. Debido a su estructura repetitiva, los microsatélites son susceptibles a errores durante el proceso de replicación. La inestabilidad en microsatélites se origina como consecuencia de una deficiencia en el mecanismo posreplicativo de reparación de apareamientos erróneos. Se conocen varios genes cuyos productos están involucrados en este mecanismo y que están mutados en los tumores del cáncer colorrectal hereditario no polipoide. Para determinar inestabilidad en microsatélites en tumores de pacientes portadores se emplean diversas técnicas, entre las que se encuentran polimorfismo de conformación de cadena simple y técnicas inmunohistoquímicas.

*Palabras clave:* Inestabilidad en microsatélites, HNPCC, cáncer colorrectal, genes de reparación.

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las 3 primeras causas de mortalidad por cáncer en el mundo. Cada año se diagnostican cerca de un millón de nuevos casos y se reporta medio millón de fallecidos.<sup>1</sup>

Los principales factores causales son ambientales (dieta y estilo de vida), sin embargo, en la actualidad se conocen múltiples eventos genéticos que están involucrados en la carcinogénesis de esta enfermedad.<sup>2</sup> Se estima que alrededor de 5 % de los CRC presenta un componente hereditario asociado.<sup>3</sup>

Al nivel celular, el CCR es el resultado de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, que conducen a la transformación de las células normales de la mucosa del epitelio del colon en células neoplásicas.<sup>4</sup>

Existen 3 formas principales de cáncer colorrectal, de acuerdo con la forma de transmisión:<sup>5</sup>

1. Esporádico.
2. Familiar.
3. Hereditario.

La proporción de los casos hereditarios varía de 5 a 10 % según diferentes estudios.<sup>6-9</sup> Dentro de esta clasificación se distinguen 2 síndromes: poliposis múltiple o FAP (*familial adenomatous polyposis*) y el síndrome de Lynch o HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*).

## **Síndromes polipoideos: la poliposis múltiple**

Solo una pequeña proporción de las enfermedades malignas colorrectales son causadas por los síndromes polipoideos, de los cuales FAP es el más frecuente.

Este trastorno se hereda de forma autosómica dominante y se caracteriza por el desarrollo de un gran número de pólipos en el colon y el recto que de no ser tratados conducirían inevitablemente al cáncer.<sup>10</sup>

FAP es originada por mutaciones en el gen APC (*adenomatous polyposis coli*),<sup>11</sup> que está ubicado en la región 21 del brazo corto del cromosoma 5 (5q21).<sup>12</sup>

Aunque existen manifestaciones extracolónicas de la enfermedad, el colon-recto siempre está involucrado, lo que posibilita en la mayoría de los casos realizar el diagnóstico sin conocimiento de la historia familiar.

## **Síndrome de Lynch**

Por otra parte, el síndrome de Lynch o HNPCC es el responsable de una mayor proporción de los cánceres colorrectales hereditarios.<sup>13</sup> Este trastorno se caracteriza por un número menor de pólipos colorrectales y por la aparición de CCR a edades tempranas, predominante en el colon derecho. Además puede manifestarse cáncer en otros órganos, fundamentalmente endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, etc.<sup>14</sup> Estas manifestaciones extracolónicas pueden ser sincrónicas y metacrónicas.<sup>15</sup>

Existe una variante conocida como síndrome de Muir-Torre que presenta además quistes sebáceos, epiteliomas sebáceos y otras lesiones.<sup>16</sup>

## **Criterios para el diagnóstico de HNPCC**

La identificación de HNPCC puede resultar complicada debido a que las características clínicas o histológicas distintivas de la enfermedad no son obvias en todos los casos; además, la interpretación de las pruebas moleculares no es siempre evidente.<sup>17</sup> Por tanto, el diagnóstico de HNPCC se basa usualmente en la historia familiar.

En 1991 se establecieron los *criterios de Ámsterdam* (AC-I)<sup>18</sup> para confirmar el diagnóstico clínico de individuos que pudieran pertenecer a una familia HNPCC.

Según estos criterios para ser clasificada como HNPCC, una familia debe tener:

1. Al menos 3 miembros de la familia con CCR.
2. Al menos 1 de primer grado de consanguinidad con los otros 2.
3. Al menos 2 generaciones sucesivas afectadas.
4. Uno de los individuos debe haber desarrollado un CCR antes de los 50 años de edad.
5. Se descarta la FAP.

Estos criterios, aunque han sido modificados (AC-II)<sup>19</sup> para introducir otras características del síndrome como son los cánceres extracolónicos, resultan aún muy restrictivos e insuficientes para considerar algunas características patológicas de HNPCC, como la distribución proximal de algunos hallazgos histológicos, así como para el caso de familias pequeñas.

En consecuencia, se han propuesto otras variantes y hoy la más conocida es la de los *criterios de Bethesda* (BC)<sup>20</sup> que comprenden y amplían los AC, reduciendo los requerimientos para las familias de 2 generaciones.

Los criterios de *Bethesda*<sup>15</sup> dan más peso a los adenomas colorrectales (menos de 40 años) o cáncer (menos de 45 años) de inicio temprano, reconocen los tumores asociados a HNPCC fuera del colon-recto que puedan ser indicadores de HNPCC y resaltan las características histopatológicas de los tumores que tienen defectos en la reparación de apareamientos incorrectos de nucleótidos en el ADN.

Estas recomendaciones permiten que un individuo sea considerado para el diagnóstico molecular en presencia de 1 o más de las características clínicas o histopatológicas siguientes:

1. Individuos con cáncer en familias que cumplen los criterios de Ámsterdam.
2. Individuos con 2 cánceres asociados a HNPCC, incluidos CCR sincrónicos y metacrónicos o cánceres extracolónicos asociados.
3. Individuos con CCR y un familiar de primer grado con CCR y/o cáncer extracolónico asociado a HNPCC y/o un adenoma colorrectal, uno de los cánceres diagnosticado antes de los 45 años y el adenoma diagnosticado antes de los 40 años.
4. Individuos con CCR o cáncer de endometrio diagnosticado antes de los 45 años.
5. Individuos con CCR localizado en el lado derecho, con patrón no diferenciado, diagnosticado antes de los 45 años.
6. Individuos con CCR del tipo célula en estampilla de sello de anillo, diagnosticado antes de los 45 años.
7. Individuos con adenomas colorrectales diagnosticados antes de los 40 años.

## La longitud de los microsatélites puede cambiar. La inestabilidad en microsatélites (MSI)

Los microsatélites son segmentos de ADN en los cuales un pequeño motivo (usualmente de 1 a 5 nucleótidos de longitud) se repite varias veces a lo largo del genoma. El microsatélite más común en los humanos es una repetición del dinucleótido adenina-citosina, (CA)<sub>n</sub>, que está distribuido en varios miles de sitios en el genoma de la línea germinal.<sup>21</sup>

Cuando el número de repeticiones de un microsatélite determinado muestra diferencias estables y heredables dentro de la población, se dice que este microsatélite es polimórfico. Por ejemplo, un microsatélite CA puede tener 4 alelos: (CA)<sub>11</sub>, (CA)<sub>14</sub>, (CA)<sub>15</sub> o (CA)<sub>20</sub>, de acuerdo con el número de repeticiones del dinucleótido. Los microsatélites polimórficos de este tipo son excelentes marcadores genéticos y constituyen valiosas herramientas para los estudios de genes relacionados con diversas patologías mediante el análisis de ligamiento, en la medicina forense y en el estudio de deleciones genéticas (pérdida de heterocigosis) en tumores.

## La inestabilidad genómica y los microsatélites

La pérdida de la estabilidad genómica parece ser un paso clave que ocurre en las primeras etapas del proceso de tumorigénesis. Este fenómeno contribuye a crear un ambiente permisivo para la ocurrencia de alteraciones en genes claves en el control de la proliferación celular, como oncogenes y genes supresores de tumores.<sup>22</sup>

En el CCR se han identificado hasta el momento 3 tipos de inestabilidad genómica:<sup>4,23</sup>

1. Traslocaciones cromosómicas.
2. Inestabilidad cromosómica (CIN). Ejemplo: aneusomía, pérdida o ganancia de regiones del cromosoma.
3. Inestabilidad en microsatélites.

La inestabilidad en microsatélites (MSI) es una situación en la cual la longitud de un microsatélite ha aumentado o disminuido en la línea germinal. Esta variación implica un cambio somático en la talla del microsatélite. Los microsatélites son particularmente susceptibles a errores en la replicación, debido a que su estructura repetitiva propicia que la ADN polimerasa “se equivoque” al copiar la hebra molde del ADN.<sup>24</sup>

## La MSI se descubrió fortuitamente una década atrás

Después que se había asociado la susceptibilidad a HNPCC a un locus del cromosoma 2 mediante análisis de ligamiento, los investigadores esperaban encontrar un gen supresor de tumores y buscaron pérdida de heterocigosis entre las repeticiones de dinucleótidos en la región genética del locus. En su

lugar se encontró la existencia de alelos microsatélites cuya longitud había variado en todos los cánceres estudiados, como resultado de la inserción o pérdida de nucleótidos. Estas modificaciones se encontraron distribuidas prácticamente por todo el genoma del tumor.<sup>21</sup>

El hecho de detectar MSI en un tumor no puede considerarse un diagnóstico de mutación; sin embargo es de gran utilidad, porque la MSI constituye un reflejo de las deficiencias en los mecanismos de replicación o en la reparación del ADN.<sup>25</sup> Pronto se evidenció que la MSI en el HNPCC estaba asociada a un funcionamiento deficiente de la maquinaria enzimática de reparación de apareamientos incorrectos de nucleótidos (MMR). Estos apareamientos incorrectos ocurren normalmente durante la replicación del ADN, pero la mayoría son rectificadas rápido por el mecanismo de corrección de prueba de la ADN polimerasa o por la maquinaria de reparación de la célula.<sup>26</sup>

La reparación de los apareamientos incorrectos es una función celular altamente conservada, llevada a cabo por productos génicos que reconocen el par de bases erróneamente apareado, lo separan y lo reemplazan por el par correcto; garantizando de este modo la fidelidad del proceso de transmisión de la información genética durante la replicación. Se conocen al menos 6 genes involucrados en este mecanismo en los humanos: hMLH1, hMSH2, hMSH6, hMLH3, PMS1 y PMS2.<sup>27</sup> En estos genes se han encontrado numerosas mutaciones en pacientes con historia familiar de cáncer colorrectal cuyos tumores presentan inestabilidad en microsatélites, sobre todo en pacientes HNPCC.

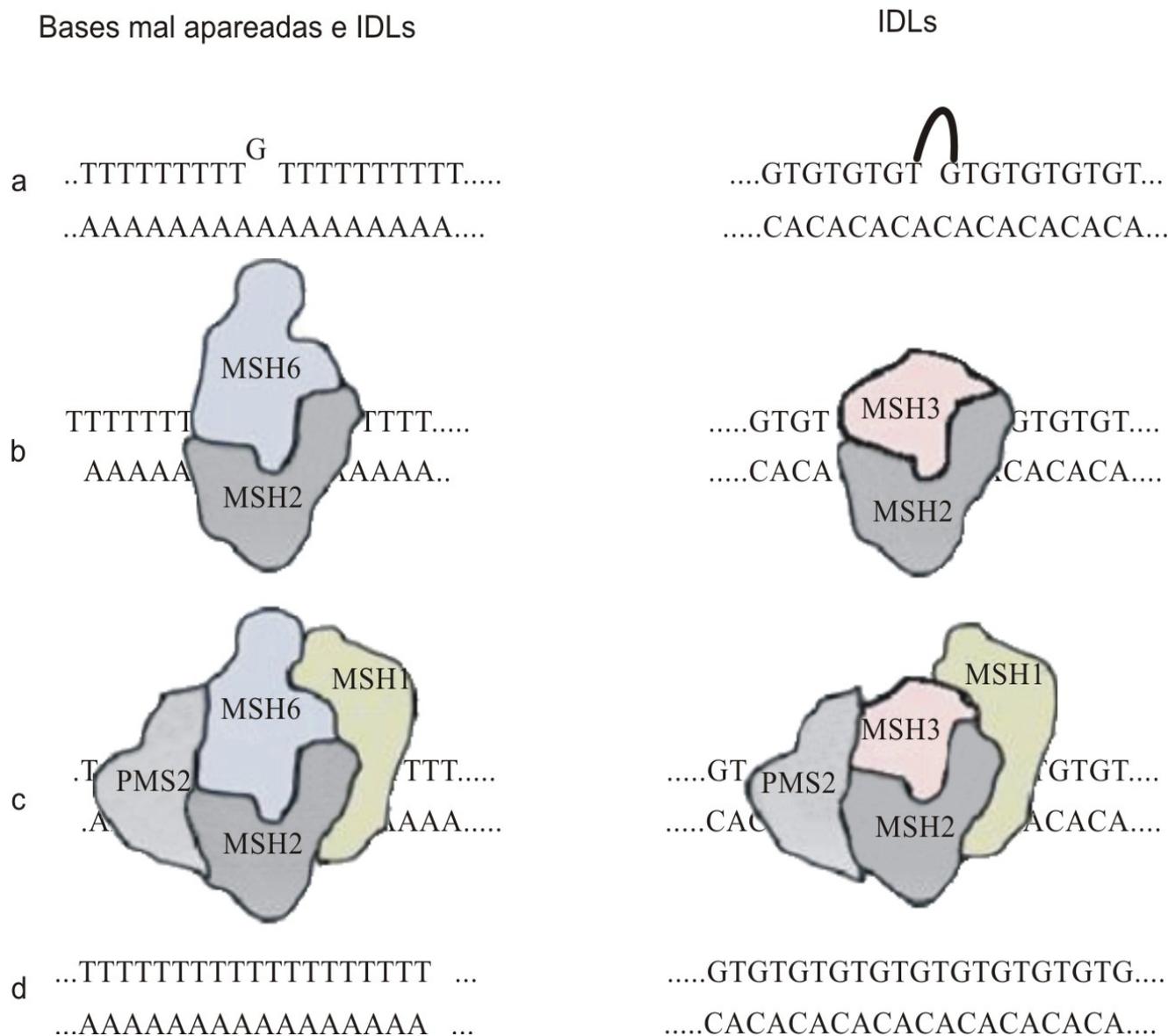
La mayoría de las mutaciones en los genes MMR reportadas actualmente son corrimientos del marco de lectura (*frameshift mutations*), mutaciones sin sentido (*nonsense*), mutaciones que introducen cambio del sentido (*missense*)<sup>28</sup> o defectos en los sitios de *splicing*, y son causadas por sustituciones de una base o pequeñas deleciones e inserciones, o ambas, generalmente de 1-5 pares de bases.<sup>29</sup> Adicionalmente se ha reportado la detección menos frecuente de grandes deleciones, inserciones e inversiones en los genes de reparación de algunas familias HNPCC.<sup>30</sup>

La mayor parte de estas mutaciones ocurren en los genes hMLH1 (50 %) y hMSH2 (40 %),<sup>31</sup> cuyos productos proteicos son centrales en la función reparadora. Existe alguna evidencia de que las mutaciones en hMLH1 y hMSH2 no son todas equivalentes fenotípicamente. *Jager* y otros en *Watson y Lynch* (2001) encontraron que una mutación común (en el intrón 4 de MLH1) estaba asociada con un fenotipo menos agresivo y con un menor número de manifestaciones extracolónicas.<sup>32</sup> Los tumores de los individuos que presentan mutaciones en hMLH1 y hMSH2 tienen un grado elevado de MSI (MSI-H) y a menudo dan lugar a familias HNPCC clásicas que cumplen con los AC.<sup>33</sup> En los cánceres esporádicos es frecuente la inactivación de hMLH1 como parte de una hipermetilación de la región promotora del gen.<sup>34</sup>

El número de mutaciones reportadas en el gen hMSH6 se ha venido incrementando en los últimos años. Las mutaciones en MSH6 generalmente ocurren en familias HNPCC atípicas, es decir con inicio tardío, alta frecuencia de cáncer de endometrio y bajo nivel de MSI.<sup>35</sup>

## La reparación de apareamientos erróneos es una función celular coordinada y específica

Varios estudios realizados han revelado que los componentes de la maquinaria de reparación actúan de forma concertada, formando complejos heteroméricos que actúan específicamente según el tipo de lesión que necesite ser reparada (fig. 1).



*Fig. 1.* Los componentes del MMR. Los componentes del sistema de reparación actúan de forma concertada y específica en dependencia de la lesión que deba ser reparada. hMSH2 se asocia con hMSH6 o hMSH3 para el reconocimiento de bases mal apareadas “*mismatches*” (izquierda) o de lazos por inserción/delección “*IDL*” (derecha), respectivamente. Un heterodímero de hMLH1 y PMS2 coordina la interacción entre el complejo de reconocimiento y otras proteínas accesorias (C). (Modificada de Loukola, 2002 (Loukola AM. Molecular diagnosis of hereditary non polyposis colorectal cancer [HNPCC]. PhD Thesis; Dep. of Medical Genetics, Haartman Institute, University of Helsinki, Finland, 2002).

Por ejemplo, MSH2 forma el complejo hMutS $\alpha$  con MSH6 para el reconocimiento de los apareamientos

erróneos en pares de bases.<sup>32</sup> Si la lesión es un lazo por inserción/delección de nucleótidos (*IDL*), MSH2 se asocia con MSH3 y forman el complejo hMutS $\beta$  para reconocer el daño.<sup>36</sup> Consecuentemente, los cánceres que surgen producto de una pérdida en la función de MSH6 muestran MSI solo en repeticiones de nucleótidos.<sup>37</sup>

En el caso de hMLH1 se asocia con PMS2 y forma el complejo hMutL $\alpha$  que coordina la interacción entre el complejo de reconocimiento de la lesión y otras proteínas que participan en el proceso de reparación como PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), ADN polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$ , las proteínas SSB (proteínas de estabilización de simple cadena en la replicación) algunas exonucleasas y helicasas.<sup>38</sup>

De acuerdo con hallazgos recientes, hMLH1 también puede formar heterodímeros con hMLH3 y PMS1.<sup>39</sup> El complejo hMLH1-hMLH3 tiene una función similar a hMutL $\alpha$  en la reparación de los lazos formados por inserción/delección, mientras que la función de hMLH1-PMS1 (complejo hMutL $\beta$ ) no está claramente determinada hasta el momento.<sup>40</sup>

Recién se demostró que la incorporación de purinas oxidadas, provenientes de la reserva celular de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato), puede contribuir significativamente al incremento de la inestabilidad genética en los tumores. La oxidación es una lesión que sufre por lo general el ADN y las purinas son en particular susceptibles a esta. Los desoxinucleótidos oxidados son una fuente importante de apareamientos erróneos, que deben ser detectados y corregidos por las proteínas de la maquinaria de reparación. En los tumores HNPCC estas proteínas, al estar dañadas, no pueden efectuar correctamente esa función, contribuyendo al incremento de la inestabilidad genética en el genoma del tumor.<sup>41</sup>

En estudios realizados *in vitro* se ha demostrado que basta con la presencia de un solo alelo salvaje para que el mecanismo reparador actúe correctamente. Por tanto, parece ser que el estado heterocigótico no provoca una pérdida total de la función reparadora.<sup>42</sup>

En la mayoría de los casos, la tumorigénesis asociada a defectos en los genes de reparación conduce a la inactivación de ambos alelos del gen en cuestión. En el caso de HNPCC, la presencia de mutaciones en la línea germinal acelera este proceso.<sup>43</sup>

En general, la actividad defectuosa de los genes de reparación de apareamientos incorrectos de nucleótidos facilita presumiblemente una transformación maligna del tumor, porque permite la rápida acumulación de mutaciones que inactivan genes claves para la célula.

Parece ser que estos genes de reparación defectuosos, al no poder producir proteínas que corrijan los errores de apareamiento de nucleótidos durante la replicación del ADN, promueven mutaciones en otros genes y, a su vez un aumento en la velocidad mutacional en el genoma del tumor. Se ha encontrado que, en líneas celulares de CCR, la velocidad de mutación está incrementada hasta  $10^3$  veces en la secuencia de los genes expresados.<sup>44</sup>

Los genes que contienen microsatélites dentro de su propia secuencia son especialmente susceptibles a este fenómeno.<sup>45</sup> Por ejemplo, el gen TGF- $\beta$ RII, que codifica para el receptor II del TGF (siglas en inglés de factor de crecimiento transformante), contiene una repetición de 10 adeninas (A)<sub>10</sub> que sufre un cambio en el marco de lectura en alrededor de 90 % de todos los tumores HNPCC. Esta mutación conlleva a la pérdida de la función del TGF, un supresor de tumores de gran importancia en el CCR.<sup>46</sup>

## Marcadores de MSI en tumores

El grupo de marcadores y alelos de microsatélites que se ha utilizado para identificar la MSI en tumores es muy variado.

La MSI en un tumor generalmente se determina comparando la talla de las secuencias de los marcadores microsatélites en diferentes loci y en general se requiere un control de tejido normal además del tumor.

En ocasiones resulta impreciso establecer la condición MSI empleando este sistema, sobre todo porque no existe un criterio único en cuanto al número de loci que debe ser analizado para diagnosticar la MSI y la proporción de marcadores inestables que debe considerarse para clasificar la MSI.

En 1997 se sugirió el empleo de un panel de referencia de 5 marcadores de MSI para dicho propósito: BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346, y D17S250.<sup>47</sup>

De acuerdo con los criterios internacionales se considera alta frecuencia de MSI (MSI-H) si 40 % de marcadores de los recomendados o más, presentan alteraciones en su secuencia. Además se pueden considerar MSS (MSI estables) cuando ningún marcador presenta variaciones en la longitud de su secuencia y MSI-L (baja frecuencia de MSI) cuando un solo marcador se muestra inestable. Según algunos autores<sup>47</sup> desde el punto de vista cualitativo, no parecen haber diferencias ni patológicas ni clínicas en los tumores colorrectales con MSI-L y MSS. Solo se puede establecer esta diferencia cuantitativamente, para lo cual hay que utilizar una gran cantidad de marcadores.<sup>47</sup> Los tumores MSI-H constituyen 15 % de los CCR y se localizan predominantemente en el colon proximal, presentan características histopatológicas únicas y están asociados con un desarrollo clínico menos agresivo.<sup>48</sup> En HNPCC 95 % de los tumores presentan MSI y su distribución es contraria a la de los casos esporádicos.<sup>23</sup>

Los marcadores BAT-25 y BAT-26, que están ambos contenidos en el panel recomendado, presentan un solo alelo en la línea germinal y en las células somáticas normales de la mayoría de los individuos.<sup>49</sup> El BAT-26 consiste en una secuencia de 26 adenosinas (A)<sub>26</sub>, localizada en el intrón 5 del gen hMSH2. Algunos individuos pueden presentar 24, 25 o 27 adenosinas en lugar de 26, aunque estos individuos representan menos de 5 % de la población, por lo que se considera como un marcador monomórfico<sup>50</sup> con un PIC de 1,00.<sup>51</sup> La secuencia polimórfica de nucleótidos del marcador BAT-25 consiste principalmente de (T)<sub>7</sub>A(T)<sub>25</sub> localizada en el oncogén c-kit. Este alelo es el más común, aunque se han

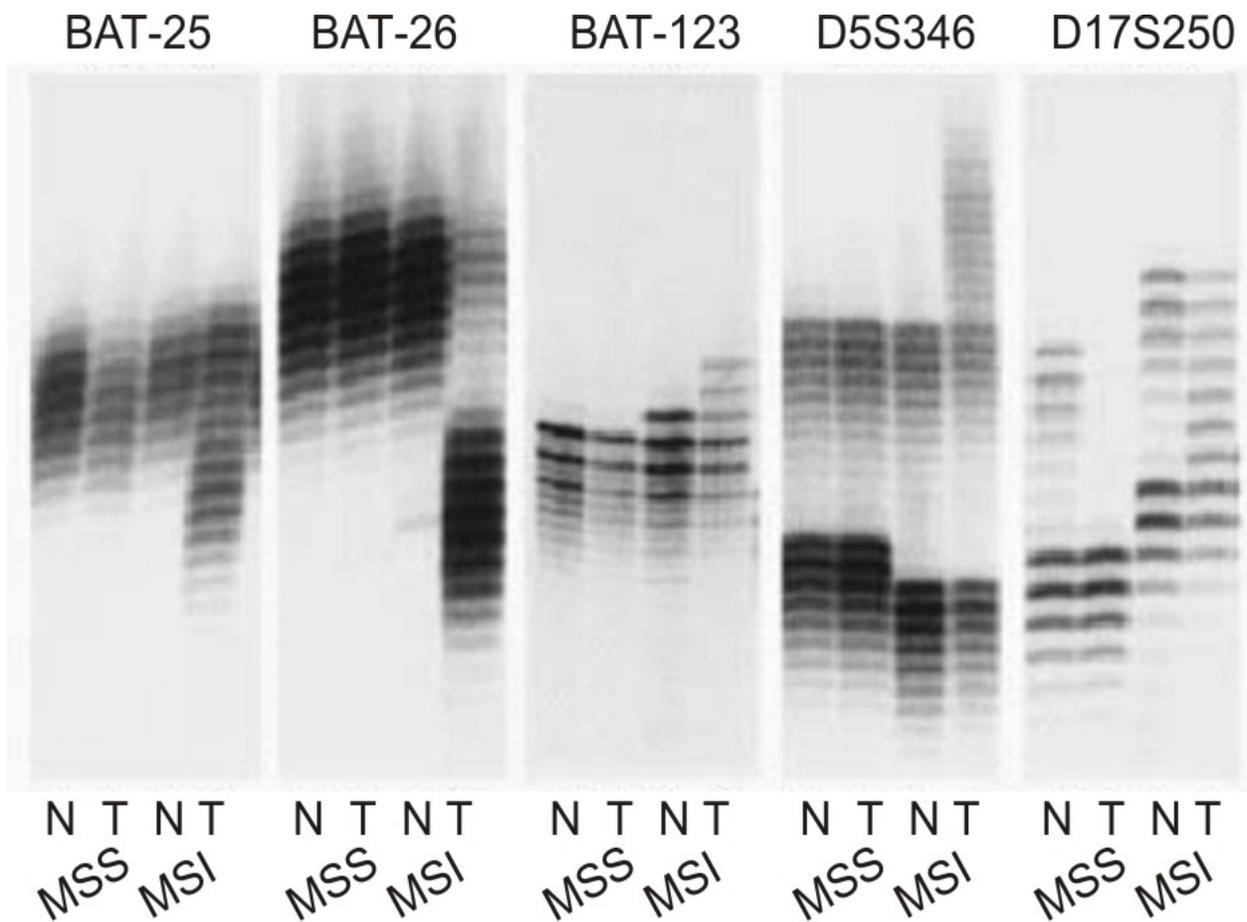
reportado otros cuyas variaciones consisten en la pérdida o adición de 1 o 2 nucleótidos.<sup>52</sup>

Tanto BAT-25 como BAT-26 han demostrado ser altamente sensibles a la MSI. Debido a la condición casi monomórfica de ambos loci es posible diferenciar los alelos inestables de los alelos de talla normal sin necesidad de trabajar con mucosa normal. En diversos estudios realizados con tumores colorrectales y líneas celulares,<sup>49,53-55</sup> se ha podido comprobar la MSI en casi la totalidad de las muestras estudiadas empleando solamente BAT-26.

Es importante tener en cuenta que el panel de 5 marcadores recomendado (BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346, y D17S250) para la evaluación de la MSI, puede subestimar el número de tumores MSI-H, debido al empleo de 3 marcadores dinucleótidos. Además el número de tumores MSI-L puede sobrestimarse, debido al empleo de 2 marcadores mononucleótidos. La adición de otros marcadores mononucleótidos al análisis mejora la sensibilidad del panel.<sup>56</sup>

## **Técnicas de detección de MSI**

Existe una gran variedad de metodologías para la determinación de la MSI. La SSCP (polimorfismo de conformación de cadena simple) es una de las más empleadas debido a que es sencilla y versátil. La SSCP se basa en la relación entre la movilidad electroforética de un segmento de ADN monocatenario y su conformación plegada, la cual a su vez depende estrechamente de la secuencia de nucleótidos o de la talla del segmento.<sup>57,58</sup> De esta forma la MSI es detectable fácil en un gel, pues aparecen diferentes bandas de acuerdo con las diferentes conformaciones del marcador inestable (fig. 2).



*Fig. 2.* Cánceres colorrectales con alta frecuencia de inestabilidad (MSI) y estabilidad en microsatélites (MSS). El CCR con MSI muestra bandas desplazadas en el ADN de tumor (T) en comparación con el ADN normal (N) en los loci microsatélites BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346 y D17S250. El MSS tiene bandas idénticas en el ADN normal y de tumor en los loci BAT-25, BAT-26, D2S123 y D5S346. Además, el MSS muestra pérdida de heterocigosis en el locus D17S250 \_es decir, una pérdida del alelo superior (mayor) en el ADN de tumor en comparación con el ADN normal. (Tomado de *Gryfe* y otros, 2000).<sup>64</sup>

Es usual el empleo del marcaje con fluorescencia de los productos amplificados por RCP para el análisis mediante SSCP.<sup>51,53,59-60</sup>

La inmunohistoquímica (IHC) es otra de las técnicas empleadas en el diagnóstico de HNPCC.<sup>61-63</sup> Esta técnica se basa en el empleo de anticuerpos específicos para las proteínas de los genes de reparación, mayormente anti-hMLH1 y anti-hMSH2, en tejido tumoral.

La IHC es especialmente útil para clasificar los pacientes con MSI-H en sus respectivos niveles de riesgo, así como para determinar aquellos casos en los cuales se deben analizar los genes de reparación.<sup>56</sup> La IHC también permite detectar casos en los cuales los genes de reparación no se expresan, como sucede por ejemplo con hMLH1 debido a la hipermetilación de su región promotora. Sin embargo, la asociación de la IHC con la MSI no es exclusiva; por ejemplo, es posible encontrar un fenotipo MSI en un tumor aun cuando el resultado de la IHC es positivo para una de las proteínas de la vía de reparación.

## Conclusiones

Como se ha visto la MSI es un fenómeno complejo, que surge en el genoma como consecuencia de una función celular deficiente: la reparación posreplicativa del ADN, producto de mutaciones en varios genes que participan en este proceso. Debido a la MSI se crea en la célula un estado favorable para la acumulación de mutaciones en genes vulnerables que controlan actividades biológicas críticas. Por lo general, estas alteraciones conllevan en última instancia a una desregulación genética que conduce inevitablemente al cáncer.

El análisis de la MSI puede ser una herramienta adicional para hacer más preciso el diagnóstico clínico de HNPCC, pues posibilita la identificación de aquellas familias potencialmente portadoras de defectos genéticos entre las familias que no poseen mutaciones conocidas en los genes de reparación. En general, la detección de MSI es un paso previo al genotipaje de los genes de MMR. Estas pruebas permiten al médico evaluar el pronóstico del paciente y quizás establecer una terapia; además, es una herramienta de diagnóstico efectiva en los casos de HNPCC.

Los criterios clínicos-histopatológicos establecidos para definir familias HNPCC constituyen una base importante para el diagnóstico, pues sería poco eficiente analizar todos los tumores para detectar MSI, teniendo en cuenta que solo 15 % de los CCR esporádicos presenta MSI, mientras que los tumores de pacientes HNPCC presentan MSI en más de 90 % de los casos.

Una estrategia eficaz para la evaluación molecular de los casos de riesgo, identificados por los criterios clínicos (AC o BC), sería el análisis de MSI o IHC de los tumores, seguido de la detección de mutaciones en los genes de reparación, con preferencia hMLH1 y hMSH2. Después de identificada la mutación es importante el asesoramiento genético de los familiares de riesgo, que pueden ser sometidos al diagnóstico, si están de acuerdo.

## Microsatellite instability: some aspects of their relation to hereditary nonpoliposis colorectal cancer

### Summary

A review on nonpolypoid hereditary colorectal cancer was made. It presents the highest incidence among the hereditary syndromes predisposing to colorectal cancer. It is characterized by its appearance at early ages, the presence of neoplastic lesions in the colon and other organs, and by microsatellite instability. The microsatellites are multiple repetitions from 1 to 5 nucleotides that are distributed all around the genoma. Due to their repetitive structure, the microsatellites are susceptible to errors during the replication process. The microsatellite instability results from a deficiency in the postreplicative repair mechanism of erroneous matchings. Various genes whose products are involved in this mechanism and that are mutated in the tumors of the hereditary nonpoliposis colorectal cancer are known. Some of the different techniques used to determine microsatellite instability in tumors of carrier patients are the

single chain conformation polymorphism and immunohistochemical techniques.

*Key words:* Microsatellite instability, HNPCC, colorectal cancer, repair genes.

## Referencias bibliográficas

1. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
3. Boardman LA. Heritable colorectal cancer syndromes: recognition and preventive management. *Gastroenterol Clin N Am* 2002;31:1107-31.
4. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:11-27.
5. Cruz-Bustillo Clarens D. Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2004;96:48-59.
6. Mecklin JP. Frequency of hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 1987;93:1021-5.
7. Ponz de Leon M, Sarreteli R, Sacchetti C, Zanghieri G, Scalmati A, Roncucci R. Familial aggregation of tumors in the three year experience of a population-based colorectal cancer registry. *Cancer Res* 1989;49:4344-8.
8. Lynch HT, Lanspa S, Smyrk T, Boman B, Watson P, Lynch J. Hereditary non polyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I y II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;53:43-60.
9. Aaltonen LA, Sankila R, Mecklin JP, Jarvinen H, Pukkala E, Peltomaki P, et al. A novel approach to estimate the proportion of hereditary non polyposis colorectal cancer of total colorectal cancer burden. *Cancer Detec Prev* 1994;18:57-63.
10. van der Luijt RB. Moleculaire basis van fenotypische variabiliteit bij familiale adenomateuze polyposis. Ter verkrijging van de graad van Doctor. Rijksuniversiteit te Leide, 1996.
11. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589-600.
12. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan MM, Levy DB, Smith KJ, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991;251:1366-70.
13. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, et al. Incidence of hereditary non-polyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-7.
14. Lynch HT, de la Chapelle A. A genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999;36:801-18.
15. Rodríguez-Bigas M, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758-62.
16. Hall NR, Williams MA, Murday VA, Newton JA, Bishop DT. Muir-Torre syndrome: a variant of the cancer family syndrome. *J Med Genet* 1994;31:627-31.
17. Syngal S, Fox EA, Li C, Dovidio M, Eng C, Kolodner RD, et al. Interpretation of genetic tests results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing. *JAMA* 1999;282:247-53.

18. Vasen HF, Mecklin JP, Meera Khan P, Lynch HT. The International Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG HNPCC). *Dis Col Rectum* 1991;34:424-5.
19. 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.
20. Robbins DH, Itzkowitz SH. The molecular and genetic basis of colon cancer. *Med Clin North Am* 2002;86:1467-95.
21. de la Chapelle A. Microsatellite Instability. *N Engl J Med* 2003;349:209-10.
22. Ponder BAJ. Cancer genetics. *Nature* 2001;411:336-41.
23. Lindblom A. Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Curr Opin Oncol* 2001;13:63-9.
24. Ionov Y, Peinado MA, Malkoshyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequence reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
25. Maehara Y, Oda S, Sugimachi K. The instability within: problems with current analyses of microsatellite instability. *Mut Res* 2001;461:249-63.
26. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:89-96.
27. Jiricny J, Nyström-Lathi M. Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:157-61.
28. Samowitz WS, Slattery ML, Porfiri E, Scartozzi M, Piga A, Cellerino R. Missense mismatch repair gene alterations, microsatellite instability, and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:3178-9.
29. ICGH Database: Disponible en: <http://www.nfdht.nl>
30. Viel A, Petronzelli F, Puppa LD, Lucci-Cordisco E, Fornasarig M, Pucciarelli S, et al. Different molecular mechanisms underlie genomic deletions in the MLH1 gene. *Hum Mut* 2002;20:368-74.
31. Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:735-40.
32. Watson P, Lynch HT. Cancer risk in mismatch repair gene mutation carriers. *Familial Cancer* 2001;1:57-60.
33. Park JG, Vasen HF, Park YJ, Park KJ, Peltomaki P, Ponz de Leon M, et al. Suspected HNPCC and Amsterdam criteria II: evaluation of mutation detection rate, an international collaborative study. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:109-14.
34. Kondo Y, Issa JPJ. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:29-39.
35. Lucci-Cordisco E, Rovella V, Carrara S, Percesepe A, Pedroni M, Bellacosa A, et al. Mutations of the 'minor' mismatch repair gene MSH6 in typical and atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Familial Cancer* 2001;1:93-9.
36. Gradia S, Subramanian D, Wilson T, Acharya S, Makhov A, Griffith J, et al. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol Cell* 1999;3:255-61.
37. Bower J, Sokolsky T, Quach T, Alani E. A mutation in the MSH6 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 complex disrupts mismatch recognition. *J Biol Chem* 1999;274:16115-25.
38. Schofield MJ, Hsieh P. DNA Mismatch repair mechanisms and biological function. *Annu Rev*

- Microbiol 2003;57:579-608.
39. Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, et al. MLH3: A DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nature Genet* 2000;36:801-18.
  40. Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1999;33:533-64.
  41. Russo MT, Blasi MF, Chiera F, Fortini P, Degan P, Macpherson P, et al. The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:465-74.
  42. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang W, Papadopoulos N, et al. Hypermutable and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993;75:1227-36.
  43. Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000;119:854-65.
  44. Komarova NL, Lengauer C, Vogelstein B, Nowak MA. Dynamics of genetic instability in sporadic and familial colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2002;1:685-92.
  45. Eshleman J, Lang E, Bowerfind G, Parsons R, Vogelstein B, Wilson J, et al. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene* 1995;10:33-7.
  46. Planck M, Wenngren E, Borg A, Olsson H, Nilbert M. Somatic frameshift alterations in mononucleotide repeat-containing genes in different tumor types from an HNPCC family with germline hMSH2 mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:33-9.
  47. 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.
  48. Rudzki Z, Zazula M, Okon K, Stachura J. Low-level microsatellite instability colorectal carcinomas: do they really belong to a "gray zone" between high-level microsatellite instability and microsatellite-stable cancers? *Int J Colorectal Dis* 2003;18:216-21.
  49. Hoang JM, Cottu PH, Benedicte T, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26 an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and in cell lines. *Cancer Res* 1997;57:300-3.
  50. Pyatt R, Chadwick BR, Johnson CK, Adebamowo C, de la Chapelle A, Prior TW. Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing. *Am J Pathol* 1999;155:349-53.
  51. Berg KD, Glaser CL, Thompson RE, Hamilton SR, Griffin AC, Eshleman JR. Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. *J Mol Diag* 2000;2:20-8.
  52. Zhou X-P, Hoang J-M, Cottu P, Thomas G, Hamelin R. Allelic profiles of mononucleotide repeat microsatellites in control individuals and in colorectal tumors with and without replication errors. *Oncogene* 1997;15:1713-8.
  53. Morifuji M, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Sueda T, Yokoyama T. Fluorescent-based BAT-26 analysis for distinct screening of microsatellite instability in colorectal cancers. *Int J Oncol* 2003;4:807-13.
  54. Samowitz WS, Slattery ML, Leppert MF. A proposed BAT-26 germline polymorphism. *Am J*

- Pathol 2000;156:733-4.
55. Mukherjee M, Vaish M, Mittal RD, Mittal B. Allelic variation of BAT-26 and BAT-40 poly-adenine repeat loci in North Indians. *Int J Mol Med* 2002;9:91-4.
  56. Umar A, Boland R, 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.
  57. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-9.
  58. Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T, Frayling I, Hodgson SV, Harocopus C, et al. Use of SSCP analysis to identify germline mutations in HNPCC families fulfilling the Amsterdam criteria. *Hum Genet* 1997;2:219-24.
  59. Iacopetta B, Grieu F. Routine detection of the replication error phenotype in clinical tumor specimens using fluorescence-SSCP. *BioTechnique* 2000;28:566-70.
  60. Dietmaier W, Riedlinger W, Köhler A, Wegele P, Beyser K, Sagner G, et al. Detection of microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) in colorectal tumors by fluorescence-based multiplex microsatellite PCR. *Biochemica* 1999;2:42-5.
  61. Parc Y, Gueroult S, Mourra N, Serfaty L, Fléjou J-F, Tiret E, et al. Prognostic significance of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of MSH2 and MLH1 in sporadic T3N0M0 colon cancer. *Gut* 2004;53:371-5.
  62. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ et al. Immunohistochemistry versus MSI testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:1043-8.
  63. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Miller A, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1248-55.
  64. Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69-77.

Recibido: 16 de octubre de 2004. Aprobado: 4 de marzo de 2005.

Lic. *Darwyn Toledo González*. Instituto Nacional de Gastroenterología. Calle 25, No 503, Vedado, La Habana. Teléf: 832-5594-97