

Asociación entre la inestabilidad de microsatélites y las características clínicas y anatomopatológicas en pacientes con cáncer de colon esporádico



David Guerrero^a, Enrique Balen^b, José María Martínez-Peñuela^c, Jesús García-Foncillas^d, Begoña Larrinaga^c, María Cristina Caballero^c, Javier Herrera^b y José Miguel Lera^b

^aCentro de Investigación Biomédica. Servicio Navarro de Salud. Pamplona. Navarra.

^bServicio de Cirugía General y Digestiva. Hospital de Navarra. Servicio Navarro de Salud. Pamplona. Navarra.

^cServicio de Anatomía Patológica. Hospital de Navarra. Servicio Navarro de Salud. Pamplona. Navarra.

^dLaboratorio de Biotecnología y Farmacogenómica. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona. Navarra. España.

FUNDAMENTO Y OBJETIVO: La inestabilidad de microsatélites derivada del fallo en la reparación de los falsos emparejamientos del ADN es la alteración característica de los tumores de la vía mutadora o inestables (MSI). Tales casos parecen presentar diferencias desde el punto de vista clinicopatológico con los tumores de la vía supresora o estables (MSS). Los tumores con alto grado de inestabilidad (MSI-H) parecen constituir una nueva entidad de tumores con diferencias en determinadas características anatomopatológicas y clínicas con respecto a los tumores estables (MSS) e inestables de bajo grado (MSI-L). En el presente estudio se valora la posible asociación entre el alto grado de inestabilidad de microsatélites con la localización, contenido mucinoso, grado de diferenciación, estadio, así como el intervalo libre de enfermedad y supervivencia.

PACIENTES Y MÉTODO: Se clasificó a 117 pacientes con cáncer de colon esporádico en las poblaciones MSS/MSI-L y MSI-H (siguiendo las recomendaciones del National Cancer Institute) mediante reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis de 7 microsatélites.

RESULTADOS: Los tumores MSI-H tendieron a localizarse en el colon derecho ($p = 0,022$) y a presentar contenido mucinoso ($p = 0,04$). El conjunto de pacientes MSI-H de estadios II y III no presentó intervalos libres de enfermedad ni períodos de supervivencia más prolongados ($p = 0,54$, $p = 0,37$, respectivamente). Los tumores MSI-H de estadio II presentaron períodos de supervivencia más prolongados que los tumores MSS/MSI-L ($p = 0,027$). No observamos diferencias en la respuesta a quimioterapia con 5-fluorouracilo y leucovorin entre los grupos MSS/MSI-L y MSI-H ($p = 0,38$).

CONCLUSIONES: El alto grado de inestabilidad de microsatélites se asocia con determinadas características patológicas, así como con períodos de supervivencia más prolongados para los tumores de estadios II.

Palabras clave: Cáncer de colon. Repeticiones de microsatélites. Alto grado de inestabilidad. Genes. Pronóstico. Intervalo libre de enfermedad.

Association between microsatellite instability and clinico-pathological characteristics in sporadic colon cancer

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Currently, colon cancer is a leading cause of cancer death worldwide. It progresses according to three molecular pathways, named suppressor, mutator and methylator. Microsatellite instability is a hallmark of the lack of reparation, of DNA mismatches and it characterizes a subset of colon tumors (unstable tumors, MSI). MSI-H patients (high degree of microsatellite instability) seem to share clinico-pathological differences with MSS (microsatellite stable) and MSI-L (low degree of microsatellite instability) patients. In this study, associations between high degree of microsatellite instability and pathological (location, mucinous content, differentiation grade, stages T3N0, stages II and III) and clinical features (response to chemotherapy, disease-free survival and overall survival) were evaluated.

PATIENTS AND METHOD: 117 patients with sporadic colon cancer were classified into two populations (MSS/MSI-L and MSI-H) by using PCR and electrophoresis of seven microsatellites, according to the National Cancer Institute recommendations.

RESULTS: MSI-H tumors tended to be located in the right colon ($p = 0.022$) and were of mucinous histologic type ($p = 0.04$). No differences in disease-free survival and overall survival between group of stage II and III patients with MSS/ MSI-L and corresponding ones with MSI-H colon cancer were found ($p = 0.54$, $p = 0.37$, respectively). Conversely, MSI-H patients with stage II colon cancer had a favourable prognosis ($p = 0.027$). Nevertheless, response to 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin was similar in MSS/ MSI-L and MSI-H groups ($p = 0.38$).

CONCLUSIONS: MSI-H patients are characterized by certain pathological features; those MSI-H patients with a stage II seem to have a better prognosis than MSS/ MSI-L patients.

Key words: Colonic neoplasms. Microsatellite repeats. High degree of genomic instability. Genes. Prognosis. Disease-free survival.

Trabajo subvencionado por el Departamento de Salud del Gobierno de Navarra.

Correspondencia: Dr. D. Guerrero.
Centro de Investigación Biomédica (recinto del Hospital de Navarra).
Irunlarrea, 3. 31008. Pamplona. Navarra. España.
Correo electrónico: dguerres@cfnavarra.es

Recibido el 29-3-2004; aceptado para su publicación el 2-9-2004.

Las tasas de incidencia y de mortalidad, ajustadas a la población mundial, del cáncer de colon y recto obtenidas en España en el año 2000 son, respectivamente, superiores e inferiores a las obtenidas en los países de mayor y menor desarrollo¹. En Navarra esta neoplasia constituye el tercer tipo de tumor más frecuente en la población masculina, tras los cánceres de pulmón y próstata, y el segundo tipo en la población femenina, precedido por el cáncer de mama².

Los tumores malignos de colon evolucionan, desde el punto de vista molecular, conforme a 3 modelos de progresión, denominados supresor, mutador y metilador. El modelo supresor, descrito por Fearon y Vogelstein³, está caracterizado por etapas de progresión debidas a la inactivación de genes supresores de tumores, como el gen *p53*, y a la activación de oncogenes, como *k-ras*, que favorecen la progresión tumoral. Por otro lado, el fallo del sistema de reparación de falsos emparejamientos introducidos en el ADN por agentes de origen endógeno (proceso de replicación del ADN, etc.) o exógeno (radicales libres de oxígeno, entre otros) constituye la causa de progresión en los casos de cáncer de colon del modelo mutador, descrito por Yamamoto et al⁴. Esta alteración se debe a las mutaciones e hipermetilaciones de promotores de los genes que codifican para las proteínas de reparación, fundamentalmente *hMLH1* y *hMSH2*, y en menor medida las proteínas *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* y *hPMS2*⁵. Una de las consecuencias del fallo en la reparación es la inestabilidad de secuencias nucleotídicas repetitivas distribuidas en regiones codificantes (exones) y no codificantes (intrones) del genoma. Los microsatélites son marcadores de secuencias muy conservadas de alto valor informativo en diversos estudios moleculares⁶.

La inestabilidad de microsatélites está presente en un porcentaje que varía del 55 al 86% de los casos de cáncer colorrectal hereditario no polipósico y en una proporción del 15 al 20% de los casos de cáncer de colon esporádico⁷. Esta altera-

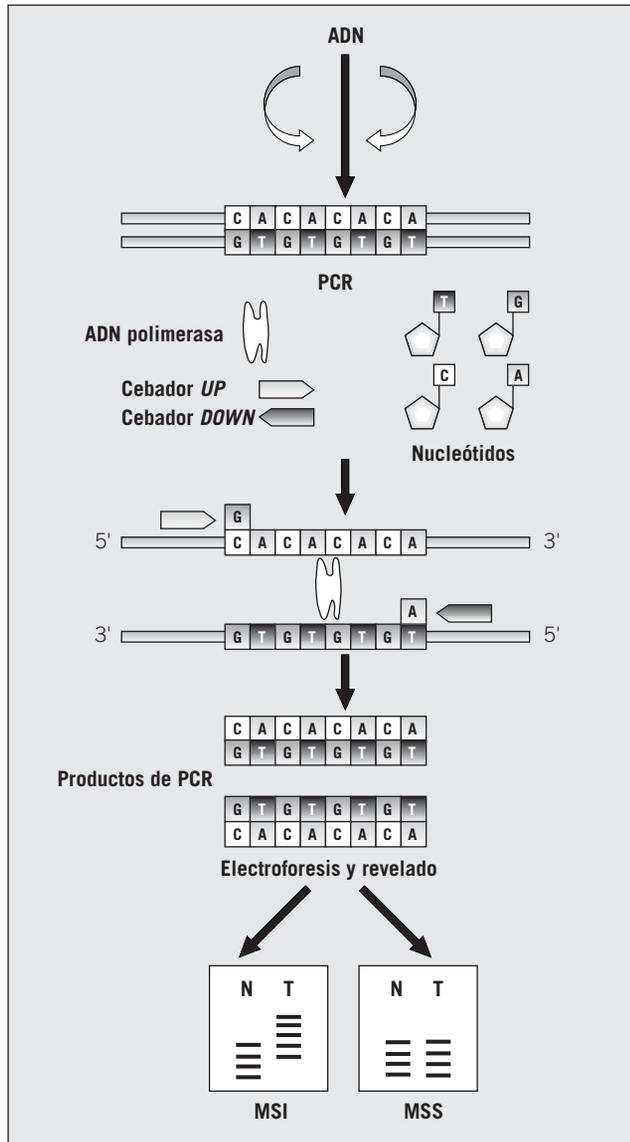


Fig. 1. Esquema del método utilizado en el análisis de los microsatélites. Consiste en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de la electroforesis en gel desnaturante y la detección de bandas mediante tinción de plata. Al comparar en la parte inferior de la figura los patrones de los productos obtenidos desde el ADN de mucosa normal (N) y de tumor (T), se observa a la izquierda un caso inestable (MSI) con bandas adicionales en el patrón T y un caso estable (MSS) en el que los patrones N y T son idénticos (derecha).

ción parece relacionarse con determinadas características anatomopatológicas de los tumores (localización, contenido mucinoso, entre otros), así como con las características clínicas de los pacientes (intervalo libre de enfermedad, supervivencia, etc.)⁸.

Los tumores de colon pueden clasificarse, en función del porcentaje de marcadores con inestabilidad, en 2 poblaciones, estable e inestable, según el modelo de González et al⁹, o en 3 poblaciones con distintos grados de inestabilidad (estable, inestable de bajo grado, inestable de alto grado), según el modelo de Boland et al¹⁰. En el presente trabajo se clasificó de un modo exhaustivo a 117 pacientes en función del grado de inestabilidad, mediante técnicas de biología molecular. Para ello utilizamos 7 marcadores microsatélites constituidos por secuencias mono y dinucleotídicas localizadas en distintas regiones del genoma. Nuestro grupo valoró la

posible asociación existente entre la presencia de inestabilidad de microsatélites y la localización, estadios y contenido mucinoso del tumor, así como el intervalo libre de enfermedad (ILE) de los pacientes intervenidos de tumores en estadios II y III, tiempo libre de progresión (TLP) de pacientes intervenidos de tumores en estadio IV y la supervivencia de los pacientes. Asimismo valoramos tales asociaciones en los tumores de estadios T₃N₀, dado que la valoración de posibles marcadores de agresividad tumoral en dicho grupo de pacientes puede ser de gran utilidad clínica.

Pacientes y método

Se incluyó a 120 pacientes con cáncer de colon esporádico, intervenidos en el Servicio de Cirugía General y Digestiva del Hospital de Navarra durante el período 1999-2002; todos los pacientes fueron informados y firmaron el consentimiento diseñado para el estudio, que aprobó el Comité Ético del centro. Se excluyó a los pacientes con cáncer de colon familiar hereditario

no polipósico, según los criterios de Bethesda¹¹, los que habían recibido quimioterapia y/o radioterapia preoperatorias, y los tumores rectales.

El tratamiento con quimioterapia de 5-fluorouracilo (5-FU) y leucovorín se consideró en el 35,2, el 41,9 y el 57,1% de los tumores en estadios II, III y IV, respectivamente. Dicho tratamiento se combinó con irinotecán en el 12,9% de los pacientes de estadio III y en el 9,6% de los pacientes con tumores de estadio IV. Finalmente, la combinación de 5-FU/leucovorín con raltitrexed se consideró en el 1,9 y el 6,5% de los tumores de estadios II y III, respectivamente.

La pieza en fresco se enviaba en menos de 30 min desde el quirófano del Hospital de Navarra al Servicio de Anatomía Patológica de dicho centro. Siempre que fuera posible y no interfiriera en el correcto diagnóstico anatomopatológico, el patólogo obtuvo una muestra representativa del tumor con escasa presencia de necrosis y un fragmento de mucosa sana alejada del tumor. Las muestras fueron embebidas en el criopolímero OCT (Tissue Tek®, Sakura, Holanda), que hace posible el mantenimiento de la citoarquitectura tisular, y congeladas en nitrógeno líquido para su posterior conservación en congeladores de -80 °C situados en el Centro de Investigación Biomédica.

Para definir el estadio tumoral se emplearon las clasificaciones Dukes (modificada de Astler-Cöller)¹², el sistema TNM¹³ y el sistema del American Joint Committee on Cancer (AJCC)¹⁴. Dado el tamaño muestral, se consideraron 2 categorías para la localización de los tumores: tumores del colon derecho (ciego, colon ascendente y colon transverso) y del colon izquierdo (colon descendente, sigma). Desde el punto de vista histológico se observaron cortes teñidos de los tumores con hematoxilina y eosina por 2 patólogos que clasificaron los tumores en mucinosos (contenido superior al 70% de mucopolisacárido) y no mucinosos. Según el grado de diferenciación se catalogaron como grado I (mantenimiento de las estructuras glandulares), grado II (mantenimiento del patrón glandular con acumulación de células) y grado III (pérdida del patrón glandular en más del 70% del área tumoral).

Los tumores se clasificaron exhaustivamente según las categorías estable (MSS, *microsatellite stability*), inestable de bajo grado (MSI, *low microsatellite instability*) e inestable de alto grado (MSI-H, *high microsatellite instability*) siguiendo los criterios de Boland et al¹⁰. Para ello se empleó una batería de 7 marcadores microsatélites que incluye un marcador mononucleotídico (BAT26) y 6 marcadores dinucleotídicos (D2S123, D4S2948, D12S95, Mfd 26, D21S415, D21S1235). Los pacientes se consideran MSI-H cuando presentan inestabilidad en un porcentaje superior al 40% de los marcadores testados, es decir, en un número mínimo de 3 marcadores. Los casos MSI-L son aquellos que presentan inestabilidad en uno o 2 marcadores analizados, mientras que se consideran MSS si no presentan inestabilidad en ninguno de los marcadores analizados¹⁰. Los resultados se plantean comparando los grupos MSS/MSI-L frente a los MSI-H, siguiendo las recomendaciones de Boland et al¹⁰.

La extracción de ADN se realizó a partir de tejido normal y del tumor, conservados en congelación, mediante digestión con proteinasa K, separación de ácidos nucleicos mediante solventes orgánicos y resuspensión en Tris: ácido etilendiaminotetraacético 10:0,1 mM.

Para realizar el análisis de inestabilidad se amplificaron los marcadores mencionados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis de los productos obtenidos, tal como se refleja en la figura 1; las mezclas de reacción consistieron en cloruro magnésico, ddNTPs, ADN polimerasa (5 U/μl) (Roche Diagnostics, F Hoffmann-La Roche Ltd., Basilea, Suiza), agua bidestilada estéril (calidad MilliQ, Millipore, EE.UU.) y parejas de cebadores «sentido» y «antisentido». Las secuencias de cebadores y condiciones de las reacciones de PCR fueron específicas de cada marcador y su secuencia está disponible en la base de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts>. Los productos de PCR de las parejas normal-tumor de cada caso se separaron mediante electroforesis en gel de acrilamida al 6% desnaturante (Hofer, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido), y las bandas se detectaron mediante tinción con nitrato de plata. El resultado se escaneaba en densitómetro (GS-690, BioRad, Hercules, CA94547, USA) y las

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/9297736>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/9297736>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)