

# Inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal: concepto, métodos de detección y utilidad clínica

R. Jover<sup>a</sup> y A. Payá<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Sección de Medicina Digestiva. Hospital General Universitario. Alicante. <sup>b</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital General Universitario. Alicante. España.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera neoplasia más frecuente en nuestro país, tras el cáncer de pulmón y mama, y es, con gran diferencia, la neoplasia del aparato digestivo que más muertes produce. El fenómeno que inicia la génesis de la mayor parte de los casos de CCR es la inactivación del gen *APC*; a partir de este hecho pueden darse 2 vías carcinogénicas. En la mayoría de los tumores aparecen inactivaciones sucesivas en genes supresores tumorales y la activación de algunos oncogenes<sup>1</sup>. Estos casos de CCR siguen la denominada vía supresora o de inestabilidad cromosómica, caracterizada por pérdida de heterocigosidad y aneuploidía en el material tumoral. Aproximadamente un 10-15% de los CCR siguen una vía alternativa de carcinogénesis. Estos tumores se producen como consecuencia de la existencia de mutaciones en los genes que habitualmente se encargan de la reparación de errores en el ADN. De este modo, estos genes se inactivan y en el material genético aparecen multitud de errores que conducen a la formación de una gran cantidad de mutaciones. Por este motivo esta vía carcinogénica se denomina vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites, y este tipo de tumores se conocen como tumores con errores de replicación (RER+) o de fenotipo mutador. Más del 95% de los CCR que se producen en el síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCRHN) y un 10-15% de los CCR esporádicos son tumores RER+. Estos tumores RER+ presentan un fenómeno molecular característico denominado inestabilidad de microsatélites (IMS), que sirve para su identificación.

## MECANISMO DE REPARACIÓN DE LOS ERRORES DE REPLICACIÓN

El sustrato genético de la IMS es la inactivación de alguno de los genes reparadores de errores de la replicación del ADN. Cuando esto ocurre, se acumulan errores en el ADN y se produce gran cantidad de mutaciones por inserciones o deleciones. Los microsatélites son secuencias repetitivas de nucleótidos que existen en el ADN en condiciones normales. Estas secuencias repetitivas son muy propensas a presentar mutaciones, que habitualmente son reparadas por los genes reparadores de errores. Cuando estos genes se hallan inactivados, se produce el fenómeno de la IMS.

Como se ha dicho, los microsatélites son secuencias altamente repetitivas, constituidas por repeticiones en tándem de uno a 4 nucleótidos que se denominan mono-, di-, tri- y tetranucleótidos —p. ej., (A)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, etc.—. Existen miles de microsatélites en el genoma humano. Durante la replicación del ADN, estas secuencias son muy propensas a desalinearse o aparearse incorrectamente por causa de un fenómeno conocido como deslizamiento de las hebras (*slippage*). Como resultado de ese deslizamiento, se producen deleciones o inserciones en las secuencias microsatélites, que son muy eficazmente corregidas por el mecanismo de reparación de errores por deslizamiento (*mismatch repair*). Este mecanismo está constituido fundamentalmente por las proteínas hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS2, hMSH3 y hMLH3. Entre ellas forman complejos heterodiméricos, de los que en el momento actual se conocen 2 tipos. El más abundante y primero en actuar, hMutSα, está formado por hMSH2-hMSH6 (un 10% aproximadamente de hMSH2 se une a hMSH3). A este complejo se le une posteriormente otro, hMutLα, formado por hMLH1-hPMS2 (o alternativamente hMLH1-hMLH3). El complejo final escinde el error del ADN y lo repara.

Si se inactivan por cualquier mecanismo (deleción, mutación o metilación) ambas copias de alguno de estos genes, no se repararán los errores de replicación y se acumularán mutaciones en microsatélites, lo que dará lugar a

Correspondencia: Dr. R. Jover.  
Sección de Medicina Digestiva. Hospital General Universitario de Alicante.  
Pintor Baeza, s/n. 03012 Alicante. España.  
Correo electrónico: jover\_rod@gva.es

Recibido el 23-4-2003; aceptado para su publicación el 28-4-2003.

IMS. Las alteraciones más patogénicas son las que afectan a hMLH1 y hMSH2, ya que son insustituibles en sus respectivos complejos (hMSH6 y hPMS2 pueden sustituirse parcialmente por hMSH3 y hMLH3)<sup>2</sup> y éste es probablemente el principal motivo de que sean los genes más frecuentemente inactivados en el CCRHNP.

## CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los tumores RER+ presentan algunas características clínicas que los hacen diferentes del resto de CCR, lo cual permite englobarlos como un subtipo independiente<sup>3</sup>. La mayoría de estas características clínicas distintivas afectan tanto a los tumores hereditarios como a los esporádicos, que son portadores de esta anomalía molecular y son fruto de la diferente vía carcinogénica seguida por estos tumores.

Prácticamente todos los estudios que han investigado las características clínicas de los tumores RER+ han detectado que este tipo de tumores son más frecuentes en el colon derecho<sup>3-8</sup>, y muy poco frecuentes en el recto<sup>9-11</sup>. Gryfe et al<sup>3</sup> estudiaron las características que diferencian a los pacientes afectados de CCR con y sin IMS. Para ello incluyeron a 607 pacientes con CCR, el 17% de los cuales tenía IMS. Encontraron que los tumores con IMS presentan con mayor frecuencia una localización proximal, se asocian a otros CCR síncronos o metacrónicos y son tumores con peor diferenciación tumoral. En cuanto al potencial maligno, los tumores con IMS invaden con mayor profundidad la pared del colon, pero, en cambio, se diagnostican en un estadio menos avanzado y es menos frecuente que presenten metástasis ganglionares o a distancia. Por otra parte, algunos estudios han mostrado que con frecuencia los CCR con IMS tienen un tamaño mayor en el momento del diagnóstico<sup>5-7,12</sup>.

Los tumores RER+ esporádicos afectan a individuos de edad similar a la del resto de los pacientes con CCR<sup>5,8</sup>. Como suele ocurrir en los cánceres hereditarios, en general los CCR con IMS que aparecen en el CCRHNP se diagnostican en edad más temprana y, de hecho, éste es uno de los criterios empleados para el diagnóstico de esta enfermedad (tabla I). No obstante, es frecuente que, incluso en el seno de un CCRHNP, se diagnostiquen casos en pacientes de edad avanzada.

Varios estudios han demostrado que los tumores RER+ presentan mejor pronóstico. Este hecho se intuyó desde los primeros trabajos que definieron esta anomalía molecular<sup>6,13</sup>. El mejor pronóstico de este tipo de tumores se refiere a una mejor supervivencia y a un intervalo libre de enfermedad más prolongado, y se ha observado en tumores RER+ tanto esporádicos como hereditarios<sup>3,7,14,15</sup>. Parte de esta ventaja para la supervivencia se debe a que con mayor frecuencia se diagnostican en un estadio más temprano<sup>3,16-18</sup>. En el estudio antes mencionado de Gryfe et al<sup>3</sup> se observa que los CCR con IMS tienen una supervivencia a los 5 años del 74%, frente al 54% del resto de tumores, diferencia que resulta estadísticamente significativa y se mantiene para todos los estadios. En el análisis multivariante la presencia de IMS fue un factor pronósti-

TABLA I. Características histológicas y clínicas de los tumores con inestabilidad de microsatélites

Tumores mal diferenciados
Crecimiento mucinoso
Reacción linfóide Crohn-like
Tumor primario de gran tamaño
ADN diploide
Localización en el colon derecho
Estadio menos avanzado en el momento del diagnóstico
Mejor pronóstico
Mejor respuesta a la quimioterapia

co independiente, junto con el estadio, el grado de diferenciación y el tipo histológico. Otros estudios también han demostrado un beneficio para la supervivencia en CCR con IMS en análisis multivariantes<sup>7,16,18</sup>, y parece que la mayor ventaja para la supervivencia la obtienen los pacientes en estadio III que tienen IMS<sup>16,18</sup>. Existen pocos datos sobre si este mejor pronóstico se mantiene en todos los estadios. Sólo hay un pequeño estudio que incluye a pacientes en estadio poco avanzado, en concreto a 88 pacientes en estadio IIB, y concluye que la presencia de IMS no es un factor pronóstico en este grupo de enfermos<sup>19</sup>. De este modo parece claro que los CCR con IMS presentan mejor pronóstico, en especial en presencia de metástasis ganglionares. Esta mejor supervivencia ocurre de manera independiente de otros factores pronósticos, y además este tipo de tumores RER+ se diagnostican con mayor frecuencia en estadios más tempranos.

No se conoce bien cuál es el mecanismo que hace que los CCR con IMS tengan una evolución clínica menos agresiva, aunque es muy probable que se deba a la diferente vía carcinogénica seguida por estos tumores, con una menor tasa de mutaciones de los genes *APC* y *p53*<sup>20</sup> y mutaciones más frecuentes en la  $\beta$ -catenina<sup>21</sup> y el factor transformador del crecimiento tipo beta (TGF- $\beta$ )<sup>22</sup>. Otra posibilidad es que la alta carga mutacional de los tumores RER+ ejerza un efecto autodestructivo sobre el tejido tumoral y disminuya su potencial de metastatizar. De manera paradójica, la alta tasa de mutaciones que presentan estos tumores puede suponer un freno para su crecimiento<sup>23</sup>. Así, en tumores con IMS se ha observado la presencia de mutaciones en oncogenes y en genes que regulan el crecimiento celular<sup>22,24</sup>, como el gen del receptor de tipo II de TGF- $\beta$ <sup>18,25</sup>, que finalmente resultan letales para las células que las poseen, por lo que se detiene el propio crecimiento del tumor. Además, es probable que la respuesta inmunitaria frente a estos tumores sea mayor, y expresión de ello sería la reacción linfóide Crohn-like que suelen presentar. Este mejor pronóstico no se ha demostrado, sin embargo, en otros tumores con IMS, como en los cánceres gástrico<sup>26</sup>, endometrial<sup>27</sup> o de mama<sup>28</sup>.

Los tumores RER+ no sólo tienen mejor pronóstico, sino que además parecen responder mejor al tratamiento quimioterápico. Estudios preliminares indican que los tumores con IMS presentan mejor respuesta a algunos quimioterápicos como el irinotecán<sup>29</sup>. Hay otros estudios *in vitro* que evalúan la sensibilidad de los tumores con IMS frente al principal agente quimioterápico utilizado en el CCR, el 5-fluorouracilo, con resultados contradictorios<sup>30,31</sup>. En los

TABLA II. Panel de marcadores microsatélites

Marcador	Tipo	Localización
D2S123	Dinucleótido	2p21-2p16
D5S346	Dinucleótido	5q21-5q22
D17S250	Dinucleótido	17q11,2-17q12
BAT-25	Mononucleótido	4q12
BAT-26	Mononucleótido	2p16

últimos años varios estudios han evaluado este aspecto. Hemminki et al<sup>32</sup> realizaron un estudio prospectivo en el que se comparó la evolución tras recibir quimioterapia adyuvante basada en 5-fluorouracilo en pacientes afectados de CCR con y sin IMS. El estudio incluyó a 95 pacientes, todos ellos en estadio III, y encontró que los enfermos con tumores con IMS presentaban una supervivencia a los 3 años del 90%, mientras que los CCR sin IMS tenían una supervivencia a los 3 años del 43%, diferencia que resultó estadísticamente significativa. Por su parte, Elsaleh et al<sup>4</sup>, en un estudio retrospectivo que incluye a 656 pacientes con CCR en estadio III, muestran que los tumores con IMS tienen un mejor pronóstico, pero que este beneficio para la supervivencia está limitado a los pacientes que reciben quimioterapia. Sin embargo, otros estudios han demostrado que el mejor pronóstico en tumores en estadio III se mantiene, aunque no hayan recibido quimioterapia<sup>3,7</sup>. Otros investigadores han observado que la mejor respuesta a la quimioterapia en pacientes con tumores RER+ parece ligada a las mutaciones producidas en algunos genes concretos, como el gen del receptor del tipo II del TGF- $\beta$ <sup>125</sup>. También parece que la presencia de IMS predice una mejor respuesta a dosis altas de 5-fluorouracilo en tumores con metástasis a distancia<sup>33</sup>. No obstante, todavía hay dudas acerca del papel de este marcador molecular en la predicción de respuesta a la quimioterapia basada en 5-fluorouracilo. Recientemente, Barratt et al<sup>19</sup>, en un estudio en el que se evalúan varios marcadores moleculares como factores predictivos de respuesta a la quimioterapia con 5-fluorouracilo, no encuentran que la presencia de IMS sea un factor predictivo de respuesta al tratamiento adyuvante en pacientes en estadios II y III.

En el estado actual de las investigaciones todavía quedan muchas preguntas por responder acerca del valor pronóstico del fenómeno de IMS en el CCR. Así, todavía no está claro si los tumores RER+ tienen un mejor pronóstico en todos los estadios o si esta mayor supervivencia se limita a los tumores con metástasis ganglionares. Tampoco se sabe si el mejor pronóstico depende o no del tratamiento quimioterápico; si esto fuera así, la existencia de IMS no sería un factor pronóstico, sino un factor predictivo de respuesta al tratamiento. Este hecho es de suma importancia, dado que si el pronóstico es mejor sin que intervenga en ello el haber recibido o no quimioterapia, quizá estos pacientes no deberían recibir tratamiento adyuvante y así evitarían los efectos secundarios que produce. En cambio, si el mejor pronóstico depende de la quimioterapia, la conclusión sería la contraria, y quizá éste sería un marcador molecular que aumentaría las indicaciones del trata-

miento adyuvante en estadios menos avanzados. Futuros estudios deben ir encaminados a clarificar estas cuestiones.

## CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

Aunque no hay ninguna característica anatomopatológica totalmente específica de los tumores con IMS, sí existen algunas que son muy indicativas de esta anomalía molecular (tabla I). Comparados con los tumores estables, los tumores con IMS muestran con mayor frecuencia pobre diferenciación, linfocitosis intraepitelial, reacción linfoide periférica tipo Crohn, extensa mucina extracelular (carcinomas mucinosos) y células en anillo de sello<sup>34</sup>. La mayoría de los tumores presenta un patrón de crecimiento expansivo.

Los carcinomas pobremente diferenciados presentan con elevada frecuencia IMS. Dentro de este grupo, el carcinoma medular presenta IMS en más de un 95% de los casos<sup>35</sup>. Se caracteriza por estar constituido por nidos y trabéculas sólidas con células de citoplasma eosinófilo, núcleos vesiculosos con nucléolo prominente y densa linfocitosis intraepitelial<sup>36</sup>.

Los carcinomas mucinosos presentan IMS en aproximadamente un tercio de los casos<sup>37</sup>. Es más frecuente en los de localización proximal y en los de patrón tubulopapilar, que presentan IMS en un 54% de los casos<sup>38</sup>.

Los tumores con IMS frecuentemente suscitan una reacción linfoide en el huésped, en forma de linfocitosis intraepitelial o de reacción linfoide peritumoral tipo Crohn. La mayoría de los linfocitos intraepiteliales del tumor son de tipo T<sup>39</sup>. Como regla general, si se observa linfocitosis intraepitelial a bajo aumento, el tumor es probablemente inestable. En la zona periférica del tumor se pueden observar folículos linfoides con ocasionales centros germinales (reacción tipo Crohn) en la mitad de los casos.

No existen características histológicas que diferencien los tumores con IMS esporádicos de aquellos que aparecen en el CCRHNP.

## MÉTODOS DE DETECCIÓN

El estudio de las alteraciones del mecanismo de reparación puede realizarse en 3 ámbitos: *a*) estudiando los genes directamente; *b*) analizando la presencia o ausencia de las proteínas codificadas, o *c*) analizando microsatélites, que son la diana final donde actúan las proteínas reparatoras.

## Análisis de microsatélites

La característica molecular que define a los tumores RER+ es la presencia de inserciones o deleciones en secuencias de ADN repetitivas denominadas microsatélites, fenómeno conocido como IMS. En 1998 se acordó un panel de 5 marcadores microsatélites (tabla II) y los criterios para definir la inestabilidad<sup>40</sup>. Se considera que un tu-

mor presenta IMS alta si muestra inestabilidad en 2 o más marcadores y baja si sólo aparece en un marcador. El análisis se realiza mediante reacción en cadena de la polimerasa comparando en cada caso el tamaño de los alelos del tumor con su correspondiente ADN no tumoral. En los tumores con IMS pueden observarse con los marcadores dinucleótidos inserciones o deleciones en el ADN tumoral, mientras que con los mononucleótidos siempre se trata de deleciones. Los marcadores más sensibles para IMS son los mononucleótidos. En concreto, con el BAT-26 pueden detectarse más del 95% de los tumores con IMS<sup>41</sup>, por lo que en algunos trabajos se ha utilizado como único marcador. Tiene además la ventaja de que es prácticamente monomórfico, lo cual permite utilizar sólo ADN tumoral sin necesidad de compararlo con ADN no tumoral. Todo ello simplifica la técnica, abarata los costes y además permite realizar el análisis cuando no se dispone de tejido no tumoral (p. ej., biopsias endoscópicas).

### Análisis inmunohistoquímico

La inactivación de los genes reparadores de errores de replicación lleva, en la mayoría de los casos, a una pérdida de expresión inmunohistoquímica de las proteínas codificadas por estos genes. En la mayor parte de los trabajos la sensibilidad y especificidad de esta técnica para la identificación de tumores con IMS son muy altas, superiores al 85%, aun a pesar de que la mayoría de ellos sólo estudia MLH1 y MSH2<sup>42-44</sup>. El análisis de expresión inmunohistoquímica es una técnica sencilla y barata, fácil de realizar en cualquier laboratorio en el que se hagan de forma habitual tinciones inmunohistoquímicas, como es el caso de la mayoría de los servicios de anatomía patológica. Además, permite identificar la proteína no expresada y el gen inactivado. Actualmente, es objeto de debate si la inmunohistoquímica puede sustituir al análisis de microsatélites como técnica inicial para la identificación de tumores con alteraciones de la vía reparadora<sup>45</sup>.

El estudio inmunohistoquímico se realiza habitualmente sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina. Para su valoración siempre se dispone de controles internos positivos (estroma, linfocitos), necesarios para poder determinar que la ausencia de expresión en un tumor no se debe a un problema de la técnica. Cuando se analizan las proteínas reparadoras, hay que tener en cuenta que la inactivación de MLH1 se asocia con pérdida de expresión de PMS2<sup>46</sup> y que la inactivación de MSH2 se asocia con gran frecuencia a pérdida de MSH6, debido en ambos casos a la falta de estabilización del heterodímero MLH1-PMS2 o MSH2-MSH6<sup>47</sup>.

### Análisis genético

El análisis genético permite identificar la forma de inactivación del gen. Está especialmente indicado en casos con sospecha de CCRHNP, no sólo para su confirmación sino también para la identificación de familiares portadores.

TABLA III. Criterios de Amsterdam para el diagnóstico del cáncer colorrectal hereditario no polipósico

#### Criterios de Amsterdam

1. Tres o más familiares con cáncer colorrectal, de los que al menos uno de ellos sea familiar en primer grado de los otros 2
2. Cáncer colorrectal que afecte al menos a 2 generaciones
3. Al menos un caso diagnosticado antes de los 50 años
4. Debe excluirse el diagnóstico de poliposis colónica familiar

#### Criterios de Amsterdam II

1. Tres o más familiares con cáncer de la esfera del CCRHNP (cáncer colorrectal, endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal), de los que al menos uno de ellos sea familiar en primer grado de los otros 2
2. Cáncer colorrectal que afecta al menos a 2 generaciones
3. Al menos un cáncer diagnosticado antes de los 50 años
4. Debe excluirse el diagnóstico de poliposis colónica familiar

CCRHNP: cáncer colorrectal hereditario no polipósico.

En los casos esporádicos el gen está inactivado sólo en el ADN tumoral, mientras que en los casos de CCRHNP la mutación es germinal y, por tanto, también se halla presente en el ADN constitucional.

Los genes MLH1 y MSH2 son los que se inactivan en más del 90% de los tumores con IMS. En los tumores esporádicos, el gen inactivado es el MLH1 y en más del 80% de los casos la inactivación se produce por metilación del promotor<sup>8</sup>.

En pacientes que cumplen criterios clínicos de CCRHNP, se identifica mutación en uno de los genes reparadores de errores de replicación en 2 tercios de los casos. Cuando se identifica la mutación, los genes afectados son MLH1 y MSH2 en un 90% aproximadamente de los casos y en ambos con similar frecuencia (International Collaborative Group on HNPCC mutation database, <http://www.nfdht.nl>). En un pequeño porcentaje se identifican mutaciones en MSH6 y presentan frecuentemente baja IMS<sup>48</sup>. Las mutaciones en el resto de los genes reparadores son excepcionales.

Las técnicas más frecuentemente usadas para la búsqueda de mutaciones son: a) test de proteína truncada; b) polimorfismos de conformación de cadenas sencillas; c) electroforesis en gel de gradiente desnaturizante; d) análisis de heterodúplex, y e) secuenciación de ADN<sup>49</sup>. Ninguna de estas técnicas identifica grandes deleciones o inserciones, mutaciones en la región del promotor ni reordenamientos genómicos. En los genes MLH1 y MSH2 pueden detectarse grandes deleciones en aproximadamente un 10% de los casos, que pueden identificarse por técnicas como el Southern blot o la reacción en cadena de la polimerasa múltiple semicuantitativa<sup>50</sup>.

### UTILIDAD CLÍNICA

Como se ha visto anteriormente, la detección de IMS en el tejido tumoral en pacientes con cáncer de colon tiene valor pronóstico y, además, es posible que también sea capaz de predecir la respuesta a la quimioterapia. Sin embargo, su principal utilidad clínica se halla en la estrategia de cribado del CCRHNP. Existen evidencias de que en los miembros de familias con CCRHNP el cribado con colonoscopia consigue reducir la mortalidad por CCR<sup>51</sup>.



TABLA IV. Criterios de Bethesda

1. Individuos con cáncer en familias que reúnen los criterios de Amsterdam
2. Individuos con 2 tumores de la esfera del CCRHNP, incluidos CCR síncrono o metacrónico o cáncer extracolónico (endometrio, ovario, estómago, hepatobiliar, intestino delgado o carcinoma de células transicionales de la pelvis renal o el uréter)
3. Individuos con CCR y un familiar en primer grado con CCR o cáncer extracolónico de la esfera CCRHNP 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 del colon derecho con patrón indiferenciado (sólido/cribiforme) en la anatomía patológica, diagnosticado antes de los 45 años
6. Individuos con CCR con células de tipo anillo de sello diagnosticado antes de los 45 años
7. Individuos con adenomas diagnosticados antes de los 40 años

CCRHNP: cáncer colorrectal hereditario no polipósico; CCR: cáncer colorrectal.

Por ello es de suma importancia disponer de métodos eficaces para identificar a las familias que presentan esta enfermedad. Para el diagnóstico del CCRHNP se han utilizado los criterios de Amsterdam<sup>52</sup> (tabla III), diseñados en 1991 por el International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. Posteriormente, y dado su carácter altamente restrictivo, estos criterios se ampliaron, con la creación de los criterios de Amsterdam II<sup>53</sup> (tabla III). En cualquier caso, tanto con los criterios de Amsterdam como con los de Amsterdam II el diagnóstico clínico del CCRHNP posee una baja sensibilidad, debido a su alto nivel de exigencia. Por otra parte, el diagnóstico genético del CCRHNP mediante la demostración de mutaciones en los genes reparadores de errores en la replicación es difícil, poco accesible, caro y, además, se halla gravado con una relativamente baja sensibilidad<sup>54</sup>. Por todo ello, resulta muy interesante disponer de un marcador molecular que sea capaz de descartar, en el mayor número de casos, el diagnóstico de CCRHNP con una alta especificidad y que nos oriente hacia este diagnóstico en casos con antecedentes familiares o personales.

La existencia de IMS en más del 90% de los pacientes diagnosticados de CCRHNP con los criterios de Amsterdam hizo pensar que éste podía ser un marcador molecular de esta enfermedad. Diversos estudios han analizado la utilidad de dicho marcador en el diagnóstico de este tipo de CCR. En 1998 Aaltonen et al<sup>55</sup> demostraron, en un elegante y bien diseñado estudio, que sólo los pacientes con tumores que muestran IMS son susceptibles de tener mutaciones en los genes reparadores de errores y que la ausencia de este marcador molecular descarta la posibilidad de encontrar mutaciones en estos genes. Posteriormente, otro estudio de este mismo grupo confirmó estos hallazgos y, al mismo tiempo, proporcionó unas primeras directrices para seleccionar a los pacientes a los que se debe efectuar el cribado molecular de CCRHNP con la determinación de IMS en tejido tumoral. En este estudio, Salovaara et al<sup>56</sup> analizan de manera prospectiva los criterios descritos en el trabajo de Aaltonen et al<sup>55</sup> para la selección de pacientes a los que se debe hacer es-

tudio de IMS. En 535 pacientes con CCR realizan análisis de IMS en tejido tumoral y determinación de mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2*, y encuentran que todos los pacientes a los que se detectaron mutaciones tenían IMS y que el 94% de los pacientes con mutaciones cumplían al menos uno de estos 3 criterios clínicos: edad menor de 50 años, presencia de casos metacrónicos o síncronos de CCR o cáncer de endometrio o existencia de familiares en primer grado con CCR o cáncer de endometrio. Por su parte, Terdiman et al<sup>57</sup> también diseñaron un estudio para validar esta estrategia en 2 pasos para la detección de CCRHNP en una población de alto riesgo de cáncer de colon y encontraron que en presencia de edad menor de 50 años en el momento del diagnóstico, CCR síncrono o metacrónico o antecedentes familiares de CCR, la realización de estudio de IMS o de inmunohistoquímica era útil como primer paso a seguir antes del análisis genético.

Para decidir en qué pacientes debía determinarse la presencia de IMS, como cribado de CCRHNP, un grupo de expertos publicó en 1997 los denominados criterios de Bethesda<sup>58</sup> (tabla IV). Si un paciente con CCR cumple alguno de estos criterios, está indicada la realización de técnicas de biología molecular sobre el tejido tumoral para determinar si nos encontramos ante un tumor con errores de replicación. La determinación de IMS por biología molecular puede sustituirse por la inmunohistoquímica de las proteínas *MLH1* y *MSH2*<sup>42,59</sup>. Si se observa falta de expresión de cualquiera de las 2 proteínas, podemos considerar que nos hallamos ante un tumor RER+ y que presentará IMS. La inmunohistoquímica tiene la ventaja de que su realización es más sencilla y es accesible para cualquier laboratorio de anatomía patológica; además, indica cuál es la proteína afectada y, por tanto, en qué gen se ha de buscar la mutación en el análisis genético<sup>59,60</sup>. No obstante, si la inmunohistoquímica es normal, con expresión normal de las 2 proteínas, podemos hallarnos ante una mutación de otro gen reparador de errores (generalmente *MSH6*) y debe hacerse el estudio de IMS con técnicas de biología molecular antes de descartar que se trate de un tumor RER+<sup>60</sup>.

Si hay IMS o no existe expresión de las proteínas *MLH1* o *MSH2*, el siguiente paso sería la realización de un test genético que confirme el diagnóstico de CCRHNP. Los criterios de Bethesda han mostrado su utilidad como método clínico de cribado para la selección de pacientes a los que se debe hacer estudio de IMS, y los pacientes con IMS que no cumplen ningún criterio de Bethesda presentan tumores esporádicos con IMS secundaria a la metilación del promotor *MLH1*<sup>61</sup>. Además esta estrategia en 3 pasos –primero, criterios de Bethesda; segundo, análisis de IMS, y tercero, test genético– se ha mostrado coste-efectiva, con un aumento todavía mayor de su coste-efectividad cuantos más familiares afectados se identifiquen<sup>62</sup>. Es importante tener en cuenta que, al igual que ocurre con otras enfermedades hereditarias como la poliposis colónica familiar, el test genético sólo es útil cuando se ha demostrado su positividad en algún paciente afectado (caso índice). No hay que olvidar el dato de que, incluso en familias que reúnen los criterios de Amsterdam, sólo en el

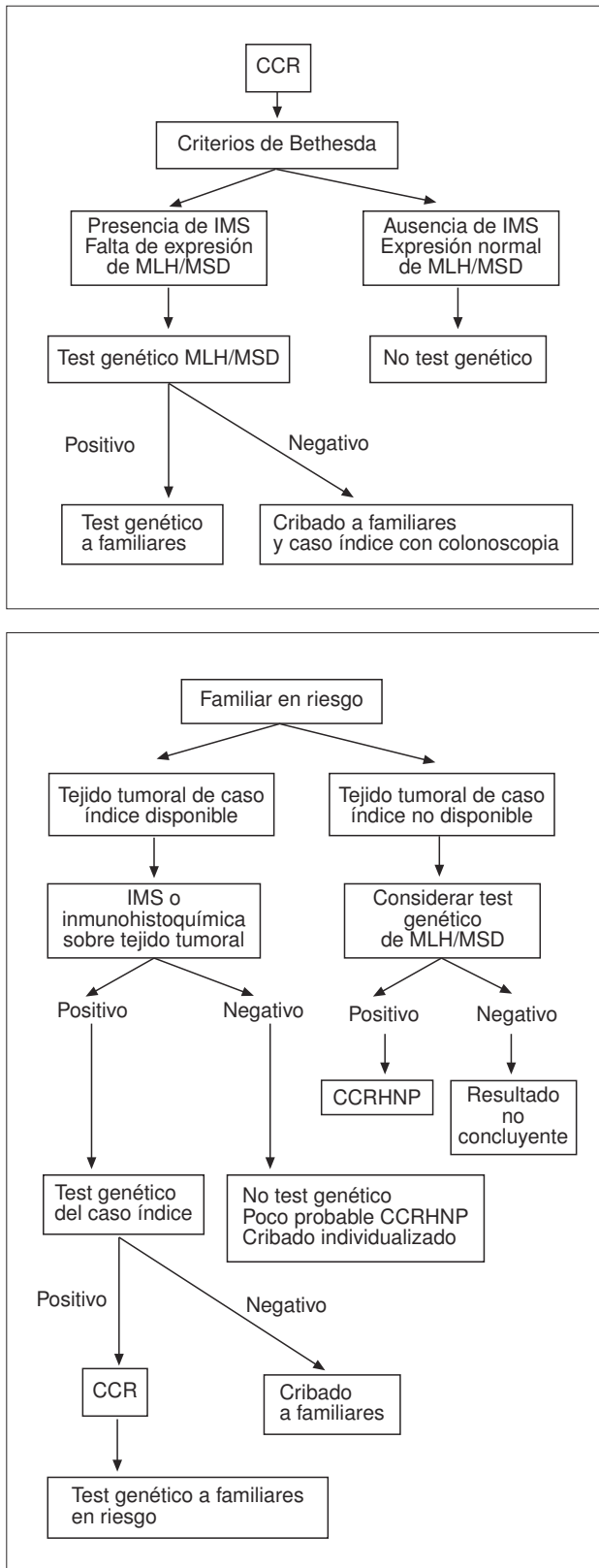


Fig. 1. Utilidad clínica de la detección de inestabilidad de microsatélites (IMS) en: a) el diagnóstico del cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCRHNP), y b) persona en riesgo (individuo con antecedentes familiares de cáncer colorrectal [CCR], perteneciente a una familia con CCRHNP o sospecha de pertenecer a una familia con CCRHNP).

70% son detectables mutaciones en los genes *MLH1*, *MSH2*, *PMS1* o *PMS2*, probablemente debido a deficiencias de la técnica empleada y a la existencia de otros genes involucrados en esta enfermedad y de cuyo estudio todavía no disponemos<sup>63</sup>. Por ello la negatividad de este test genético no excluye la existencia de esta enfermedad. Por tanto, si el test en el caso índice es negativo o si no se dispone de él y la sospecha clínica es alta, y en especial si existe IMS o no hay expresión de las proteínas MLH1 o MSH2, las recomendaciones para la vigilancia del CCR<sup>64</sup> no deben verse alteradas y estaría indicado el cribado a los familiares de primer grado, con colonoscopia anual comenzando a los 20-25 años o 10 años antes que el caso más joven de la familia<sup>64</sup>. Asimismo, estaría indicada la vigilancia ginecológica a las mujeres de la familia, con ecografía transvaginal, aspirado endometrial y determinación de CA-125 sérico también anual-bianual<sup>54,59,65</sup>. Por otra parte, el caso índice debe llevar un seguimiento postoperatorio exhaustivo por el alto riesgo de tumores colónicos metacronos.

En la figura 1a se presenta un algoritmo de la utilización de esta estrategia de 3 pasos para el diagnóstico de CCRHNP. En la figura 1b se expone un algoritmo sobre la utilidad del análisis de IMS en presencia de una persona con sospecha de pertenecer a una familia con CCRHNP.

## BIBLIOGRAFÍA

- Boland CR, Sinicrope FA, Brenner DE, Carethers JM. Colorectal cancer prevention and treatment. *Gastroenterology* 2000;118(2 Suppl 1):S115-S28.
- 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. *Nat Genet* 2000;24:27-35.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, 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.
- Elsaleh H, Joseph D, Grief F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000;355:1745-50.
- Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, et al. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high frequency microsatellite. *Cancer* 2000;89:2025-37.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
- Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg* 2000;87:1197-202.
- Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, et al. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol* 2001;159:2107-16.
- Hoogerbrugge N, Willems R, Van Krieken HJ, Kiemeny LA, Weijmans M, Nagengast FM, et al. Very low incidence of microsatellite instability in rectal cancers from families at risk for HNPCC. *Clin Genet* 2003;63:64-70.
- Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grief F, Grant R, Joseph D, et al. *p53* alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colo-

- rectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1343-9.
11. Nilbert M, Planck M, Fernebro E, Borg A, Johnson, A. Microsatellite instability is rare in rectal carcinomas and signifies hereditary cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:942-5.
12. Feeley KM, Fullard JF, Heneghan MA, Smith T, Maher M, Murphy RP, et al. Microsatellite instability in sporadic colorectal carcinoma is not an indicator of prognosis. *J Pathol* 1999;188:14-7.
13. Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993;53:5849-52.
14. Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, Mecklin JP. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 1996;110:682-7.
15. Percecepe A, Benatti P, Roncucci L, Sassatelli R, Fante R, Ganazzi D, et al. Survival analysis in families affected by hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 1997;71:373-6.
16. Halling KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, et al. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1295-303.
17. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994;145:148-56.
18. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:917-23.
19. Barratt PL, Seymour MT, Stenning SP, Georgiades I, Walker C, Birbeck K, et al. DNA markers predicting benefit from adjuvant fluorouracil in patients with colon cancer: a molecular study. *Lancet* 2002;360:1381-91.
20. Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, et al. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 1996;111:307-17.
21. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-TGF signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-90.
22. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268:1336-8.
23. Nicholl ID, Dunlop MG. Molecular markers of prognosis in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1267-9.
24. Abdel-Rahman WM, Georgiades IB, Curtis LJ, Arends MJ, Wyllie AH. Role of BAX mutations in mismatch repair-deficient colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 1999;18:2139-42.
25. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001;344:1196-206.
26. Wirtz HC, Muller W, Noguchi T, Scheven M, Ruschoff J, Hommel G, et al. Prognostic value and clinicopathological profile of microsatellite instability in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:1749-54.
27. Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 1996;148:1671-8.
28. Paulson TG, Wright FA, Parker BA, Russack V, Wahl GM. Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:4021-6.
29. Fallik D, Sabourin JC, Borriani F, Jacob S, Boige V, Praz F, et al. Response of metastatic colorectal cancers to treatment with CPT11 (Irinotecan): implications of the mismatched base repair system. *Gastroenterol Clin Biol* 2000;24:917-22.
30. Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim HK, Zheng H, Fink JL, et al. Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 1997;3:1763-7.
31. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, Nebel S, Bresalier RS, Howell SB, et al. Mismatch repair proficiency and *in vitro* response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 1999;117:123-31.
32. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000;119:921-8.
33. Liang JT, Huang KC, Lai HS, Lee PH, Cheng YM, Hsu HC, et al. High-frequency microsatellite instability predicts better chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV sporadic colorectal cancer after palliative bowel resection. *Int J Cancer* 2002;101:519-25.
34. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001;158:527-35.
35. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, et al. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol* 2001;159:2239-48.
36. Ruschoff J, Dietmaier W, Luttges J, Seitz G, Bocker T, Zirngibl H, et al. Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type: clinical, phenotypic, and molecular characteristics. *Am J Pathol* 1997;150:1815-25.
37. Messerini L, Ciantelli M, Baglioni S, Palomba A, Zampi G, Papi L. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal cancers. *Hum Pathol* 1999;30:629-34.
38. Kondo T, Masuda H, Abe Y, Takayama T. Two subtypes in colorectal mucinous carcinoma in relation to microsatellite instability. *Hepatogastroenterology* 2002;49:660-3.
39. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 1999;154:1805-13.
40. 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.
41. Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001;61:4545-9.
42. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, Sutherland F, Haine L, Longfellow M, et al. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut* 1999;45:409-15.
43. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, et al. Immunohistochemistry for HMLH1 and HSMH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1248-55.
44. Stone JG, Robertson D, Houlston RS. Immunohistochemistry for MSH2 and MHL1: a method for identifying mismatch repair deficient colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2001;54:484-7.
45. De la Chapelle A. Microsatellite instability phenotype of tumors: genotyping or immunohistochemistry? The jury is still out. *J Clin Oncol* 2002;20:897-9.
46. Yao X, Buermeyer AB, Narayanan L, Tran D, Baker SM, Prolla TA, et al. Different mutator phenotypes in *MLH1*- versus *PMS2*-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1999;96:6850-5.
47. Fishel R. Signaling mismatch repair in cancer. *Nat Med* 1999;5:1239-41.
48. Wu Y, Berends MJ, Mensink RG, Kempinga C, Sijmons RH, Der Zee AG, et al. Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with *MSH6* germline mutations. *Am J Hum Genet* 1999;65:1291-8.
49. Wahlberg S, Liu T, Lindblom P, Lindblom A. Various mutation screening techniques in the DNA mismatch repair genes *HMSH2* and *HMLH1*. *Genet Test* 1999;3:259-64.
50. Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in *MSH2*

- and *MLH1* genes. *Int J Cancer* 2003;103:636-41.
51. Jarvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995;108:1405-11.
52. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-5.
53. 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.
54. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 2001;121:198-213.
55. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-7.
56. Salovaara R, Loukola A, Kristo P, Kaariainen H, Ahtola H, Eskelinen M, et al. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:2193-200.
57. Terdiman JP, Gum JR Jr, Conrad PG, Miller GA, Weinberg V, Crawley SC, et al. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology* 2001;120:21-30.
58. Rodríguez-Bigas MA, 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.
59. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:1043-8.
60. Christensen M, Katballe N, Wikman F, Primdahl H, Sorensen FB, Laurberg S, et al. Antibody-based screening for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma compared with microsatellite analysis and sequencing. *Cancer* 2002;95:2422-30.
61. Raedle J, Trojan J, Brieger A, Weber N, Schafer D, Plotz G, et al. Bethesda Guidelines: relation to microsatellite instability and *MLH1* promoter methylation in patients with colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2001;135(8 Pt 1):566-76.
62. Ramsey SD, Clarke L, Etzioni R, Higashi M, Berry K, Urban N. Cost-effectiveness of microsatellite instability screening as a method for detecting hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2001;135(8 Pt 1):577-88.
63. Lynch HT, De la Chapelle A. Genetic susceptibility to nonpolyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999;36:801-18.
64. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;124:544-60.
65. Lynch HT, De la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-32.