

M. Vidaurreta^a
I. Almansa^a
M.T. Sanz^a
F. Tresserra^b
L. López^b
M.L. Maestro^a
S. Dexeus^a

^aSección de Biología Tumoral. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España. ^bServicio de Ginecología y Obstetricia. Fundación Santiago Dexeus Font. Barcelona. España.

Trabajo financiado por la Fundación Santiago Dexeus Font.

Correspondencia:

Dra. M.L. Maestro de las Casas.
Servicio Análisis Clínicos. Hospital Clínico San Carlos.
Martín Lagos, s/n. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: mmaestro@hcsc.es

Fecha de recepción: 27/1/03

Aceptado para su publicación: 4/3/03

Estudio de la inestabilidad microsatélite en tumores *borderline* y carcinoma de ovario

245

Microsatellite instability in borderline tumors and ovarian carcinoma

M. Vidaurreta, I. Almansa, M.T. Sanz, F. Tresserra, L. López, M.L. Maestro, S. Dexeus. Estudio de la inestabilidad microsatélite en tumores *borderline* y carcinoma de ovario.

RESUMEN

El objetivo de nuestro estudio es determinar la inestabilidad de tres microsatélites (BAT25, BAT26 y NME1) y observar si está implicada en el desarrollo de los tumores esporádicos de ovario. El trabajo se ha llevado a cabo en 40 pacientes intervenidas quirúrgicamente por tumor de ovario esporádico. La comprobación de la inestabilidad se realizó por comparación del tejido sano y tumoral de cada una de las pacientes. Sólo se encontró inestabilidad en 3 casos: en BAT26 en tumor *borderline*; en BAT25 en cistoadenocarcinoma de células claras, y en NME1 en cistoadenocarcinoma papilar seroso en diferentes pacientes. La inestabilidad microsatélite no parece estar implicada en la aparición o el desarrollo de los tumores esporádicos de ovario.

PALABRAS CLAVE

Inestabilidad. Microsatélite. Ovario. *Borderline*. Carcinoma.

SUMMARY

The aim of our study is instability's determination of three microsatellite (BAT25, BAT26 and NME1) and see if they are implicating in development of sporadic ovarian tumours. This study have been carrying out in 40 patients operated for sporadic ovarian tumour. The instability comprobation was realized for comparison between healthy tissue and tumour tissue of each patient. Was only found instability in 3 cases: in BAT26 in *borderline* tumour, in BAT25 in clear cells cystadenoma and instability in NME1 in papilar serous cystadenoma in diferents patients. The conclusion of this study is that microsatellite instability does not seem be implicated in apparition or development of sporadic ovarian tumours.

KEY WORDS

Instability. Microsatellite. Ovarian. *Borderline*. Carcinoma.

246 INTRODUCCIÓN

El cáncer de ovario representa el 4% de todos los cánceres en la mujer. En la actualidad es la primera causa de muerte por cáncer ginecológico y la quinta por cáncer en la mujer, por detrás del de mama, recto, colon y pulmón^{1,2}. Los tumores de ovario presentan una gran diversidad histopatológica y se clasifican en: tumores de ovario no epiteliales, con poca incidencia, y tumores de ovario epiteliales, que constituyen aproximadamente el 90% y tienen un comportamiento clínico similar³⁻⁵. Los tumores *borderline* son lesiones con características histopatológicas similares a los epiteliales, y se caracterizan por su bajo potencial maligno y un pronóstico favorable^{6,7}.

Clásicamente los factores pronósticos más importantes para predecir la evolución son el estadio, el tipo histológico, la masa residual poscirugía y el estado general de la enferma⁸⁻¹¹. En la mayoría de las series estudiadas la supervivencia a los 5 años se encuentra entre el 15 y el 35%, y ésta no ha mejorado de forma significativa en las últimas décadas¹²⁻¹⁴.

En la actualidad el cáncer se considera como una acumulación de alteraciones genéticas que afectan a diversos genes con distintas funciones celulares (oncogenes, genes supresores y genes reparadores), y es importante conocer si estas alteraciones identifican a pacientes con una evolución más agresiva¹⁵. En este sentido, las secuencias microsatélites se emplean para el estudio de alteraciones en genes reparadores. Son secuencias cortas de pares de bases repetidas en tándem, que se localizan en sitios relativamente constantes del genoma. Las alteraciones en estas secuencias microsatélites conllevan alteraciones en los genes en los que se encuentran, lo que se ha denominado inestabilidad de microsatélites. El proceso se inicia con la mutación de los genes reparadores y la aparición del fenotipo mutador que favorece la aparición del cáncer debido a un aumento en la frecuencia de mutaciones en oncogenes y genes supresores, claves para la adquisición del fenotipo tumoral o crecimiento incontrolado. Así, la inestabilidad de microsatélites sirve como indicador de la existencia de múltiples mutaciones.

El National Cancer Institute estableció los cinco microsatélites para el estudio de la inestabilidad microsatélite en el cáncer de colon: BAT25, BAT26,

D17S250, D5S346 y D2S123¹⁶, aunque Sood et al, en un estudio posterior, propusieron la utilización de un marcador adicional, NME1, para el cáncer de ovario¹⁷.

En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la inestabilidad de los microsatélites BAT25, BAT26 y NME1 en 40 pacientes con enfermedad ovárica (tumores benignos, *borderline* y carcinomas) comparando el tejido tumoral y el no tumoral de cada una de ellas.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes

La población objeto de nuestro estudio consta de 40 pacientes intervenidas quirúrgicamente por tumor de ovario esporádico. Se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes antes de la investigación, y este proyecto fue valorado de forma favorable por el comité de ética e investigación clínica de este hospital.

En el acto quirúrgico se extrajeron muestras de tejidos tumoral y no tumoral, que fueron embebidos en parafina hasta su posterior procesamiento. El diagnóstico fue confirmado por el análisis histopatológico de la pieza de resección por dos patólogos diferentes. Los tumores se distribuyeron histológicamente y según su grado de diferenciación¹⁸, y se estadiaron según la clasificación de Sobin et al¹⁹.

Método

Metodología analítica

Se ha estudiado la inestabilidad en tres microsatélites: BAT25, BAT26 y NME1. Para ello se ha extraído el ADN de las muestras tumoral y no tumoral eliminando primero la parafina con volúmenes de 400 µl de xileno y etanol al 95%. Posteriormente, el ADN se ha aislado por el método del fenol-cloroformo.

La amplificación de las distintas secuencias se ha llevado a cabo mediante *primers* disponibles secuenciados (TIB MOLBIOL, Roche). La mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estaba compuesta por 2 U de Taq polimerasa, 200 µM de

dNTP, 1-2 mM de $MgCl_2$, buffer de reacción y 350 nM de cada uno de los *primers*, en los que la secuencia con sentido era marcada con un fluorocromo para su posterior análisis. La PCR constaba de 25-35 ciclos (95 °C durante 30 s; 50-58 °C durante 30 s, dependiendo del *primer*, y 72 °C durante 30 s). Los productos amplificados fueron desnaturalizados para, posteriormente, ser analizados con el correspondiente marcador interno en un secuenciador *Abi Prims*. Se compararon las secuencias microsatélites de las muestras tumoral y no tumoral de manera conjunta.

Metodología estadística

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias, y las cuantitativas se resumen en su media, error estándar (EE), rango e intervalo de confianza (IC) del 95%. Se estimaron las funciones de supervivencia por el método de Kaplan-Meier. El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows, versión 7.0.

RESULTADOS

La población objeto de nuestro estudio constaba de 40 pacientes intervenidas quirúrgicamente de tumor de ovario: 23 tumores *borderline* (16 *borderline* seroso y siete *borderline* mucinoso), siete carcinomas (dos cistoadenocarcinomas papilares serosos, un cistoadenocarcinoma mucinoso, dos cistoadenocarcinomas endometrioides y dos cistoadenocarcinomas de células claras) y 10 tumores benignos.

Características de la población de pacientes con tumores *borderline*

La edad media de este grupo fue de 39,3 años, con un EE de 12,2 y un rango entre 21-71 años. La edad media de presentación de la menarquia fue de 13 años, con un EE de 1,6 y un rango entre 10 y 17 años. El 81% de las mujeres fueron premenopáusicas y el 43,5%, nulíparas.

De acuerdo con la estadificación de la FIGO, el 82,5% de los tumores se encontraban en estadio I y el 17,5%, en estadio III. El 88,9% de los tumores

eran bien diferenciados celularmente, el 11,1% eran indiferenciados y en 9 pacientes no se pudo determinar el grado de diferenciación. Ninguna de estas pacientes recibió tratamiento adyuvante posterior.

Durante el seguimiento no se diagnosticó ninguna recidiva tumoral y no falleció ninguna paciente. La mediana del tiempo de seguimiento es de 42 meses (3,5 años).

Características de la población de pacientes con carcinoma

La edad media de esta población fue de 50,2 años, con un EE de 10,4 y un rango entre 37 y 65 años. La edad media de la menarquia fue de 13 años, con un EE de 1 y un rango entre 11 y 14 años. El 33,3% de las mujeres eran premenopáusicas y el 66,7% posmenopáusicas. Todas las mujeres de este grupo tuvieron entre uno y cuatro embarazos.

La distribución de los tumores fue: un 85,7% en estadio I y un 14,3% en estadio III. De acuerdo con el grado de diferenciación el 57,1% era bien diferenciado y el 42,9% lo era moderadamente. En cuatro de las 7 pacientes se administró tratamiento de quimioterapia con cisplatino.

La mediana del tiempo de seguimiento en esta población fue de 13 meses y durante este seguimiento no se diagnosticó ninguna recidiva ni ningún fallecimiento.

Características de la población de pacientes con tumores benignos

La edad media de este grupo fue de 52,8 años, con un EE de 3,73 y un rango entre 48-60 años. La edad media de la presentación de la menarquia fue de 12 años, con EE de 1 y un rango entre 11 y 14 años. El 68% de las mujeres eran posmenopáusicas y el 20%, nulíparas.

Resultados del estudio de la inestabilidad de los tres microsatélites

En ninguna de las pacientes con tumores benignos se detectó inestabilidad en los tres microsatélites estudiados. En el análisis de la inestabilidad de los tres

248 microsatélites en la población de tumores *borderline* ésta se diagnosticó en una paciente, en BAT26. Las características clínicas de esta paciente son: edad 29 años, premenopáusica, menarquia a los 13 años de edad y nulípara. Histológicamente se trata de un tumor *borderline* seroso en estadio IA, cuyo grado de diferenciación celular no se pudo determinar.

En el grupo de pacientes con carcinoma ovárico se detectaron dos inestabilidades de microsatélites: una de ellas en BAT25 y otra en NME1, en distintas pacientes. Las características clínicas de la paciente con inestabilidad en BAT25 son: edad 56 años, posmenopáusica, menarquia a los 12 años de edad y cuatro embarazos. El carcinoma es un cistoadenocarcinoma de células claras moderadamente diferenciado y en estadio IC. La paciente con inestabilidad en el microsatélite NME1 tenía 45 años, era posmenopáusica, presentó la menarquia a los 11 años de edad y había tenido un embarazo. El tumor era un cistoadenocarcinoma papilar seroso moderadamente diferenciado y en estadio IC.

DISCUSIÓN

La inestabilidad de microsatélites está implicada en la patogenia de los carcinomas de colon, endometrio, ovario y estómago, que se desarrollan en el síndrome de Lynch o carcinoma colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC), y su causa es la alteración de los genes reparadores del ADN. Así, las células con mutaciones en estos genes no reparan de manera efectiva los fallos, que se acumulan durante la replicación.

Nuestro trabajo parte de la hipótesis de que el cáncer de ovario esporádico podría desarrollarse a partir de esta vía del fenotipo mutador, como en el caso del síndrome de HNPCC. No existe acuerdo en la bibliografía sobre la incidencia de la inestabilidad de microsatélites en el cáncer de ovario esporádico,

y ésta varía entre el 0 y el 27%²⁰⁻²³. Algunos autores sugieren que esta vía podría estar implicada en los tumores *borderline*; en este sentido, Tangir et al observaron inestabilidad en cinco tumores serosos de 18 tumores *borderline* analizados (2,7%) y sugirieron que la inactivación de los genes reparadores podrían implicarse en el desarrollo de un sustancial número de tumores *borderline* serosos²⁴.

En nuestro estudio se han analizado los tres microsatélites (BAT25, BAT26 y NME1) que Sood et al determinaron que presentaban mayor porcentaje de inestabilidad en los tumores de ovario. Hemos observado tres inestabilidades en tres tumores diferentes: *borderline* seroso (en BAT26), cistoadenocarcinoma de células claras (en BAT25) y cistoadenocarcinoma papilar seroso (en NME1). Por otro lado, no hemos hallado inestabilidad en los tumores benignos.

Nuestros resultados coinciden con los de la mayoría de los trabajos publicados. Así, Shih et al analizaron 69 marcadores en 23 tumores benignos y 31 *borderline*, y no observaron ninguna inestabilidad. Por otro lado, Gras et al estudiaron cinco microsatélites en 52 tumores de ovario y observaron inestabilidad de microsatélites en 2 carcinomas de los 52 tumores (3,8%). Por último, Iwabuchi et al analizaron 66 marcadores diferentes en 95 tumores de ovario, observando una inestabilidad de microsatélites del 6% (6/95). En 2001, Sood et al añadieron el microsatélite NME1 a los marcadores propuestos por el Nacional Cancer Institute para la determinación de la inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal, por ser más específico del ovario. En nuestro estudio hemos incluido este marcador y hemos observado únicamente inestabilidad en un tumor.

La inestabilidad de microsatélites no es una alteración frecuente en el desarrollo de los tumores esporádicos de ovario y tampoco observamos que el fenotipo mutador diferencie los tumores de bajo potencial maligno de los invasores.

BIBLIOGRAFÍA

- Phyllis A, Tony T, Sherry B. Cancer statistics. CA. Cancer J Clin 1995;45:8-30.
- Piver MS, Baker TR, Peidmonte M, Sandecki AM. Epidemiology and etiology of ovarian cancer. Semin Oncol 1991;18:177-85.
- Scully RE. Ovarian tumors. A review. Am J Pathol 1997;87:686.
- Scully RE, Seon SF, Sobin LH. Histologycal typing of ovarian tumors. Geneva: World Health Organization, 1973.
- Matias-Guin X, Prat J. Molecular pathology of ovarian carcinomas. Virchows Arch 1998;433:103-11.
- Prat J, De Nictolis M. Serous borderline tumors of the ovary: a long-term follow-up study of 137 cases including 18 with a micropapillary pattern and 20 with microinvasion. Am J Surg Pathol 2002;26:1111-28.
- Rusell P. Borderline tumors of the ovary: a conceptual dilemma. Clin Obstet Gynaecol 1984;11:254.
- Gallager HS. Pronostic importance of histologyc type in ovarian carcinoma. Natl Cancer Inst Monogr 1975;42:13-4.
- Day TG, Gallager HS, Rutledge FN. Epithelial carcinoma of the ovary: pronostic importance of histologic grade. Cancer Inst Monogr 1975;42:15-8.
- Redman J, Petroni G, Scrigo PE, Geller NL, Hakes TB. Prognostic factors in advanced ovarian carcinoma. J Clin Oncol 1986;4:515-23.
- Moss C, Kaye S. Ovarian Cancer progress and continuing controversies in management. Eur J Cancer 2002;38:1205-11.
- Van Houwelingen J, Ten Bokkel Huinink W, Van der Burg M, Van Oosterom AT, Neijt JP. Predictability of the survival of patient with advanced ovarian cancer. J Clin Oncol 1989;7:769-73.
- Friedlander ML, Dembo AJ. Prognostic factors in ovarian cancer. Semin Oncol 1991;18:205-12.
- Montella M, De Marco MR, Romeo F, Ventura R. Survival in ovarian cancers treated at National Cancer Institute in Naples Italy 1985-1990. Eur J Gynaecol Oncol 1993;14:249-54.
- Mendelsohn J, Howlei PM, Israel MA, Liotta LA. The molecular basis of cancer. Philadelphia: WB Saunders, 1995.
- 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;58:248-57.
- Sood AK, Holmes R, Hendrix MJC, Buller RE. Application of the National Cancer Institute Criteria for Determination of Microsatellite Instability in Ovarian Cancer. Cancer Res 2001;61:4371-4.
- Scully RE, Young RH, Clement PB. Atlas of tumor pathology. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube and broad ligament. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1998.
- Sobin LH, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumors. New York: Wiley-Liss, 2002.
- King BL, Carcangiu ML, Carter D, Kiechel M, Pfisterer J, Pfeiderer A, et al. Microsatellite instability in ovarian neoplasms. Br J Cancer 1995;72:376-82.
- Shih YC, Kerr J, Hurst TG, Khoo SK, Ward BG, Chenevix-Trench G. No evidence for microsatellite instability from allelotype analysis of benign and low malignant potential ovarian neoplasms. Gynecol Oncol 1998;69:210-3.
- Codegoni AM, Bertoni F, Colella G, Caspani G, Grassi L, D'Incalci M, et al. Microsatellite instability and frameshift mutations in genes involved in cell cycle progression or apoptosis in ovarian cancer. Oncol Res 1999;11:297-301.
- Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, Ma YY, Carcangiu ML, Pinkel D, et al. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. Cancer Res 1995;15:6172-80.
- Tangir J, Loughredge NS, Berkowitz RS, Muto MG, Bell DA, Welch WR, et al. Frequent microsatellite instability in epithelial borderline ovarian tumors. Cancer Res 1996;56:2501-5.