

ORIGINAL

## Estudio fenotípico de inestabilidad microsatelital en cáncer colorrectal. Correlación con parámetros histológicos y clínicos



Lilia Schmitz, Lucas Moretti, Lina Marino, Liliana Gimenez y Erica Rojas Bilbao\*

*Departamento de Patología, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo (IOAR), Universidad de Buenos Aires (UBA), Ciudad de Buenos Aires, Argentina*

Recibido el 24 de julio de 2013; aceptado el 7 de octubre de 2013

Disponible en Internet el 18 de septiembre de 2014

### PALABRAS CLAVE

Cáncer colorrectal;  
Inestabilidad  
microsatelital;  
Síndrome de Lynch

### KEYWORDS

Colorectal cancer;  
Microsatellital  
instability;  
Lynch Syndrome

**Resumen** La detección de proteínas de reparación del ADN por inmunohistoquímica (IHQ) ha demostrado ser útil para determinar inestabilidad de microsatélites (IM). Las guías de Bethesda revisadas y el MsPath Score permiten detectar pacientes de alto riesgo. Se analizaron criterios histológicos sugestivos de IM en 115 pacientes con cáncer colorrectal (CCR). Se efectuó el MsPath Score e IHQ para la demostración de proteínas de reparación del ADN (MMR): MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. La distribución por sexos fue de 66 varones y 49 mujeres, con un rango etario de 16 a 78 años. Cincuenta y tres casos tuvieron rasgos morfológicos de IM: linfocitos intraepiteliales ( $n=31$ ), infiltrados tipo Crohn ( $n=17$ ), morfología mucinosa/células en anillo de sello ( $n=32$ ) y/o pobre diferenciación ( $n=12$ ) en forma simultánea o aisladamente. Se observó patrón aberrante para MMR en 16 casos: ausencia de expresión de MLH1/PMS2 ( $n=11$ ), MSH2/MSH6 ( $n=3$ ), MLH1 ( $n=1$ ) y PMS2 ( $n=1$ ). Los adenocarcinomas con rasgos morfológicos convencionales no mostraron alteraciones en las MMR ( $n=62$ ).

© 2013 SEAP y SEC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Immunohistochemical study of microsatellite instability in colorectal cancer. Correlation with histological and clinical parameters

**Abstract** The detection of mismatch repair proteins (MMR) by immunohistochemistry (IHC) is a useful tool in the identification of microsatellital instability (MI). The revised Bethesda guidelines and MsPath score allow the detection of patients at high-risk for MI. We studied 115 patients with colorectal cancer (CRC) and evaluated the histological criteria of MI. Detection of MMR: MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 were analyzed by IHC. Sixty-six male and 49 female patients (age

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [ericarbilbao.2008@yahoo.com.ar](mailto:ericarbilbao.2008@yahoo.com.ar) (E. Rojas Bilbao).

range 16-78). Histological picture of MI was observed in 53 cases: intraepithelial lymphocytosis (n = 31), Crohn like infiltrates (n = 17), mucinous or ringed cell histology (n = 32) and/or poorly differentiated histology (n = 12). Aberrant immunostaining pattern of MMR was observed in 16 cases: negative MLH1/PMS2 (n = 11), negative MSH2/MSH6 (n = 3), negative MLH1 (n = 1) and negative PMS2 (n = 1). The 62 cases with conventional histology had normal immunostaining. Conventional histology (n = 62) did not show any alterations in MMR.

© 2013 SEAP y SEC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) representa en Argentina la tercera causa por muerte luego del cáncer de próstata y mama, según registros del Instituto Nacional del Cáncer (INC). Puede presentarse como formas esporádicas o asociadas a síndrome de Lynch (CCR hereditario no polipósico) en el cual se observan mutaciones en genes que codifican proteínas de reparación de errores de apareamiento de nucleótidos, lo cual determina el estatus de inestabilidad de microsatélites (IM). Los estudios moleculares del CCR muestran que el 10-15% de los casos tienen IM<sup>1</sup>. La mayoría de los casos ocurren como consecuencia de la metilación esporádica de hMLH1 (95-97%); sin embargo, en el síndrome de Lynch ocurren por mutaciones en la línea germinal (1-3%)<sup>2</sup>, afectándose uno solo de los alelos, con retención de la capacidad de reparación del ADN en las células no tumorales y pérdida de la misma en las células neoplásicas (estado de inestabilidad genómica)<sup>3</sup>.

A pesar de que la historia familiar y las características clinicopatológicas pueden ser sugestivas de cáncer hereditario no polipósico, un gran número de familias escapan de la detección, por lo cual se sugiere el estudio de IM como técnica de rutina, a través de la inmunohistoquímica (IHQ), no solo para la identificación de síndrome de Lynch, sino para la detección de pacientes inestables genéticamente y con respuestas predictivas diferentes frente al 5-fluorouracilo<sup>4,5</sup>. Además resulta ser un método sencillo, útil, económico y permite seleccionar el gen afectado para su posterior secuenciación. Otros trabajos similares en Argentina mostraron que la IHQ fue concluyente en el 97,6% de los casos y altamente sensible y específica para detectar IM, y en los pacientes con Lynch según criterios de Amsterdam la IHQ permite limitar los estudios de secuenciación al gen correspondiente<sup>6</sup>.

Actualmente, la recomendación más aceptada para la detección clínica de casos es el empleo de las guías de Bethesda revisadas<sup>7</sup>. Diferentes estudios han sugerido que el CCR con IM posee rasgos histológicos que difieren de los no-IM<sup>8</sup>.

El MsPath score es un sistema que emplea 6 parámetros independientes predictores de IM, incluyendo la edad al diagnóstico y el sitio anatómico, y asigna un coeficiente a cada uno de ellos. La suma de estos coeficientes determina un valor que, trasladado a una escala de conversión, informa de la probabilidad estimada que tiene el tumor de presentar IM (tabla 1)<sup>4</sup>.

En este trabajo se examinó la utilidad de la IHQ en CCR con el fin de identificar pacientes con riesgo de padecer síndrome de Lynch y pacientes con CCR portadores de IM,

considerando para ello los hallazgos de la IHQ y clinicopatológicos comprendidos en el MsPath Score de Jenkins.

## Materiales y métodos

Se estudiaron 115 pacientes del Instituto de Oncología Ángel Roffo de la Universidad de Buenos Aires en un período comprendido entre el 1 de enero de 2010 y el 1 de mayo de 2013. Se realizó la revisión histológica institucional de piezas quirúrgicas y material de consulta con diagnóstico de CCR infiltrante. Se excluyeron las biopsias endoscópicas debido a la imposibilidad de realizar el MsPath Score en las mismas. En todos los casos analizados se evaluaron si poseían o no criterios histológicos sugestivos de IM (subtipo histológico, linfocitos intraepiteliales, infiltrado inflamatorio tipo Crohn, grado histológico, sitio anatómico). En todos los pacientes se aplicó el MsPath Score y se realizaron técnicas de IHQ para la demostración de proteínas de reparación del ADN: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 (Leyca Biosystems-Novocastra Mismatch Repair Protein). La interpretación de la misma se realizó de la siguiente manera: se consideró *presencia de expresión* en los pacientes que presentaron positividad nuclear convincente en al menos algunas de las células neoplásicas;

**Tabla 1** Score anatomopatológico de inestabilidad microsatelital (MsPath Score) y escala de conversión

| Figuras patológicas                        | Coeficiente |
|--------------------------------------------|-------------|
| <i>Edad al diagnóstico</i>                 |             |
| < 50 años                                  | 0,7         |
| 50 años o más                              | 0,0         |
| <i>Sitio anatómico</i>                     |             |
| Ciego, colon ascendente o transverso       | 1,6         |
| Descendente, sigma o recto                 | 0,0         |
| <i>Tipo histológico</i>                    |             |
| Mucinoso, anillo de sello o indiferenciado | 1,1         |
| Adenocarcinoma                             | 0,0         |
| <i>Grado</i>                               |             |
| Poco diferenciado (G3)                     | 0,6         |
| Moderado o bien diferenciado               | 0,0         |
| <i>Reacción tipo Crohn</i>                 |             |
| Presente                                   | 0,5         |
| Ausente                                    | 0,0         |
| <i>Linfocitos infiltrando tumor</i>        |             |
| Presente                                   | 2,1         |
| Ausente                                    | 0,0         |

**Tabla 2** Casos con ausencia de proteínas de reparación (16/115)

| Caso | Derecho     | Lies | Crohn | Muc./Anillo | G3 | Edad | Sexo | Proteínas alteradas | Probabilidad de IM |
|------|-------------|------|-------|-------------|----|------|------|---------------------|--------------------|
| 1    | x           | x    | –     | x           | x  | 70   | M    | MLH1/PMS2           | 60                 |
| 2    | x           | x    | –     | x           | –  | 46   | M    | MLH1/PMS2           | 65                 |
| 3    | x           | x    | –     | –           | –  | 18   | M    | MSH2/MSH6           | 50-60              |
| 4    | x           | x    | –     | x           | –  | 48   | M    | MLH1/PMS2           | 50-60              |
| 5    | x (transv.) | x    | x     | –           | x  | 41   | F    | MLH1/PMS2           | 50-60              |
| 6    | x           | –    | –     | x           | –  | 78   | M    | MLH1/PMS2           | 40-50              |
| 7    | –           | x    | x     | x           | –  | 77   | F    | MLH1/PMS2           | 15-20              |
| 8    | x           | x    | x     | x           | –  | 68   | M    | MLH1/PMS2           | 40                 |
| 9    | x           | x    | x     | x           | –  | 27   | F    | PMS2                | 80%                |
| 10   | –           | x    | –     | x           | –  | 40   | M    | MSH2/MSH6           | 30-40%             |
| 11   | x (transv.) | x    | –     | –           | –  | 32   | M    | MLH1                | 20-30%             |
| 12   | –           | x    | –     | x           | –  | 45   | M    | MLH1/PMS2           | 40                 |
| 13   | x           | x    | x     | –           | x  | 49   | M    | MSH2/MSH6           | 80                 |
| 14   | x (transv.) | x    | –     | x           | –  | 78   | F    | MLH1/PMS2           | 60-70              |
| 15   | x           | x    | x     | x           | x  | 71   | F    | MLH1/PMS2           | 80-90              |
| 16   | x           | x    | x     | x           | –  | 78   | F    | MLH1/PMS2           | 70                 |

*ausencia de expresión* en los pacientes que mostraron ausencia de tinción nuclear en las células neoplásicas, y *tinción débil* en los casos en los que la marcación nuclear de las células tumorales fue más débil que las células del control interno. Se utilizaron como controles positivos de calidad de tejido la presencia de marcación positiva nuclear en las células epiteliales normales de la mucosa colónica, células estromales y linfocitos peritumorales. Se clasificaron como «no evaluables» los casos en los cuales el control interno fue negativo.

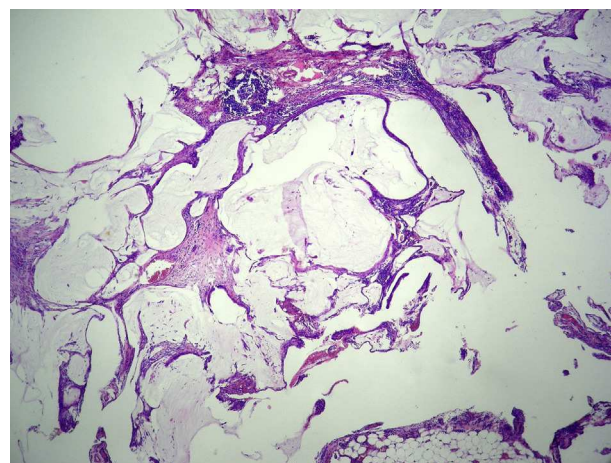
Los parámetros histológicos fueron analizados de acuerdo con los siguientes criterios<sup>6</sup>:

- *Linfocitos intraepiteliales (LIEs)*: 5 linfocitos intraepiteliales en al menos un campo de alto poder, habiendo examinado por lo menos 10 campos.
- *Respuesta linfoide tipo Crohn*: se consideró un mínimo de 4 agregados linfoides por sección en el margen invasivo del tumor en un campo de bajo aumento.
- *Diferenciación mucinosa*: más del 50% de tumor con presencia de mucina extracelular.
- *Anillo de sello*: más del 50% del tumor con presencia de células con mucina intracelular y núcleos excéntricos<sup>9,10</sup>.

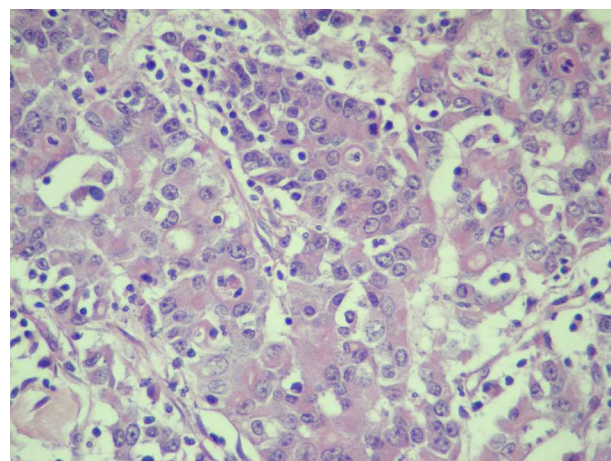
## Resultados

De los 115 pacientes estudiados, 66 fueron varones y 49 mujeres, con una edad promedio de 57 años (rango etario: 16-78). Del análisis de los resultados obtenidos empleando los criterios histológicos propuestos en el MsPath Score se evidenciaron rasgos morfológicos sugestivos de IM en 53/115 (46%), siendo los mismos: incremento de los linfocitos intraepiteliales (n = 31), infiltrados tipo Crohn (n = 17) y morfología mucinosa o con células en anillo de sello (n = 32) (figs. 1 y 2) o pobremente diferenciados (n = 12).

En 16 de ellos se observó un patrón de inmunomarcación anormal para proteínas de reparación del ADN (13%), con ausencia de expresión de MLH1/PMS2 en 11 casos, de MSH2/MSH6 en 3 casos, de MLH1/MSH2 en un caso (figs. 3 y 4)



**Figura 1** HE 40×. Adenocarcinoma mucinoso.



**Figura 2** HE 400×. Adenocarcinoma con elevado número de linfocitos intraepiteliales.

**Tabla 3** Casos con características histológicas sugestivas de inestabilidad microsatelital pero con patrón inmunohistoquímico normal

| Caso | Derecho | Lies | Crohn | Muc./Anillo | G3 | Patron IHQ | Edad | Sexo |
|------|---------|------|-------|-------------|----|------------|------|------|
| 1    | -       | x    | -     | -           | -  | Normal     | 36   | M    |
| 2    | -       | -    | x     | x           | -  | Normal     | 70   | M    |
| 3    | -       | x    | -     | x           |    | Normal     | 40   | F    |
| 4    | -       | x    | x     |             |    | Normal     | 88   | F    |
| 5    | -       | x    | -     | x           |    | Normal     | 44   | F    |
| 6    | -       | x    | -     |             |    | Normal     | 88   | F    |
| 7    | x       | -    | -     |             | x  | Normal     | 59   | M    |
| 8    | -       | x    | -     |             |    | Normal     | 51   | M    |
| 9    | -       | x    | -     |             |    | Normal     | 63   | M    |
| 10   | x       | -    | -     | x           |    | Normal     | 61   | M    |
| 11   | x       | -    | -     | x           |    | Normal     | 52   | M    |
| 12   | -       | -    | -     |             | x  | Normal     | 77   | M    |
| 13   | x       | -    | -     | x           | x  | Normal     | 74   | M    |
| 14   | -       | -    | -     | x           | -  | Normal     | 66   | F    |
| 15   | -       | x    | -     | x           | -  | Normal     | 72   | F    |
| 16   | -       | x    | -     |             | -  | Normal     | 62   | M    |
| 17   | -       | -    | x     |             | -  | Normal     | 56   | M    |
| 18   | -       | -    | x     |             | -  | Normal     | 47   | M    |
| 19   | -       | x    | -     |             | -  | Normal     | 68   | M    |
| 20   | -       | -    | x     |             | -  | Normal     | 71   | M    |
| 21   | -       | -    | -     | x           | -  | Normal     | 40   | F    |
| 22   | x       | -    | -     | x           | -  | Normal     | 65   | M    |
| 23   | -       | -    | -     | x           | -  | Normal     | 52   | F    |
| 24   | -       | x    | -     | x           | -  | Normal     | 56   | M    |
| 25   | x       | -    | -     | x           | -  | Normal     | 60   | M    |
| 26   | -       | x    | -     |             | x  | Normal     | 61   | M    |
| 27   | x       | -    | -     |             | x  | Normal     | 67   | F    |
| 28   | x       | -    | x     |             | -  | Normal     | 65   | F    |
| 29   | -       | x    | -     | x           | -  | Normal     | 38   | M    |
| 30   | -       | x    | -     | x           | -  | Normal     | 59   | F    |
| 31   | -       | x    | -     | x           | -  | Normal     | 52   | M    |
| 32   | -       | -    | x     |             | -  | Normal     | 65   | F    |
| 33   | x       | x    | -     | x           | -  | Normal     | 47   | M    |
| 34   | -       | -    | -     | x           | -  | Normal     | 55   | F    |
| 35   | x       | x    | -     | x           | -  | Normal     | 46   | F    |
| 36   | -       | -    | -     | x           | -  | Normal     | 80   | M    |
| 37   | -       | x    | -     |             | x  | Normal     | 41   | F    |

de PMS2 en un caso (tabla 2). Todos estos casos revelaron algún cambio histológico descrito como sugestivo de IM: infiltrado tipo Crohn, histología poco diferenciada, componente mucinoso o aumento de linfocitos intraepiteliales. En estos pacientes, la probabilidad de IM estimada según el MsPath Score fue mayor del 15%, con una media del 35-40%. Los restantes 37 casos presentaron un patrón de IHQ normal (tabla 3).

Hubo 62 casos que no exhibieron alteraciones histológicas sugestivas de IM y tuvieron un patrón de expresión normal de MMR. En 8 de estos pacientes la probabilidad de IM estimada fue elevada (> 10%).

## Discusión

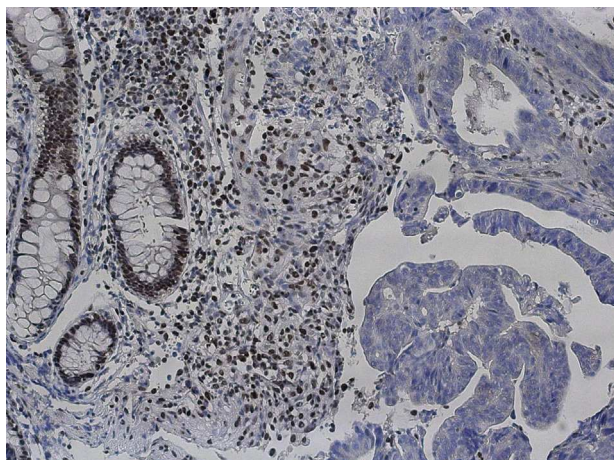
En este trabajo se correlacionó el CCR con la determinación de proteínas de reparación del ADN por IHQ y las

características histopatológicas enunciadas en el MsPath Score, obteniéndose en esta pequeña serie una concordancia significativa entre la histología de rutina (características histológicas sugestivas de IM) y la inmunomarcación (ausencia de expresión nuclear de proteínas).

El 16% de los casos estudiados presentaron un patrón aberrante de tinción IHQ para MMR, valor similar al encontrado en otros trabajos publicados en la literatura<sup>11,12</sup>. Sin embargo, la morfología señala un porcentaje superior de pacientes, lo cual podría obedecer a características poblacionales diferentes que requieren correlación con el resto de los parámetros clínicos y evolutivos.

Todos los casos con ausencia de expresión de alguna de las MMR mostraron alguna alteración histológica sugestiva de inestabilidad (infiltrado tipo Crohn, histología poco diferenciada, componente mucinoso o aumento de linfocitos intraepiteliales), de las cuales el rasgo más frecuentemente





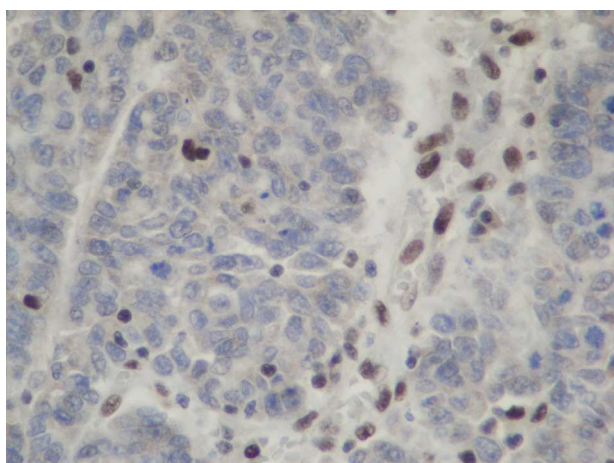
**Figura 3** MLH1 100×. Ausencia de expresión en células neoplásicas. Control interno positivo.

presentado fue el componente mucinoso y el incremento en el número de linfocitos intraepiteliales.

Los pacientes con inmunofenotipo de IM tuvieron un MsPath Score mayor del 15%, con un promedio del 35-40%.

La cuantificación del componente mucinoso fue dificultosa en los casos de consulta, debido a la subestimación del mismo, por remitirse un único taco a la consulta anatómopatológica. En estos casos solo se realizó una cuantificación porcentual aproximada. Sería útil considerar en el futuro cualquier grado de diferenciación mucinosa y/o presencia de anillo de sello en la elaboración de la puntuación de IM, ya que la definición actual de adenocarcinoma mucinoso podría no tener significado biológico a la luz de los hallazgos moleculares<sup>13</sup>.

Encontramos 8 casos discordantes con una probabilidad alta de IM calculada según el MsPath Score, pero con presencia de expresión de proteínas de reparación del ADN. Consideramos que en casos discordantes deben realizarse otros test de mutación para descartar IM. Esta discrepancia podría obedecer a la expresión de proteínas no



**Figura 4** MSH2 400×. Ausencia de expresión de la proteína en un adenocarcinoma mucinoso. Control interno positivo en células estromales y linfocitos.

funcionantes, independientemente de la alteración genética subyacente.

No encontramos dificultades significativas en la evaluación de la IHQ, excepto un paciente con un patrón de marcación débil de la proteína PMS2 y alta probabilidad de IM (15-20%) a través del MsPath Score. La utilización de las técnicas de IHQ fue reproducible, de fácil interpretación y sin variabilidad interobservador, al momento de identificar pacientes fenotípicamente inestables.

Los resultados obtenidos con el análisis de rutina e IHQ en pacientes con CCR permiten seleccionar grupos susceptibles a estudio genético más exhaustivo y/o de secuenciación.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

## Bibliografía

1. Söreide K, Janssen EA, Söiland H, Körner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2006;93:395-406.
2. Jover R, Payá A, Alenda C, Poveda MJ, Peiró G, Aranda FI, et al. Defective mismatch-repair colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2004;122:389-94.
3. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle F A., Rüschhoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:261-8.
4. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, et al. Pathology features in Bethesda Guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: A population-based study. *Gastroenterology*. 2007;133:48-56.
5. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999;116:1453-6.
6. Church J, McGannon E. Family history of colorectal cancer: How often and how accurately is it recorded? *Dis Colon Rectum*. 2000;43:1540-4.
7. Vaccaro C, Carrozzo J, Mocetti E, Berho M, Valdemoros M, Mullen E, et al. Expresión inmunohistoquímica e inestabilidad microsatelital en el síndrome de Lynch. *Medicina (B Aires)*. 2007;67:274-8.

8. Ruo L, Cellini C, La-Calle Jr JP, Murray M, Thaler HT, Quan SH, et al. Limitations of family cancer history assessment at initial surgical consultation. *Dis Colon Rectum*. 2001;44:98–103.
9. Percesepe A, Anti M, Roncucci L, Armelao F, Marra G, Pahor M, et al. The effect of family size on estimates of the frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1995;72:1320–3.
10. Ponz de Leon M. Prevalence of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC). *Ann Med*. 1994;26:209–14.
11. Heald B, Plesec T, Liu X, Pai R, Patil D, Moline J, et al. Implementation of universal microsatellite instability and immunohistochemistry screening for diagnosing Lynch syndrome in a large academic medical center. *J Clin Oncol*. 2013;31:1336–40.
12. Steinhagen E, Shia J, Markowitz AJ, Stardler ZK, Salo-Mullen EE, Zheng J, et al. Systematic immunohistochemistry screening for Lynch syndrome in early age of onset colorectal cancer patients undergoing surgical resection. *J Am Coll Surg*. 2012;214:61–7.
13. Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, et al. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:126–33.