



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

"FRECUENCIA DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES DETERMINADA POR MARCADORES DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO PROCESADO DE BIOPSIAS Y PIEZAS QUIRÚRGICAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA COLORRECTAL"

TÉSIS:

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

PRESENTA:

DR. RICARDO FIERROS PALACIOS

ASESOR DE TESIS:

DRA. SARA PARRAGUIRRE MARTÍNEZ

Jefe de la División y Profesor titular del Curso de Anatomía Patológica.

Ciudad de México, febrero de 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

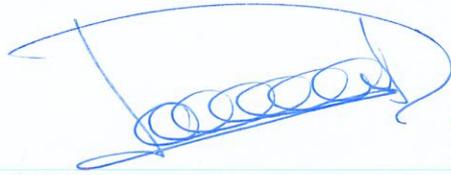
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

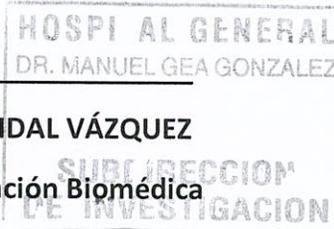
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

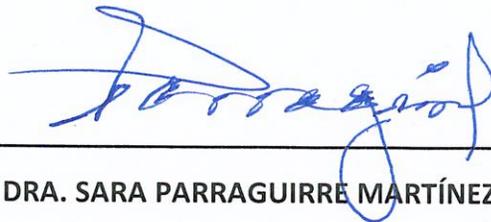
AUTORIZACIONES



DRA. LORENA HERNÁNDEZ DELGADO
Director de la Dirección de Enseñanza e Investigación



DRA. ROSA PATRICIA VIDAL VÁZQUEZ
Subdirector de Investigación Biomédica



DRA. SARA PARRAGUIRRE MARTÍNEZ
Jefe de la División y Profesor titular del Curso de Anatomía Patológica.
Asesor de tesis

Este trabajo de tesis con número de registro: **01-57-2023** presentado por el **Dr. Ricardo Fierros Palacios** y se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la tesis **Dra. Sara Parraguirre Martínez** con fecha **AGOSTO, 2023** para su impresión final.



DRA. ROSA PATRICIA VIDAL VÁZQUEZ
Subdirector de Investigación Biomédica

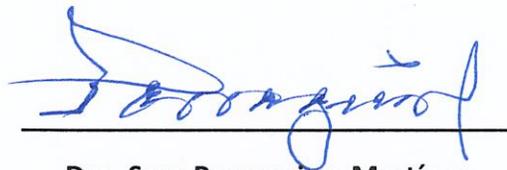


DRA. SARA PARRAGUIRRE MARTÍNEZ
Investigador Principal

“FRECUENCIA DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES DETERMINADA POR MARCADORES DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO PROCESADO DE BIOPSIAS Y PIEZAS QUIRÚRGICAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA COLORRECTAL”

Este trabajo fue realizado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en la División de Anatomía Patológica bajo la dirección de la Dra. Sara Parraguirre Martínez con el apoyo del histotecnólogo Héctor Trinidad Bibiano quienes orientaron y aportaron a la conclusión de este trabajo.

COLABORADORES:



Dra. Sara Parraguirre Martínez

Investigador Principal



Dr. Ricardo Fierros Palacios

Investigador Asociado Principal

AGRADECIMIENTOS

“En primer lugar agradezco a mis padres que siempre me han brindado su apoyo y ejemplo”

“A mi tutor le agradezco su dedicación y paciencia, gracias por guiarme y orientarme en el camino profesional”

Índice

Contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
OBJETIVO GENERAL.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS	11
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN.....	14
REFERENCIAS.....	16
TABLAS E IMÁGENES.....	21

Resumen

Introducción: El carcinoma colorrectal representa el cuarto cáncer más común y es la tercera causa de muerte en ambos sexos a nivel mundial, cerca del 85% son adenocarcinomas esporádicos, de estos cerca del 10 al 20% muestran inestabilidad de microsatélites de forma adquirida y solo el 5% se asocian a mutaciones hereditarias. El tratamiento oncológico de estos pacientes se ha ido personalizando cada vez más, por lo que el reporte del estudio de las piezas quirúrgicas o bien de las biopsias, se ha modificado con el tiempo, y se recomienda la realización de estudios de inmunohistoquímica con la finalidad de detectar inestabilidad de microsatélites de forma rutinaria, por lo que en este estudio se llevó a cabo la realización de pruebas de inmunohistoquímica en el tejido de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal para detectar la frecuencia de inestabilidad de microsatélites que tiene una repercusión directa sobre el pronóstico y tratamiento de los pacientes.

Objetivo general: Reportar la frecuencia de inestabilidad de microsatélites, determinada por marcadores de inmunohistoquímica en tejido procesado de biopsias y piezas quirúrgicas, provenientes de pacientes con adenocarcinoma colorrectal, registrados en un periodo de cinco años que comprende del 1 de enero del 2018 al 31 de diciembre del 2022 en el Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Resumen de material y métodos: El estudio se realizó recabando la información de los pacientes registrados en las libretas del servicio de anatomía patológica con el diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal, aplicando los criterios de selección y obtenida la muestra, se realizó inmunohistoquímica a todos los casos que no tuvieran reporte de microsatélites, se utilizaron cuatro inmunomarcadores por paciente, los inmunomarcadores solicitados fueron MHL1, PSM2, MSH2 y MSH6; una vez obtenidas las laminillas se procedió a realizar la revisión por los investigadores, se valoró la expresión nuclear de los cuatro marcadores y la información obtenida fue recabada en una base de datos en Excel, y se realizó la interpretación de los resultados obtenidos.

Descripción de los resultados: De una total de 94 pacientes se obtuvo una muestra total de 37 casos, de los cuales la edad media fue de 60 años, con una predilección por el sexo femenino representando el 54% de los casos, la mayoría de los casos fueron reportados como adenocarcinomas moderadamente diferenciados en un 68%, de estos solo se detectó a un paciente masculino de 43 años de edad, que tenía el diagnóstico de adenocarcinoma moderadamente diferenciado, que mostró alteraciones en los inmunomarcadores solicitados, este paciente presentó pérdida de expresión de PSM2, MSH2 y MSH6, con expresión intacta de MLH1, este patrón de pérdida de expresión es inusual, sin embargo, se tiene alta sospecha de inestabilidad de microsatélites, por la pérdida de expresión sola de PMS2 con MLH1 retenida con expresión nuclear, y la pérdida de MSH2 y MSH6 son altamente sugestivos de síndrome de Lynch, el siguiente paso sería, la realización de pruebas genéticas que ayuden a descartar o confirmar este síndrome.

Conclusiones: La frecuencia de la inestabilidad de microsatélites determinada por inmunohistoquímica es baja, sin embargo en este estudio se estimó una frecuencia del 3%, con solo un caso de inestabilidad, este porcentaje se correlaciona con los estudios realizados en otros países que han reportado inestabilidad de microsatélites en hasta el 20% de los casos; se obtuvo una muestra pequeña debido a que los pacientes fueron enviados a otros centros hospitalarios, por lo que no se tuvieron bloques de parafina, para la realización de inmunohistoquímica, lo que fue una gran limitante para este estudio. Tomando en cuenta estos datos, concluimos que la realización de pruebas de inmunohistoquímica para la detección de la frecuencia de inestabilidad de microsatélites en el Hospital General Dr. Manuel Gea González en un lapso de 5 años fue baja, de solo el 3%, considerando que no ha todos los pacientes se les logró realizar dicha valoración podríamos estar subestimando dicha cifra.

Palabras clave: Microsatélites, inestabilidad, Adenocarcinoma, Inmunohistoquímica, Frecuencia.

Introducción.

Antecedentes

El carcinoma colorrectal es definido como un tumor maligno epitelial derivado del crecimiento incontrolado de células anormales, que se origina de la mucosa del colón o recto, producto de mutaciones que ocurren en el genoma de una sola célula y que muestra una diferenciación glandular o mucinosa. (1) Representa el cuarto cáncer más común y es la tercera causa de muerte en ambos sexos a nivel mundial. (1) Los cánceres esporádicos representan hasta el 85% de los casos, de estos cerca del 10 al 20% muestran inestabilidad de microsatélites de forma adquirida, como consecuencia de una alteración epigenética y solo el 5% de los carcinomas colorrectales son resultado de mutaciones hereditarias que se pueden presentar en diferentes genes como APC y TP53, o en vías de señalización como KRAS, BRAF y PIK3CA. (2-6) Se ha estimado, una probabilidad en la población general de desarrollar carcinoma colorrectal, en alrededor del 4 al 5%; siendo la edad, el principal factor de riesgo, dado que después de la quinta década de la vida, el riesgo de desarrollar carcinoma colorrectal aumenta notablemente, mientras que el desarrollo de carcinoma colorrectal por debajo de los cincuenta años se considera raro y son los carcinomas que frecuentemente se encuentran asociados a cánceres hereditarios. (7) A nivel molecular podemos agrupar los carcinomas colorrectales en aquellos que presentan inestabilidad cromosómica y los que presentan inestabilidad de microsatélites; (8) Los microsatélites se definen como secuencias cortas (que van de uno a cuatro nucleótidos) y repetitivas en regiones no codificantes del ADN; Estas secuencias son susceptibles de errores durante la replicación del ADN en la división celular, por lo que las células lábiles son las más afectadas, como las del epitelio de mucosa colónica y rectal. (2) Se considera inestabilidad de microsatélites cuando estas secuencias sufren un acortamiento o un alargamiento (por inserciones o deleciones de nucleótidos); el mecanismo por el que se presentan y acumulan estos errores en el ADN, es por una alteración o disfunción de las enzimas codificadas por uno

de los varios genes implicados en la reparación de malos apareamientos del ADN (MMR), siendo los genes más afectados MLH1 y MSH2; La inactivación de estos genes provoca la acumulación de errores en el ADN que se pueden repetir de docenas a cientos de veces dentro del genoma. Los errores de replicación se consideran el sello biológico del síndrome de Lynch cuando las mutaciones se presentan en la línea germinal (encontrándose en el ADN de células somáticas), de igual forma, se puede identificar inestabilidad de microsatélites en el ADN tumoral de los carcinomas esporádicos. (1,3,4,9,10) El diagnóstico de carcinoma colorrectal se realiza mediante el estudio anatómico patológico de biopsias o piezas quirúrgicas producto de resecciones colónicas donde las características histológicas de una neoplasia epitelial maligna con invasión a la pared colónica por un patrón infiltrante apoyan el diagnóstico. Sin embargo, en la actualidad se requieren de más parámetros en el reporte anatómico patológico que influyen en la tipificación de la neoplasia, con impacto en la decisión terapéutica y en el pronóstico de los pacientes, como en el caso de la inestabilidad de microsatélites, que se ha visto asociado a un mejor pronóstico, dado que los microsatélites inestables son altamente inmunogénicos, por lo que la terapia que activa el sistema inmunológico puede tener efectos muy prometedores en tumores con microsatélites inestables. (5,11) Por lo anterior algunas publicaciones sugieren el screening de inestabilidad de microsatélites a todos los carcinomas colorrectales, con la finalidad de identificar alteraciones en las líneas germinales (Síndrome de Lynch) y también identificar a los carcinomas esporádicos que presentan inestabilidad de microsatélites, y que esto sea parte del procesamiento rutinario del servicio de anatomía patológica y parte importante en el reporte de biopsias y piezas quirúrgicas, porque a pesar, de aplicar los criterios clínicos, cerca del 69% de los casos de síndrome de Lynch pueden no ser diagnosticados; (3,12,13,14,15) tomando en cuenta que esta entidad se asocia con muchos otros tipos de carcinomas en otros órganos como estómago, endometrio, vías biliares, páncreas, vejiga, uréter, riñón, ovarios, sistema nervioso central y glándulas sebáceas, es de suma importancia realizar el diagnóstico con fines preventivos. (16) Se ha visto que muchas veces el carcinoma colorrectal no es el cáncer centinela, en particular entre las mujeres, donde el primer cáncer suele ser el de endometrio. (17) Para la detección

de inestabilidad de microsatélites se utiliza el análisis del sistema de reparación de malos apareamientos del ADN por medio de inmunohistoquímica o bien por amplificación de bases en PCR. (4) Por medio de la inmunohistoquímica, que tiene la ventaja de ser barato y de fácil acceso para los patólogos, se puede detectar la pérdida de expresión de una o más proteínas del sistema de reparación de malos apareamientos del ADN, en este método los anticuerpos contra las proteínas de malos apareamientos del ADN son MLH1, MSH2, PMS2 y MSH6 que arrojan información sobre la funcionalidad del sistema. El análisis con los anticuerpos MSH6 y PMS2 tiene un mayor potencial diagnóstico que el análisis con los anticuerpos MLH1 y MSH2. (4,18) Al evaluar las reacciones de inmunohistoquímica de las proteínas del complejo de malos apareamientos del ADN en tejidos normales se ve una reacción nuclear, que generalmente es uniforme, pero puede ser de intensidad variable, y tiende a ser de mayor intensidad en las células con rápida proliferación, se consideran controles internos, las células del epitelio de la mucosa colónica no afectada, los fibroblastos y los linfocitos; en las células cancerosas, que se caracterizan por una tasa de proliferación elevada en comparación con el resto del tejido, la intensidad de la tinción suele ser fuerte. Cuando existe un defecto en las proteínas de malos apareamientos del ADN existe pérdida de expresión de una o más de las proteínas. Las cuatro proteínas principales se presentan como heterodímeros, donde MLH1 se empareja con PMS2 y MSH2 con MSH6, es decir mientras que MLH1 y MSH2 pueden estabilizarse en la célula formando heterodímeros con otras proteínas, PMS2 y MSH6 solo pueden existir de manera estable en la célula en presencia de MLH1 y MSH2 respectivamente. Por lo que a grandes rasgos pueden existir cuatro patrones anormales típicos en la valoración de la inmunohistoquímica de las proteínas de malos apareamientos del ADN, estos son: La pérdida de MLH1 y PSM2 por pérdida de MLH1; Pérdida de MSH2 y MSH6 por pérdida de MSH2; Pérdida de MSH6 por pérdida de MSH6; y pérdida de PMS2 por pérdida de PSM2. Se debe de tomar en cuenta que existen algunos puntos necesarios para poder realizar una adecuada valoración de la inmunohistoquímica de estas proteínas, el primero es que el tejido debe de encontrarse bien fijado, es decir hay que evitar evaluar las áreas con pobre fijación. En el caso de que exista una expresión débil y focal con un control

interno fuerte y difuso debe anotarse e informarse como defectuoso o en su caso repetir la tinción en una sección diferente. Se considera expresión subclonal cuando existe una pérdida focal de la expresión; para identificarla y distinguirla de la expresión variable como consecuencia de un artefacto de fijación, se debe observar una tinción normal en el control interno en la zona de pérdida de expresión en las células tumorales, se cree que la expresión subclonal ocurre como un defecto adquirido. La expresión punteada a nivel nuclear en MLH1 puede ser interpretada erróneamente como expresión retenida o normal, sin embargo, esta expresión que se cree es un artefacto técnico y debe informarse como pérdida de expresión. De igual forma la expresión citoplasmática o membranosa no constituye una expresión normal y debe informarse como anormal, esto es, porque las proteínas de malos apareamientos del ADN se localizan en el núcleo. En el caso de que la pieza valorada haya recibido terapia neoadyuvante, especialmente en los cánceres de recto, puede afectar la tinción de inmunohistoquímica, especialmente para MSH6, que puede estar ausente, débil o manchar solo los nucléolos. De la misma forma la expresión intacta de las 4 proteínas no excluye por completo el síndrome de Lynch porque aproximadamente el 5% de las familias pueden tener una mutación diferente (especialmente en el MLH1), lo que resulta en proteína no funcional con antigenicidad retenida. La recomendación para el reporte de la inmunohistoquímica del sistema de reparación de malos apareamientos es el siguiente:

Si en los resultados tenemos una expresión normal de MLH1, PSM2, MSH2 y MSH3 se sugiere reportar, las células tumorales muestran una reacción nuclear normal, por lo que se concluye que no existe evidencia por inmunohistoquímica de inestabilidad de microsatélites. (18)

Si se presenta un resultado anormal, por pérdida de MSH6 se sugiere reportar que las células tumorales muestran pérdida de expresión de la proteína MSH6, con expresión normal, en MLH1, PMS2 y MSH2. Por lo que se concluye que está pérdida de expresión en la proteína de reparación de malos apareamientos se asocia con Lynch y otros síndromes, por lo que se sugiere valoración del paciente por el servicio de genética. (18)

Si se presenta un resultado anormal por pérdida de PMS2, se sugiere reportar que las células tumorales muestran pérdida de expresión de la proteína PSM2, con expresión normal, en MLH1, MLH6 y MSH2. Por lo que se concluye que esta pérdida de expresión en la proteína de reparación de malos apareamientos se asocia con Lynch y otros síndromes, por lo que se sugiere valoración del paciente por el servicio de genética. (18)

Si se presenta un resultado anormal por pérdida de expresión en MSH2 y MSH6. Se sugiere reportar que las células tumorales muestran pérdida de expresión de la proteína MSH2 y MSH6, con expresión normal, en MLH1 y PSM2. Por lo que se concluye que esta pérdida de expresión en la proteína de reparación de malos apareamientos se asocia con Lynch y otros síndromes, por lo que se sugiere valoración del paciente por el servicio de genética. (18)

Si se presenta un resultado anormal por pérdida de expresión de MLH1 y PMS2, con ausencia de hipermetilación del promotor MLH1. Se sugiere reportar que las células tumorales muestran pérdida de expresión de la proteína MLH1 y PSM2, con expresión normal, en MLH1 y PSM2. Sin presencia de metilación del promotor de MLH1. Por lo que se concluye que esta pérdida de expresión en la proteína de reparación de malos apareamientos, podría ser esporádico, sin embargo, se deben tener en cuenta como diagnósticos diferenciales Lynch y otros síndromes relacionados. Por lo que se sugiere valoración del paciente por el servicio de genética. (18)

Si presenta un resultado anormal por pérdida de expresión de MLH1 y PSM2 con presencia de hipermetilación del promotor MLH1. Se sugiere reportar que las células tumorales muestran pérdida de expresión de la proteína MLH1 y PSM2, con expresión normal, en MLH1 y PSM2. Con presencia de metilación del promotor de MLH1 en las células tumorales. Por lo que se concluye que esta pérdida de expresión en la proteína de reparación de malos apareamientos, indica que lo más probable es que sea esporádico. Estos pacientes no requieren de valoración por el servicio de genética. (18)

Si presenta un resultado anormal por pérdida de expresión de MLH1 y PSM2. Sin valoración de la existencia de la hipermetilación del promotor de MLH1. Se sugiere reportar que las células tumorales muestran pérdida de expresión de la proteína MLH1 y PSM2, con expresión normal, en MSH2 y MSH6. La presencia de la hipermetilación del promotor de MLH1 no ha sido valorada. Por lo que se concluye que está pérdida de expresión en la proteína de reparación de malos apareamientos, podría ser esporádico, sin embargo, se deben tener en cuenta como diagnósticos diferenciales Lynch y otros síndromes relacionados. Por lo que se sugiere la prueba para la identificación de la hipermetilación del promotor MLH1, o bien enviar al paciente al servicio de genética. (18)

El método por PCR requiere de ADN de tejido tumoral y tejido normal, el principio de este método es medir la presencia de diferentes longitudes de marcadores de microsatélites específicos en células tumorales en comparación con células normales. Durante los primeros intentos de diagnóstico de inestabilidad de microsatélites en el carcinoma colorrectal, se había recomendado un panel de marcadores de microsatélites que incluyeran tres repeticiones de dinucleótidos (D5S346, D2S123 y D17S250) y 2 repeticiones de mono nucleótidos (BAT25 y BAT26). Con lo que se podían agrupar en alguno de los tres distintos fenotipos de inestabilidad de microsatélites; Se considera alto si dos o más marcadores de microsatélites están mutados, se considera bajo si solo uno está mutado y si ningún de los locus examinados demuestra mutación, el tumor se considerará estable. Este panel fue conocido como el panel de Bethesda, después de unos años se encontró que los marcadores de mono nucleótidos tienen una mayor especificidad y sensibilidad que las repeticiones de dinucleótidos, por lo que los criterios de Bethesda fueron revisados por el Instituto Nacional de Cáncer en el 2004, donde se sugiere el uso de más paneles que contengan más marcadores mono nucleótidos debido a su mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de inestabilidad de microsatélites en el carcinoma colorrectal. (2,4,11) Ambos métodos pueden presentar una comparable sensibilidad y mostrar una concordancia del 96%. (18)

Algunos estudios realizados que presentan similitud a este estudio, evaluaban las pruebas universales de riesgo de cáncer de la línea germinal detectando en una muestra de 500 pacientes de los cuales 185 eran menores de 50 años, con una edad promedio de 44 años, se identificó 25 pacientes con alteración en la línea germinal lo que represento el 19%, por lo que concluyeron que uno de cada 5 pacientes con enfermedad de inicio joven albergaba una predisposición al cáncer de la línea germinal. Por lo que concluyeron que, dada la tasa de detección obtenida y con el alto nivel de interés, apoyan la evaluación universal del riesgo de cáncer de la línea germinal en esta población de pacientes, es decir en menores de 50 años, ha esta misma conclusión se llegó en un segundo estudio donde se refiere que 1 de cada 5 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma colorrectal en una edad menor de 50 años es portador de una mutación germinal y en este estudio se vio que casi la mitad de ellos no tienen antecedentes clínicos típicamente asociados con algún síndrome, por lo que las pruebas de la línea germinal con paneles de cáncer multigénico deben considerarse para todos los pacientes jóvenes con adenocarcinoma colorrectal. (19,20) En otro estudio donde no se tomaron en cuenta las características clínicas y se realizó la determinación de mutaciones genéticas, se encontró que 9.9% de un total de 1,058 pacientes son portadores de una o más mutaciones, de estas el 3.1% tenían síndrome de Lynch, y se identificó que el 26.6% de los pacientes demostraron resultados anormales en los sistemas de reparación de microsatélites, lo cual se considera una cifra representativa. (21) En otros estudios donde se llevó a cabo la determinación del mecanismo de pérdida de reparación de desajustes se identificó que de un total de 157 neoplasias donde se realizó un escaneo del genoma completo, el 66% tenían hipermetilación del promotor MLH1, el 18% presentaron variantes patógenas constitucionales (Síndrome de Lynch), el 11% tenía variantes patógenas de reparación de desajustes somático bialélico y el 6% tenía inestabilidad de microsatélites alto. La distribución de la pérdida de reparación de desajuste fue la siguiente: pérdida conjunta de MLH1 y PSM2 (79%), pérdida conjunta de MSH2 y MSH6 (10%), pérdida solo de MSH6 (3%), y pérdida solo de PMS2 (2%). Esta determinación en el patrón de pérdida de reparación, puede ayudar con la identificación de pacientes cuya enfermedad es probable que responda a la inmunoterapia,

por lo que las pruebas con un panel multigénico podrían considerarse para todos los pacientes con adenocarcinoma colorrectal, primordialmente en pacientes con inicio temprano de la enfermedad es decir menores de 50 años. (22,23) En un estudio japonés donde se llevó a cabo la búsqueda de la prevalencia y las características histológicas de los adenocarcinomas colorrectales en pacientes menores de 50 años se detectó que de un total de 119 pacientes los cuales fueron valorados con inmunohistoquímica con los marcadores MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, se encontró pérdida de proteínas de reparación de microsatélites en 10 pacientes lo que corresponde al 8.4% de los cuales al continuar con su evaluación genética se demostró que 7 tenían síndrome de Lynch y los 3 pacientes restantes se asociaron a adenocarcinomas colorrectales esporádicos con deficiencia de las proteínas de reparación de microsatélites. (24) Y tomando en cuenta el impacto del análisis de inmunohistoquímica de rutina del tejido tumoral para la pérdida de la expresión de las proteínas de reparación de desajustes en pacientes con adenocarcinoma colorrectal de inicio en edad temprana sometidos a resección se vio que de un total de 198 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal, se obtuvo un resultado de inmunohistoquímica anormal en 38 casos lo que representa el 19.1%, de estos se detectaron 10 pacientes con síndrome de Lynch lo que representa el 5.1%, por lo que concluyen que la prueba universal de inmunohistoquímica para síndrome de Lynch en pacientes con adenocarcinoma colorrectal temprano, identifica a un número sustancial de pacientes con síndrome de Lynch que se habrían perdido, si las pruebas genéticas se hubieran basado solo en los criterios clínicos. (25)

Planteamiento del problema

La incidencia de inestabilidad de microsatélites se ha reportado en hasta el 20% de los casos de carcinoma colorrectal esporádico, y de un 2 a un 3% se han relacionado con síndrome de Lynch, por lo que se ha propuesto la realización de pruebas de inmunohistoquímica o PCR para la detección de inestabilidad de microsatélites a todos los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma colorrectal, en primera instancia para la detección de inestabilidad de microsatélites en un contexto de mutación de la

línea germinal (Síndrome de Lynch), y en segunda estancia para detectar a los pacientes que tienen inestabilidad de microsatélites como consecuencia de una mutación esporádica. En el contexto de síndrome de Lynch la finalidad es detectar oportunamente a los pacientes que presentan esta inestabilidad para ofrecerles un asesoramiento adecuado y prevenir la existencia de algún otro tipo de neoplasia relacionada con este síndrome, y en el caso de los esporádicos ver la posibilidad de brindarle algún tratamiento que pueda mejorar su pronóstico y sobrevida. Sin embargo, en nuestro servicio no se busca de forma rutinaria la inestabilidad de microsatélites; Por medio de este estudio se busca ver la frecuencia de marcadores de inestabilidad de microsatélites, con la finalidad de ver si es asequible la determinación rutinaria de inestabilidad de microsatélites en todos los pacientes diagnosticados por el servicio de anatomía patológica, y con esto complementar los diagnósticos histológicos emitidos por la división de anatomía patológica, repercutiendo directamente en el tratamiento y en el pronóstico de los pacientes.

Objetivo General

Reportar la frecuencia de inestabilidad de microsatélites, determinada por marcadores de inmunohistoquímica en tejido procesado de biopsias y piezas quirúrgicas, provenientes de pacientes con adenocarcinoma colorrectal, registrados en un periodo de cinco años que comprende el 1 de enero del 2018 al 31 de diciembre del 2022 de la división de anatomía patológica del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Material y métodos.

Se llevó a cabo la recolección de todos los informes de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma colorrectal por el servicio de anatomía patológica, en un lapso de cinco años que comprende del 01 de enero 2018 al 31 de diciembre 2022; de la cual se obtuvo una muestra total de 94 pacientes, a los cuales

se le aplicaron los criterios de selección; estos criterios refieren, que los casos diagnosticados como adenocarcinomas colorrectales, deben contar con laminillas y bloques de parafina, el no contar con tejido suficiente en los bloques de parafina o la falta de estos para la realización de estudios de inmunohistoquímica, los excluye de este estudio. Se obtuvo un total de 37 pacientes, los cuales cumplían con los criterios de selección. A cada uno de estos pacientes se verificó el diagnóstico emitido y se valoró si existían ya estudios de inmunohistoquímica previos de inestabilidad de microsatélites, en total 9 pacientes ya contaban con los estudios de inmunohistoquímica por lo que se obtuvieron las laminillas de los cuatro marcadores utilizados. A todos los pacientes que no contaban con estudios de inmunohistoquímica para la detección de inestabilidad de microsatélites se le solicitó, en total fueron 28. La elaboración de inmunohistoquímica fue realizada por el histotecnólogo especializado en la realización de inmunohistoquímica de la división de anatomía patológica del Hospital Dr. Manuel Gea González, los inmunomarcadores solicitados fueron MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, utilizando anticuerpos monoclonales de ratón, clona G168-728 isotipo IgG2a/K de MLH1, clona RBT-MSH2 isotipo IgG de MSH2, clona 44 isotipo IgG1 de MSH6, y clona EPS1 isotipo IgG de PMS2. Con la obtención de las laminillas de inmunohistoquímica, se procedió a revisar las laminillas para su interpretación, la cual fue llevada a cabo por los investigadores. Para tener un adecuado control de los estudios de inmunohistoquímica, a todas las laminillas de inmunohistoquímica, se le deben valorar los controles internos (mucosa colónica residual) y un control externo (tejido que muestra positividad al marcador, en este estudio se utilizaron dos tejidos como marcadores externos, uno de ganglio linfático y otro de mucosa colónica). Cada una de las laminillas fue valorada con el microscopio óptico del servicio de anatomía patológica en conjunto tanto investigador principal como asociado. La interpretación de la inmunohistoquímica se realizó de la siguiente manera, se considerará adenocarcinoma con estabilidad de microsatélites, cuando en los cuatro inmunomarcadores (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) se observe una reacción nuclear intacta en las células neoplásicas, esta reacción puede ser focal es decir puede que no todas las células neoplásicas presenten reacción nuclear intacta; y se considera como probable inestabilidad de microsatélites cuando

existe pérdida de expresión nuclear de uno o más de los marcadores de inmunohistoquímica, ver imagen 1; y dependiendo del marcador que resulte no reactivo, se podrá sospechar entre adenocarcinoma colorrectal esporádico con inestabilidad de microsatélites, o bien adenocarcinoma en un contexto de síndrome de Lynch. Todos los datos obtenidos fueron recabados en una hoja de Excel para su análisis.

Resultados.

De una muestra inicial de 94 pacientes, al realizar los criterios de inclusión, la muestra final fue de 37 pacientes, de los cuales el 54% fueron mujeres (20 pacientes) y el 46% fueron hombres (17 pacientes), tuvieron una media de edad de 60 años, siendo el paciente más joven de 29 años y el paciente más grande de 92 años de edad, ver Tabla 1. El año en el que menos pacientes capturamos fue el 2021, en el cual, solo se obtuvieron 5 pacientes, los años que más proporcionaron pacientes fueron el 2020 y el 2022 con un total de 9 pacientes en cada uno de los años, el año donde se tenía el mayor registro de pacientes con inmunohistoquímica para valoración de inestabilidad de microsatélites ya solicitada, fue en el año 2022 con un total de 7 pacientes. El diagnóstico que con mayor frecuencia se reporta en esta población fue el de adenocarcinoma moderadamente diferenciado con un 68% de los casos, seguido de un adenocarcinoma bien diferenciado (14% de los casos). Solo 9 pacientes tenían 50 años o menos al momento del diagnóstico lo que representa el 24% de la muestra. Se le realizó inmunohistoquímica para valoración de inestabilidad de microsatélites a un total de 28 pacientes. Solo un caso fue considerado como no valorable, dado que las pruebas de inmunohistoquímica realizadas eran negativas por ausencia de expresión nuclear en células neoplásicas, pero de igual manera los controles internos eran negativos. Se encontró una frecuencia de inestabilidad de microsatélites determinada por inmunohistoquímica en un paciente, lo que equivale al 3%, la edad del paciente fue de 43 años, con un diagnóstico de adenocarcinoma moderadamente diferenciado, este paciente presentó una pérdida de expresión inusual donde no se identificó expresión nuclear en PMS2, MSH2 y MSH6, con expresión conservada de MLH1, ambos perfiles de expresión, es decir la pérdida de expresión de PMS2 con retención de la expresión de

MLH1 y la pérdida de expresión de MSH2 y MSH6, pueden estar asociados con síndrome de Lynch, por lo que el siguiente paso, es la determinación de inestabilidad de microsatélites por medio de PCR.

Discusión.

En este protocolo se estimó una frecuencia de inestabilidad de microsatélites del 3%, tomando en cuenta que la literatura consultada refiere una frecuencia de inestabilidad de microsatélites en pacientes con adenocarcinoma colorrectal de hasta el 20%, este rango se encuentra dentro de lo reportado en estudios extranjeros. Sin embargo, es importante mencionar que de una población inicial de 94 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal, solo tuvimos una muestra de 37 pacientes, debido a que la mayoría de estos pacientes fueron enviados a centros oncológicos donde se requiere el envío del material histológico, por lo que mucha población se perdió, hubiese sido interesante realizar un mayor número de pruebas primordialmente a los pacientes que tenían el diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal antes de los 50 años de edad, ya que en estudios previos, que han tomado como límite de edad (50 años), ha detectado una frecuencia de inestabilidad de microsatélites del 19%. Es importante recalcar, que el estudio definitivo, donde se determinara la inestabilidad de microsatélites, es llevado por el servicio de genética, por medio de pruebas de PCR, sin embargo, es de mucha ayuda iniciar con paneles de inmunohistoquímica como screening, por lo accesible que pueden ser estas pruebas para las instituciones, y además estas pruebas permiten detectar a los posibles pacientes que tengan esta alteración y que sean candidatos a estudios moleculares más precisos para el diagnóstico. Todo esto tiene una repercusión en el pronóstico y en el tratamiento de los pacientes por lo que es importante comenzar a realizar dichas pruebas, sin embargo, creemos pertinente solo realizarlo en pacientes menores de 50 años, con la finalidad de mejorar los diagnósticos y evitar gastos innecesarios a la institución. Con estos resultados se concluyó que la frecuencia de inestabilidad determinada por inmunohistoquímica en un lapso de 5 años el Hospital General Dr. Manuel Gea González fue del 3%, una cifra baja, sin embargo, tomando en cuenta la repercusión directa que tiene este diagnóstico sobre

el paciente y sus familiares. creemos prudente la realización de pruebas de inmunohistoquímica para la detección de inestabilidad de microsatélites en pacientes menores de 50 años y más que en esta población no se identificaron pacientes con alta sospecha de inestabilidad de microsatélites esporádicos, o de la línea germinal en pacientes mayores de 50 años, tomando en cuenta que 28 pacientes tenían más de 50 años (75%) al momento del diagnóstico.

Referencias.

- 1.- Gupta S, Provenzale D, Llor X, Halverson AL, Grady W, Chung DC, Et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal, Version 2.2019, J Natl Compr Canc Netw. September of 2019;17(9) pp.1032-41.
- 2.- Marginean EC, Melosky B. Is There a Role for Programmed Death Ligand-1 Testing and Immunotherapy in Colorectal Cancer With Microsatellite Instability? Part I Colorectal Cancer: Microsatellite Instability, Testing, And Clinical Implications. Arch Pathol Lab Med. January 2018;142(1) 17-25.
- 3.- 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. January 2009;33(1): 126-33.
- 4.- Nouri Nojadeh J, Behrouz Sharif S, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. EXCLI J 17, 2018, pp 1611-2156.
- 5.- Lao W, Grady W. Epigenetics and colorectal cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. December 2011;8(12):686-700
- 6.- Chen J, Guo F, Shi X, Zhang L, Zhang a, Jin H, et al. BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients. BMC Cancer. December 2014;14(1):802.
- 7.- Marmol I, Sanchez de Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi M. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. January 2017;18(1):197

- 8.- Fearon Er, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* June 1990;61 (5): pp759-67.
- 9.- Boldan Cr, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. May 2010;138(6): pp.2073-2087.
- 10.- Weisenberg Dj, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse Ma, et al. CPG Island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. June 2006;38(7): pp.787-93.
- 11.- Malapelle U, Parente P, Pepe F, De Luca C, Pisapia P, Sgariglia R, et al. Evaluation of Micro Satellite Instability and Mismatch Repair Status in Different Solid Tumors: A Multicenter Analysis in a Real-World Setting. *Cell*. July 2021;10(8): 1878.
- 12.- Perez-Carbonell L, Ruiz Ponce C, Guiarianos C, Alenda C, Payá A, Brea A, et al. Comparison between universal molecular screening for Lynch syndrome and revised Bethesda Guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer. *Gut*. June 2012;61(6): pp.865-72.
- 13.- Gallon R, Gawthorepe P, Phelps RL, Hayes C, Borthwick GM, Santibanez-Koref M, et al. How Should We Test for Lynch Syndrome? A Review of Current Guidelines and Future Strategies. *Cancers*. January 2021;13(3) pp.406.
- 14.- Vasen H, Watson P, Mecklin J, Lynch H. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology*, June 1999;116(6):1453-6.

- 15.- Umar A, Boland Cr, Terdiman Jp, Syngal S, Chapelle A D. I, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *JNCI J Natl Cancer Inst.* February 2004;96(4):261-8.
- 16.- Dominguez-Valentin M, Sampson Jr, Seppälä TT, ten Broeke SW, PLazzer JP, Nakken S, et al. Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: findings from the Prospective Lynch Syndrome Database. *Genet Med.* 2020 January;22(1):15-25.
- 17.- Kim J, Braun D, Ukaegbu C, Dhingra Tg, Kastrinos F, Parmigiani G, et al. Clinical Factors Associated With Gastric Cancer in Individuals With Lynch Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* April 2020;18(4):830-837.
- 18.- Singh N, Wong R, Tchrakian N, Allen Sg, Clarke B, Gilks B. Interpretation and Reporting Terminology for Mismatch Repair Protein Immunohistochemistry in Endometrial Cancer. *Mod Pathol.* 2021 May;34(5):1031-1032
- 19.- You, T, Nancy M.D. M.H.Sc; Moskowitz, Julie B. M.S; Chang, George J. M.D. M.S; Mork, Maureen E. M.S. Rodriguez-Bigas, Miguel A. M.D. Bednarski, Brian K. M.D. M.E.H.P. Messicj, Craig A. M.D. Tillman, Matthew M. M.D. Skibber, John M. M.D. Nguyen, Sa T.M.S. Koperz, Scott M.D. Ph.D. Vilar, Eduardo M.D. Oh.D. Germline Cancer Risk Profiles of Patients with Young-Onset Colorectal Cancer: Findings From a Prospective Universal Germline Testing and Telegenetics Program. *Diseases of the Colon & Rectum* 66(4): pp. 532-542, April 2023.
- 20.- Stoffel Em, Koeppe E, Everett J, Ulintz P, Kiel M, Osborne J, Williams L, Hanson K, Gruber SB, Rozek LS. Germline Genetic Features of Young Individuals With Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2018 Mar; 154(4) pp- 897-905.

21.- Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs Cs, Allen BA, Uno H, Hornick JL, Ukaegbu CI, Brais LK, McNamara OG, Mayer RJ, Schrag D, Meyerhardt Ja, Ng K, Kidd J, Singh N, Harman Ar, Wenstrup RJ, Syngal S. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individual With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2017 Apr 1;35(10):1086-1095.

22.- Keshinro, Ajaratu M.D. Ganesh, Karuna M.D., Ph.D. Vanderbilt, Chad M.D. Firat, Canan M.D. Kim, Jin K. M.D. Chen, Chin-Tung M.S. Yaeger, Rona M.D. Segal, Neil H. M.D., Ph.D. Gonen, Mithat Ph.D. Shia, Jinru M.D. Stadler, Zsofia K. M.D. Weiser, Martin R. M.D. Characteristics of Mismatch Repair-Deficient Colon Cancer in Relation to Mismatch Repair Protein Loss, Hypermethylation Silencing, and Constitutional and Biallelic Somatic Mismatch Repair Gene Pathogenic Variants. *Diseases of the Colon & Rectum* 66(4): p 549-558, April 2023.

23.- Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, Bacher J, Bigley C, Nelsen L, Goodfellow PJ, Goldberg RM, Paskett E, Shields PG, Freudenheim JL, Stanich PP, Lattimer I, Arnold M, Liyanarachchi S, Kalady M, Heald B, Greenwood C, Paquette I, Prues M, Draper DJ, Lindeman C, Kuebler JP, Reynolds K, Brell JM, Shaper AA, Mahesh S, Buie N, Weeman K, Shine K, Haut M, Edwards J, Bastola S, Wickham K, Khanduja KS, Zacks R, Pritchard CC, Shirts BH, Jacobson A, Allen B, de la Chapelle A, Hampel H; Ohio Colorectal Cancer Prevention Initiative Study Group. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2017 Apr 1;3(4):464-471.

24.- Suzuki, O., Eguchi, H., Chika, N. *et al*. Prevalence and clinicopathologic/molecular characteristics of mismatch repair-deficient colorectal cancer in the under-50-year-old Japanese population. *Surg Today* 47, 1135–1146 (2017).

25.- Steinhagen E, Shia J, Markowitz AJ, Stadler ZK, Salo-Mullen EE, Zheng J, Lee-Kong SA, Nash GM, Offit K, Guillem JG. Systematic immunohistochemistry screening for Lynch syndrome in early age-of-onset colorectal cancer patients undergoing surgical resection. *J Am Coll Surg*. 2012 Jan;214(1):61-7.

Tablas e Imágenes.

No.	Edad	Sexo	Diagnostico patológico.	Inmunohistoquímica	inmunomarcadores negativos
1	72	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
2	54	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
3	54	F	Adenocarcinoma bien diferenciado	Estable	
4	66	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
5	47	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
6	61	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
7	50	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
8	44	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
9	67	M	Adenocarcinoma Mucinoso	Estable	
10	74	F	Adenocarcinoma bien diferenciado	Estable	
11	69	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
12	64	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
13	83	F	Adenocarcinoma poco diferenciado	Estable	
14	58	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
15	37	M	Adenocarcinoma Mucinoso	Estable	
16	60	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
17	62	F	Adenocarcinoma Mucinoso	Estable	
18	59	M	Adenocarcinoma bien diferenciado	No valorable	
19	72	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
20	45	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
21	78	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
22	56	F	Adenocarcinoma bien diferenciado	Estable	
23	47	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
24	83	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
25	73	F	Adenocarcinoma bien diferenciado	Estable	
26	59	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
27	43	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Inestable	PMS2, MSH2 y MSH6-
28	62	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
29	92	F	Adenocarcinoma poco diferenciado	Estable	
30	29	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
31	69	M	Carcinoma adenoescamoso	Estable	
32	66	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
33	67	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
34	42	M	Adenocarcinoma Mucinoso	Estable	
35	61	M	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
36	51	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	
37	50	F	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	Estable	

Tabla 1. Tabla de la muestra de pacientes, con edad, sexo, diagnostico, Estabilidad de microsatélites determinada por inmunohistoquímica y pérdida de expresión de inmunomarcadores.

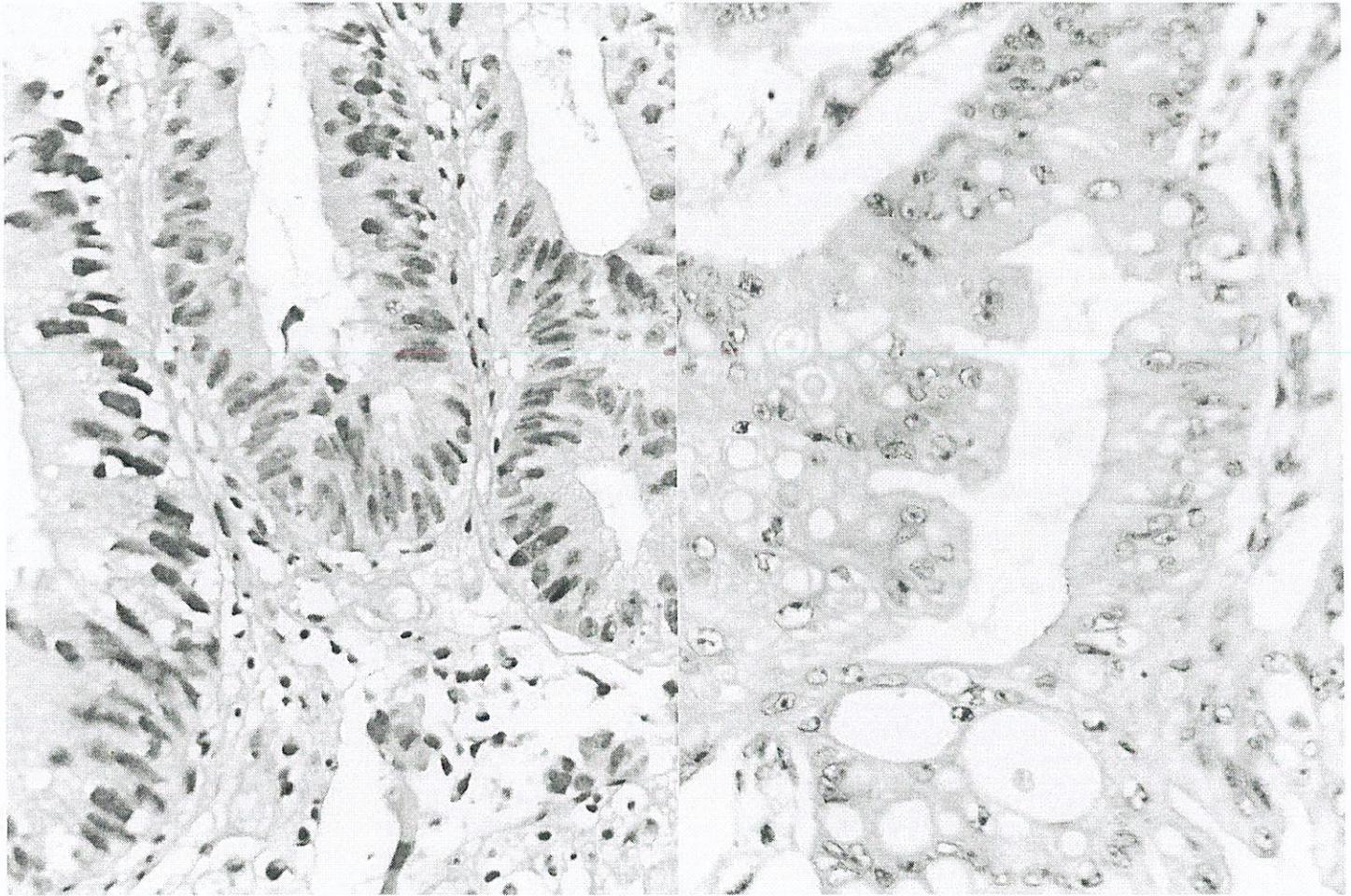


Imagen 1. Fotomicrografía del lado derecho con expresión nuclear conservada en células neoplásicas; Fotomicrografía del lado izquierdo con pérdida de expresión nuclear en células neoplásicas.