



*Inestabilidad de microsatélites y screening de mutaciones en HNPCC y carcinoma colon esporádico (predicción del beneficio a quimioterapia adyuvante).*

Elena M. Martínez

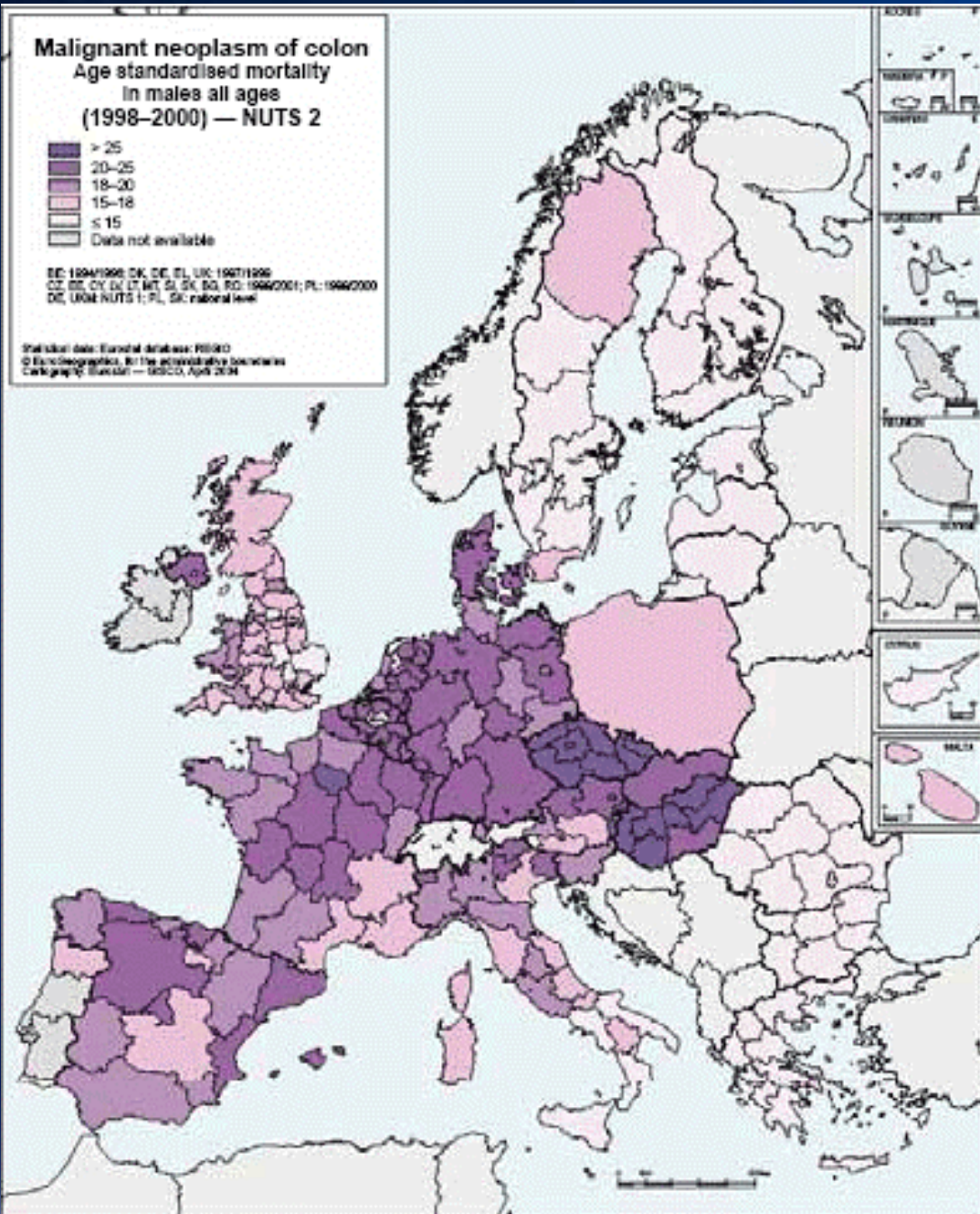
Patología Molecular

**Malignant neoplasm of colon**  
Age standardised mortality  
in males all ages  
(1998-2000) — NUTS 2



EE: 1994/1999; DK, DE, EL, UK: 1997/1999  
CZ, ES, CY, LV, LT, MT, SI, SK, BG, RO: 1999/2001; PL: 1999/2000  
DE, UK: NUTS 1; PL, SK: national level

Statistical data: Eurostat database: P0040  
© EuroGeographics. All the administrative boundaries  
Cartography: Eurostat — ISSCO, April 2004



## Incidencia C. Colorrectal

- En la UE-25 el cáncer de colon supone > 8% de los tumores malignos
- Uno de los cánceres más frecuentes.

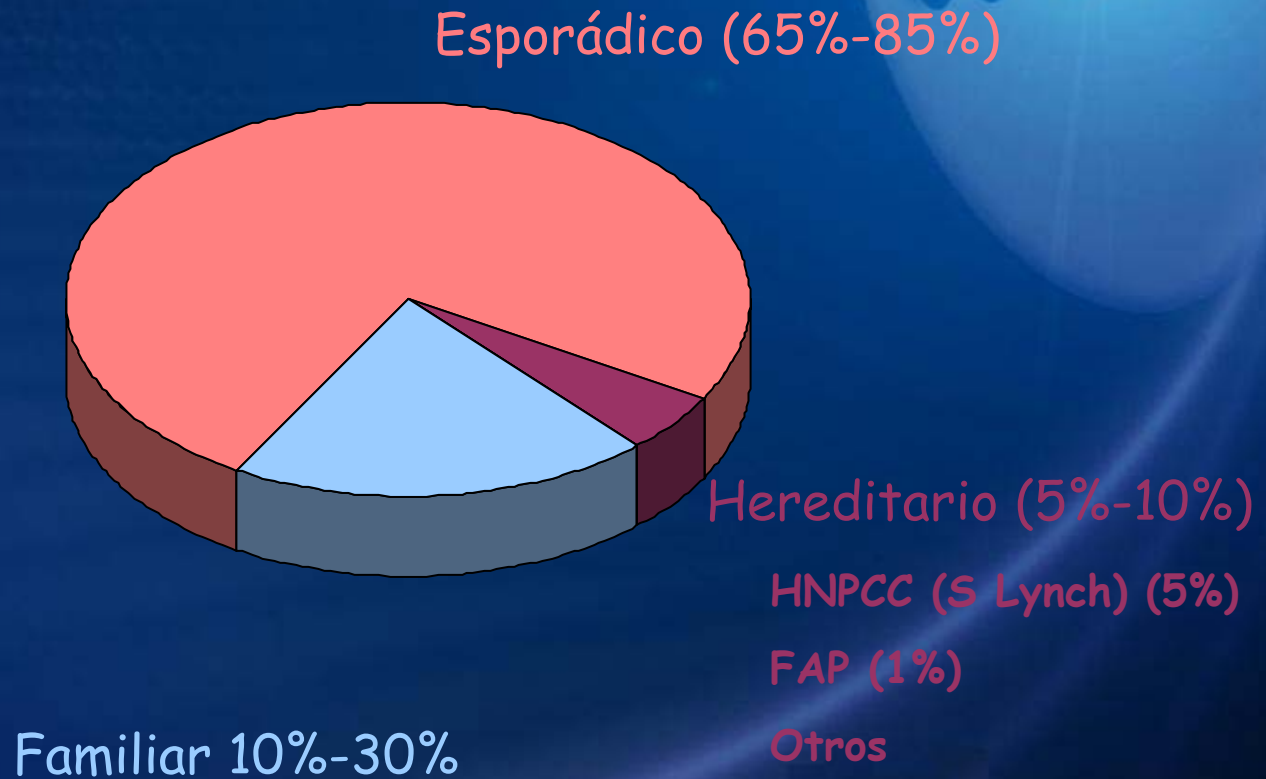
# Factores de Riesgo para Cáncer Colorrectal

- Edad
- Enfermedad inflamatoria intestinal
- Patrón dietético
- Antecedentes familiares de CCR
- Síndromes Hereditarios de CCR





# CAUSAS DE LA SUSCEPTIBILIDAD AL CCR



# Consejo Genético

El consejo (asesoramiento) genético es un proceso que se ocupa de los problemas humanos asociados con la aparición o RIESGO de aparición de una enfermedad genética en una familia

- Proceso multidisciplinar fundamentado en el consentimiento informado  
-voluntario                      -no coercitivo                      -informado                      -confidencial

- Proceso escalonado en varias etapas
- Pre-test
- Test
- Post-test
- Seguimiento

# Consejo Genético

## •Pre-test

Identificación de pacientes en situación de riesgo de cáncer hereditario

Asesoramiento previo al test genético

Consentimiento informado

## •Test

Pruebas genéticas

## •Post Test

Discusión de los resultados genéticos

## •Asesoramiento y seguimiento de las familias

¿Cómo podemos identificar personas en riesgo de padecer  
Cáncer colorrectal hereditario HNPCC?

El mejor método es la **HISTORIA FAMILIAR**



## Criterios para el DIAGNÓSTICO DE HNPCC

- Criterios AMSTERDAM I (1990) y II revisados (1999):
  - 3 familiares con tumor asociado a HNPCC (ovario, endometrio, gástrico, vías biliares, intestino delgado, vejiga)
  - Uno de los familiares es de primer grado de los otros dos
  - Mínimo 2 generaciones consecutivas afectas
  - Mínimo un caso diagnosticado antes de los 50

Criterios más específicos.

40-80 % se detectan mutaciones en línea germinal



## Criterios de "SOSPECHA" para el diagnóstico clínico del CCHNP

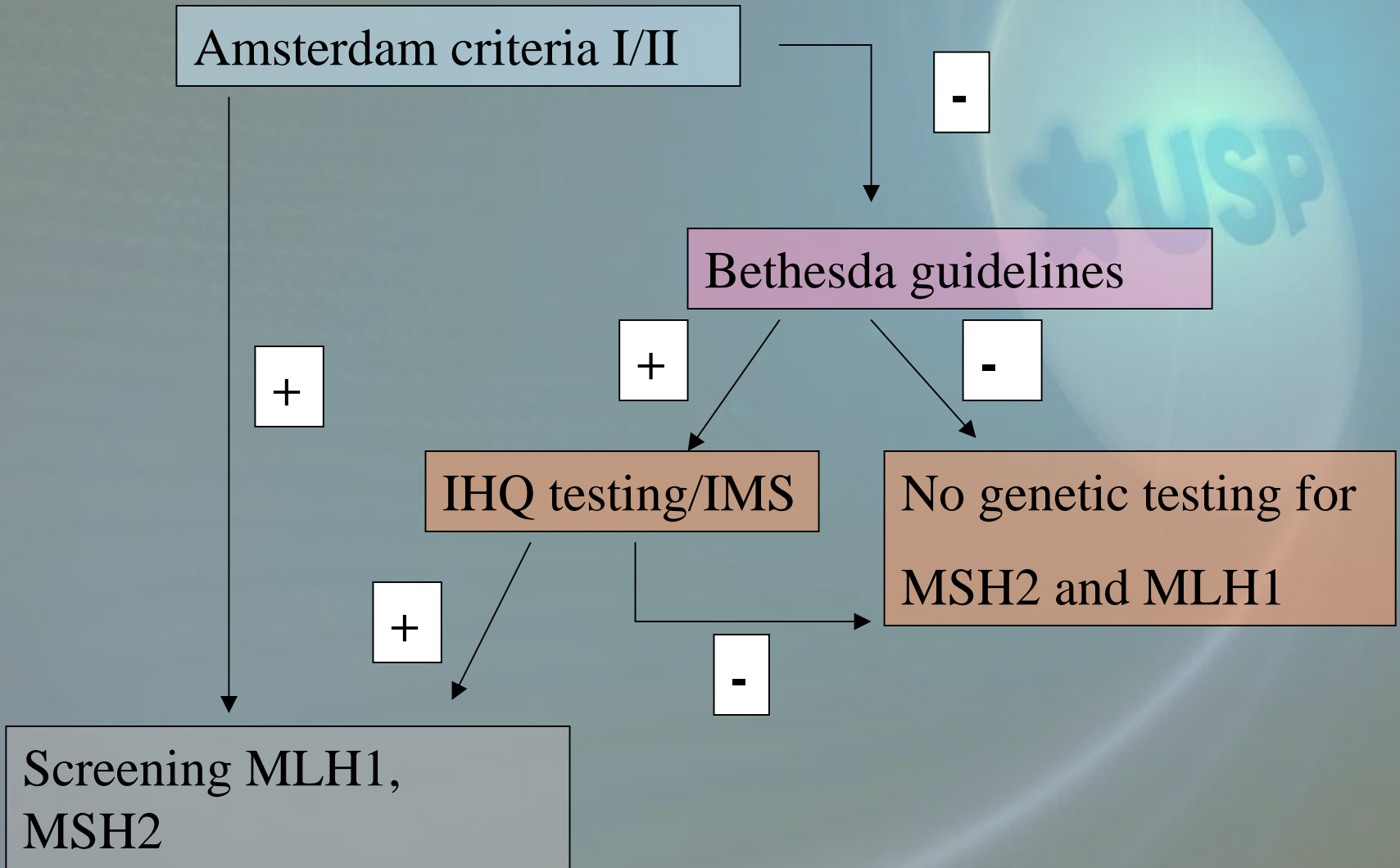


### •Criterios de BETHESDA (1997)

- Individuos que pertenecen a familias que cumplen los criterios Amsterdam I
- Individuos con dos o más tumores asociados al S.Lynch.
- Individuos con CCR y familiar 1er grado con: ca colon/extracolónico asociado (al menos debe diagnosticarse edad <45 a y adenoma <40 a)
- Individuos con CCR o endometrio <45 a
- Individuos con CCR indiferenciado o en anillo de sello si <45 a
- Individuos con adenomas <40 a

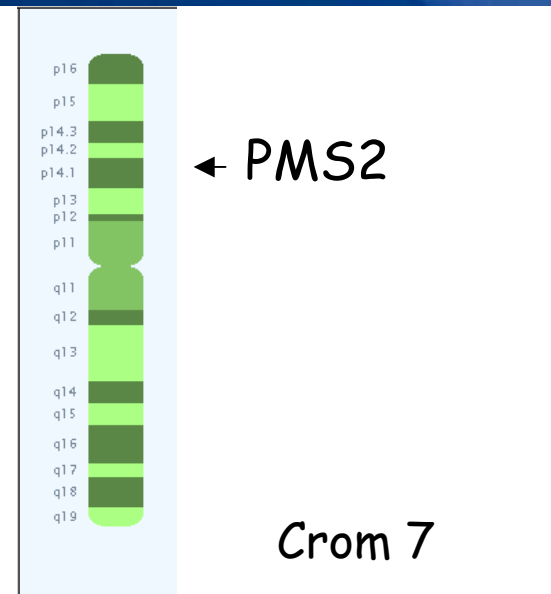
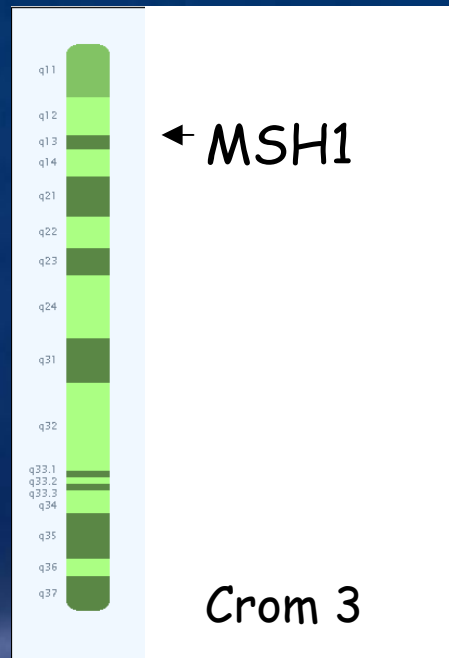
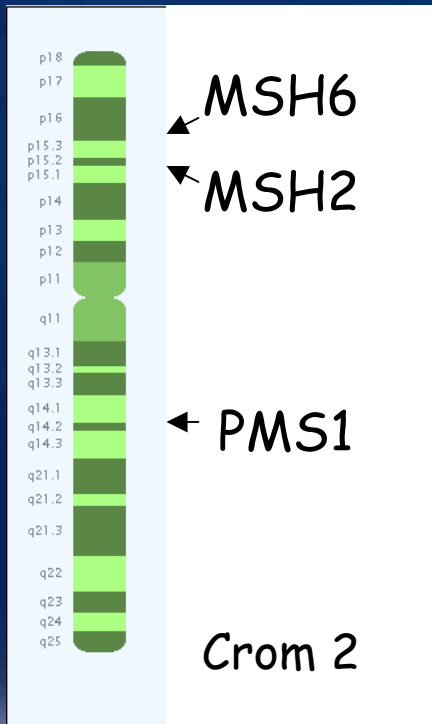
### -Criterios de BETHESDA revisados (2004) para identificar pacientes HNPCC y recomendar estudio IMS

Criterios más sensibles. 10% de las familias se detectan mutaciones germinales



# Heterogeneidad genética del CCHNP

- Alteración de uno o más genes reparadores de ADN MMR “Mismatch Repair genes”
- Herencia autosómica dominante
- Penetrancia de aprox 80%

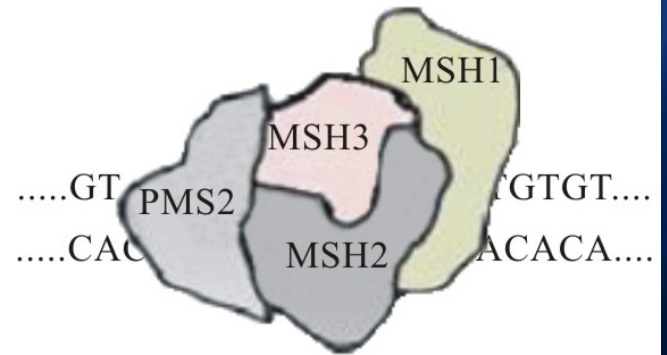
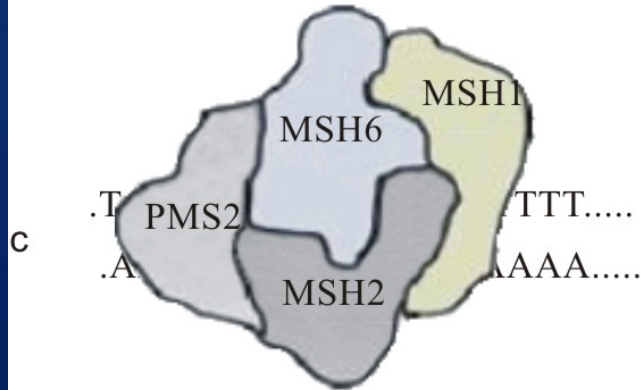
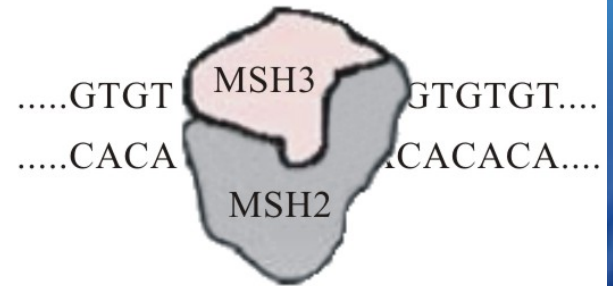
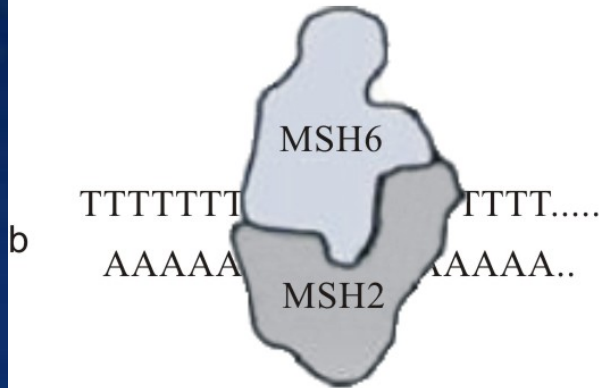


Bases mal apareadas e IDLs

IDLs

a ..TTTTTTTTT<sup>G</sup> TTTTTTTTTT.....  
..AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA...

...GTGTGTGT<sup>∩</sup> GTGTGTGTGT...  
....CACACACACACACACACA...



d ...TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT ...  
...AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA ...

....GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG...  
....CACACACACACACACACACA....



## Inestabilidad de Microsatélites

• Los **MICROSATÉLITES** son pequeñas secuencias de ADN constituidas por unidades de 1 a 7 pb que se repiten en tándem un número variable de veces dando lugar a alelos de diferentes tamaño

• **BAT26** (T)<sub>5</sub>.....(A)<sub>26</sub> Mononucleótido alelo 110-120 pb.

• **D17S750** (TATATATATA) ..... (CACACACACACA.....)<sub>24</sub>  
Dinucleotido alelo 140-170 bp.

• Loci muy polimórficos con una elevada tasa de mutación.  
Origen de la variabilidad:

Mecanismo genético de Slippage  
deslizamiento de una cadena de ADN  
sobre la otra durante la replicación

## Inestabilidad de Microsatélites

- Aunque la longitud de los MS es muy variable de persona a persona. Cada individuo tiene en todas sus células **MS** de una **longitud determinada**.
- En células con **genes reparadores mutados** (MMR) los MS pueden acumular errores y resultar en secuencias más cortas o más largas.
- La aparición de MS anormalmente más largos o cortos en el ADN de un individuo es lo que se denomina **INESTABILIDAD de MS** y es lo que sugiere la existencia de mutaciones en los genes MMR →  
**Screening de mutaciones**
- Aprox **90% de HNPCC** presentan **IMS**

## Test moleculares disponibles para determinación IMS

Panel de 5 regiones de microsatélites de ADN aprobado en Bethesda (Boland et al. 1998) incluyeron dos microsatélites con repeticiones mononucleotídicas (BAT25, BAT26) y tres microsatélites con repeticiones dinucleotídicas (D5S346, D2S123 y D17S250)



## Resultados de un test de IMS

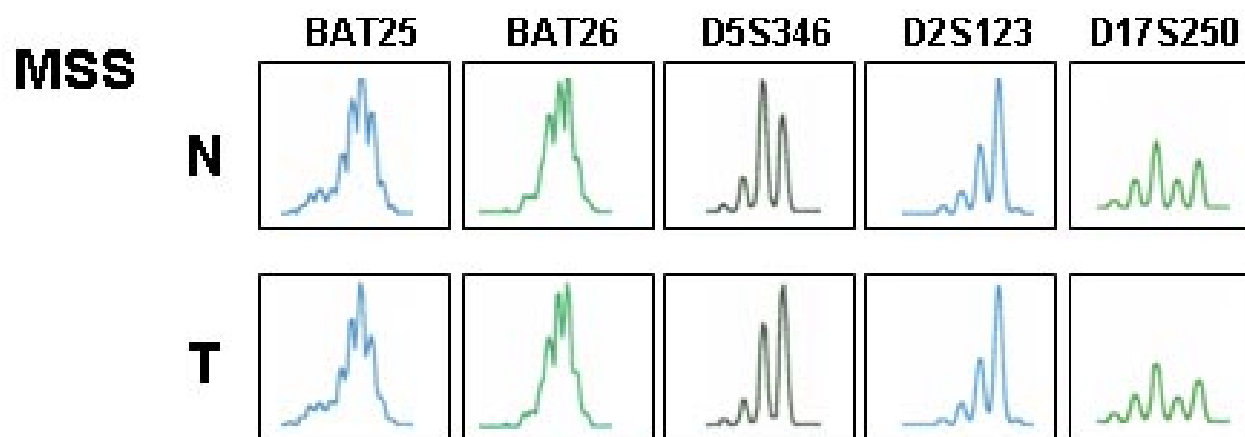
Los tumores se clasifican como:

- 1- De **alta IM (H-MSI)** cuando dos o más MS presentan inestabilidad  
(considerados como sugestivo de HNPCC)
- 2- De **baja IM (L-MSI)** cuando únicamente un marcador presenta inestabilidad
- 3- **Estables** cuando ningún MS presenta inestabilidad (**MSS**)

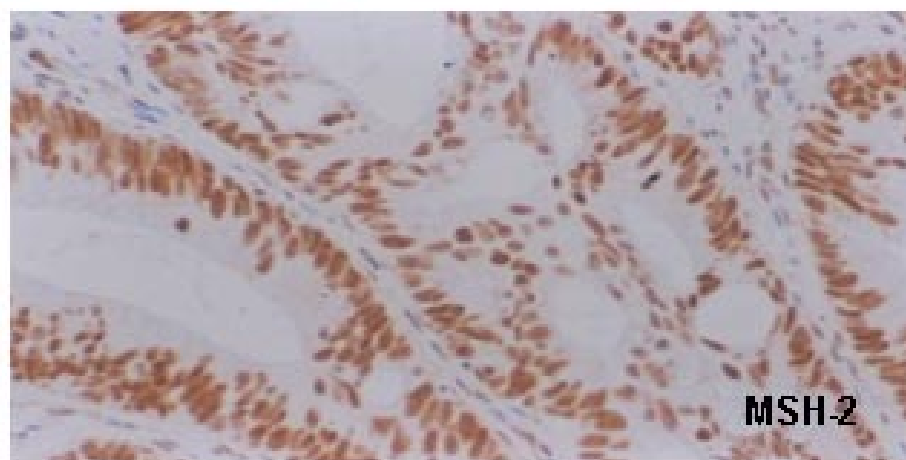




**#P5A. Carcinoma de colon. Análisis de inestabilidad de microsatélites y genes reparadores de DNA: Fenotipo estable (MSS) y expresión conservada de MSH-2 en inmunohistoquímica (IHQ)**

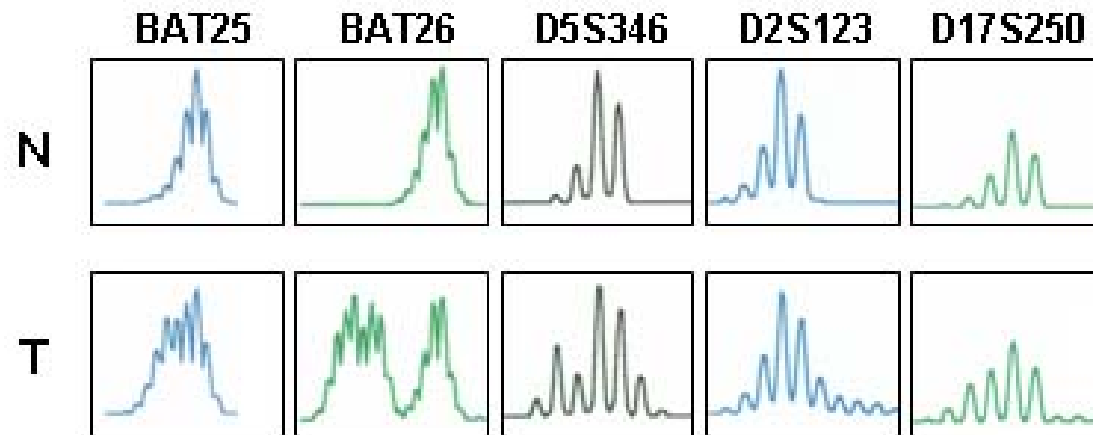


**IHQ**

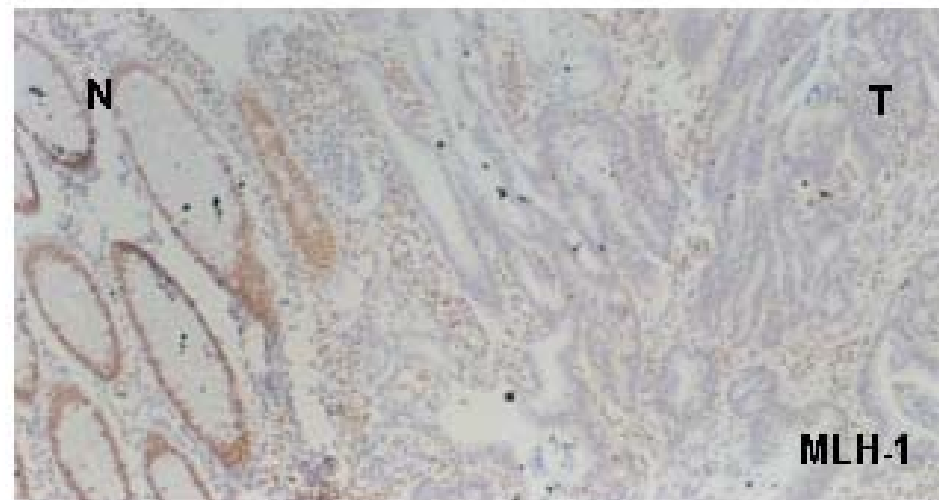


**#P5B. Carcinoma de colon. Análisis de inestabilidad de microsatélites y genes reparadores de DNA: Fenotipo inestable (MSI-H) y pérdida de expresión de MLH-1 en inmunohistoquímica (IHQ)**

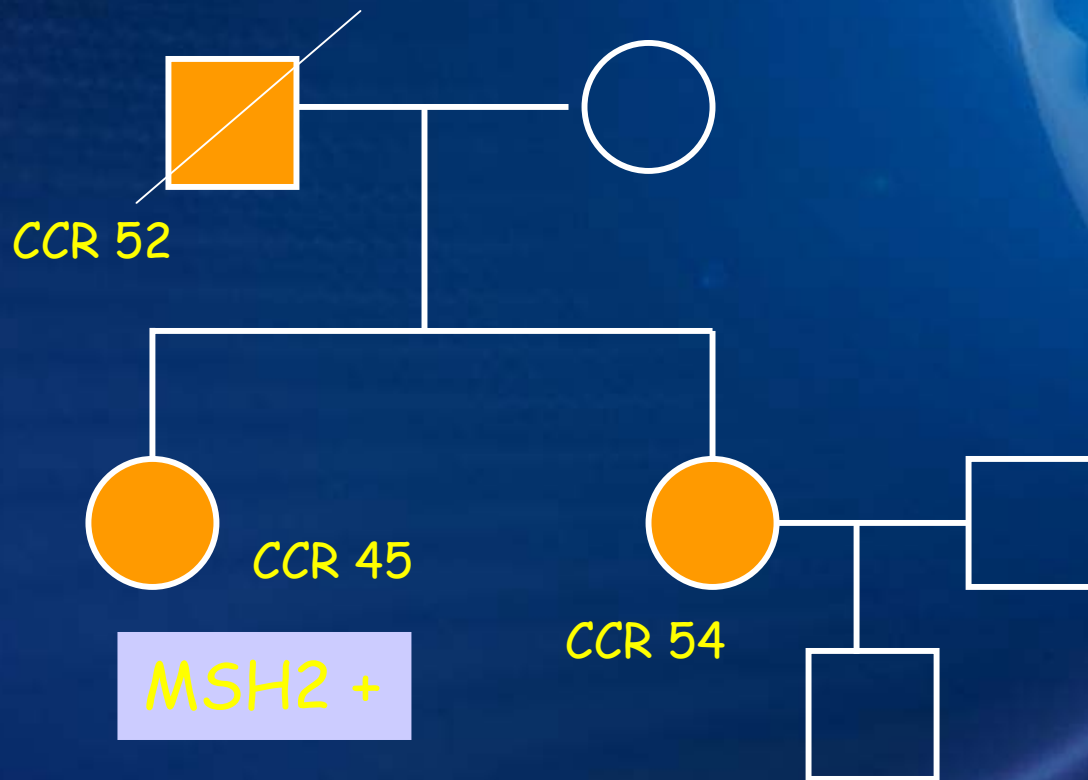
**MSI-H**



**IHQ**

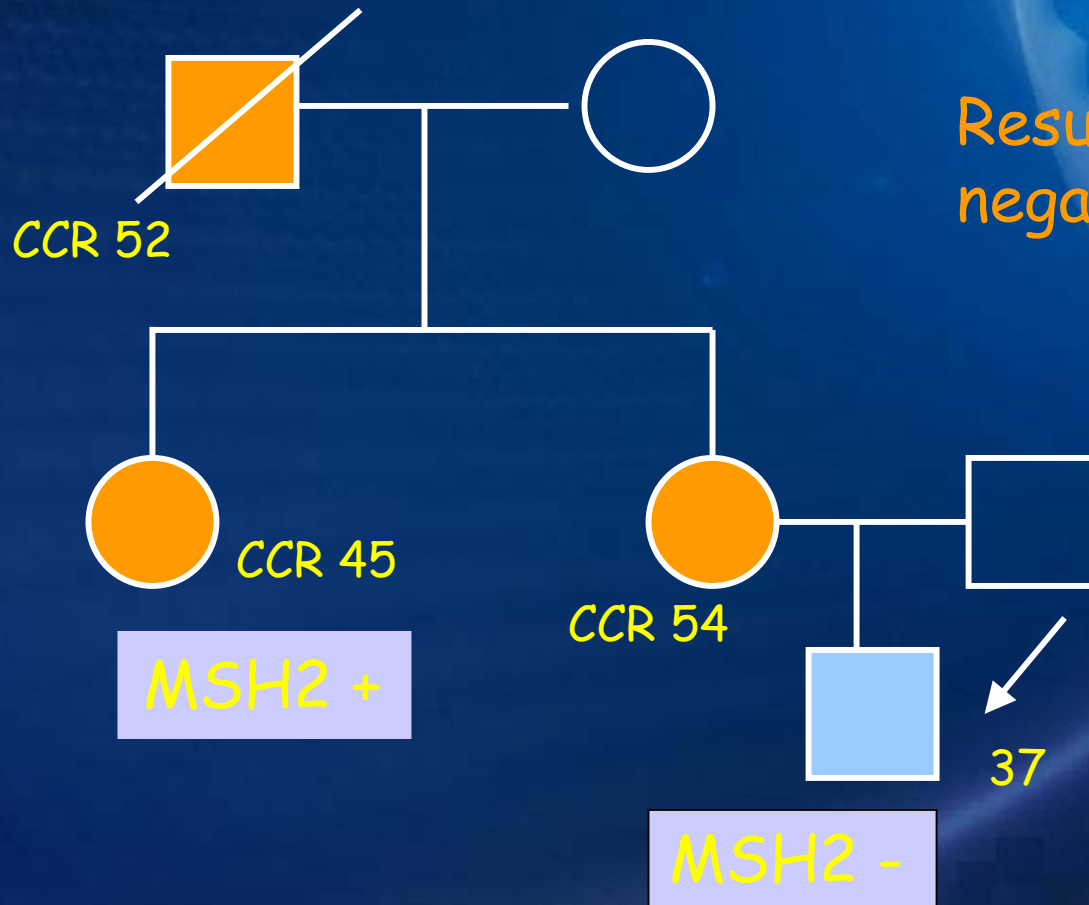


Interpretar los resultados de un test genético (mutaciones en MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)



Test positivo

Interpretar los resultados de un test genético (mutaciones en MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)



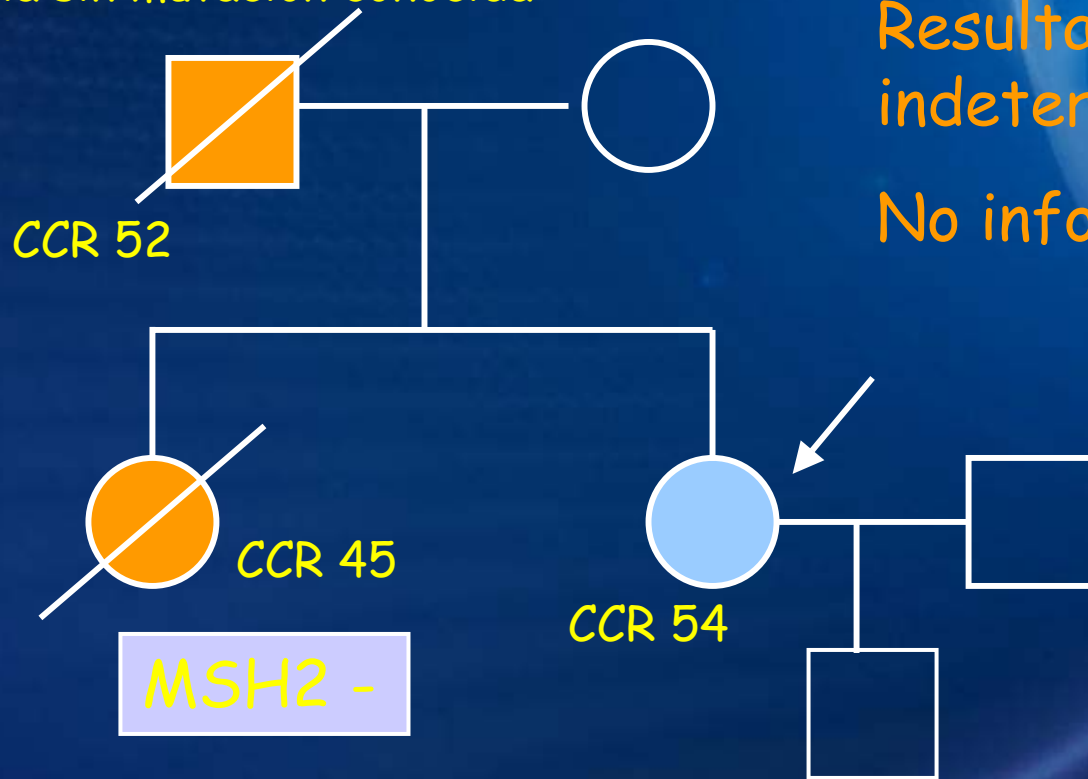
Resultado verdadero negativo





Interpretar los resultados de un test genético (mutaciones en MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)

Familia sin mutación conocida



Resultado indeterminado

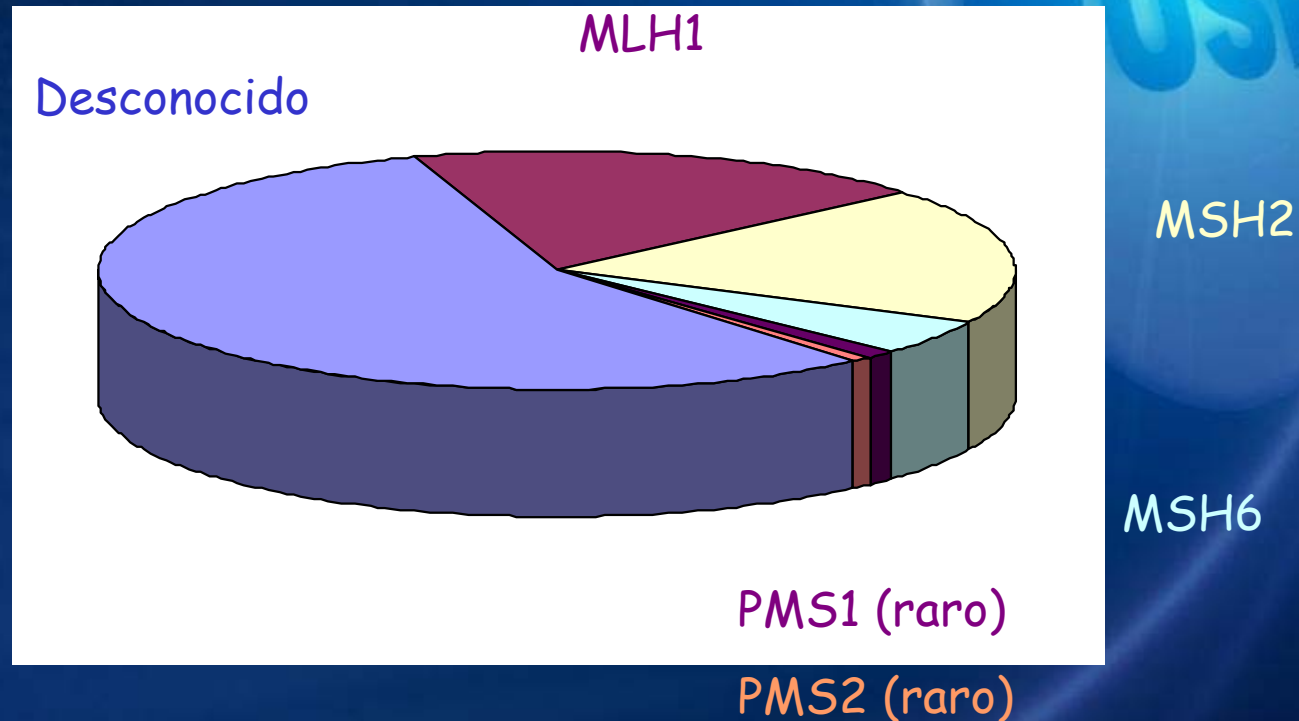
No informativo



## Interpretar los resultados de un test genético para HNPCC

- Es más probable que un test genético sea informativo si primero se estudia a un pariente afectado para establecer la mutación patogénica; otro familiar no afectado pero en riesgo puede hacerse el screening para determinar si porta la misma mutación.
- Un resultado positivo indica un aumento en el riesgo de cáncer de cada familiar de primer grado en un 50% (probabilidad de ser portador de la mutación).
- Un resultado negativo es más informativo cuando el paciente está siendo testado para una mutación específica que ya se ha identificado en su familiar. Un resultado negativo cuando no se conoce la mutación en el pariente reduce la probabilidad de riesgo pero no la elimina completamente.
- Algunos resultados son de significado clínico desconocido.

## Contribución de mutaciones genéticas en familias afectas de HNPCC 2000



- Mutaciones germinales en **MLH1** y **MSH2** 22%-86% en familias con criterios internacionales de diagnóstico (Amsterdam I)  
Renkonen et al 2003 JCO

# Metodología para estudio IMS y screening de mutaciones

- Extracción de ADN tanto de tejido fresco, congelado como incluido en parafina.
- PCR para amplificación de loci de MS y exones de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2...
- MSI Análisis de tamaño de fragmentos mediante electroforesis capilar en secuenciador automático
- Secuenciación automática en secuenciador automático para screening de mutaciones



## Programa de formación

- Estancia en el CNIO en el mes de Junio de 2006 (Dr. Javier Benitez. Programa Genética del Cáncer Humano)
- Puesta a punto de protocolos técnicos HNPCC, HOBC y neoplasias endocrinas

## Infraestructura necesaria

- Secuenciador automático para análisis de fragmentos (IMS) y screening de mutaciones
- Termociclador de apoyo para PCR



## CCR Esporádico

- El 80-85% de los tumores colorrectales esporádicos, al igual que la PAF, surgen a consecuencia de la acumulación de alteraciones en las células de la mucosa cólica, afectando principalmente genes clave del ciclo celular (p.e., *APC*, *K-RAS* y *TP53*). El 15-20% restante comparte los mecanismos moleculares CCR hereditario no asociado a poliposis (HNPCC)
- Se ha determinado que CCR con H-MSI tiene unas características clínicas y patológicas que los distingue de aquellos con MSS
- Estudios donde se determina el estatus y utilidad de la IMS como **pronóstico** y para **orientación terapéutica** de pacientes con CCR esporádico

Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer.

NEJM 2003 Ribic et al.

570 pacientes con CCR estadio II y III ensayo multicéntrico retrospectivo con quimioterapia adyuvante 5-FU.

Estudio de IMS

**Table 1. Characteristics of the Trials.\***

Characteristic	Clinical Trials Group, National Cancer Institute of Canada	North Central Cancer Treatment Group		Gastrointestinal Intergroup, National Cancer Institute	Fondation Française de Cancérologie Digestive
		Protocol 784852	Protocol 874651		
Details of trial					
Date of first randomization	May 1987	May 1978	February 1988	January 1985	October 1982
Total no. of patients randomized	370	267	111	936	268
Total no. of samples collected and analyzed for microsatellite-instability status	292	66	34	143	35
Eligibility criteria					
Age limit	None	None	None	None	≤75 yr
Minimum no. of days between surgery and beginning of chemotherapy	56	35	35	35	35
Adjuvant chemotherapy					
Dose of fluorouracil (mg/m <sup>2</sup> )†	370	450	425	450	400
Dose of leucovorin (mg/m <sup>2</sup> )†	200	—	20	—	200
Dose of levamisole (mg/m <sup>2</sup> )†	—	50	—	50	—
Duration of therapy (mo)	6	12	6	12	6
Median follow-up (yr)	6.2	11.6	7.8	8.8	4.9

\* Modified from the International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) Investigators.<sup>4</sup>

† The doses are given as milligrams per square meter of body-surface area.



**Table 2. Characteristics of the 570 Patients with Colon Cancer.\***

Characteristic	All Eligible Patients (N=570)	Patients with Tumors Exhibiting High-Frequency Microsatellite Instability (N=95)	Patients with Tumors Exhibiting Microsatellite Stability or Low-Frequency Microsatellite Instability (N=475)	P Value
Treatment — no. (%)				0.19
Adjuvant chemotherapy	283 (50)	53 (56)	230 (48)	
No adjuvant chemotherapy	287 (50)	42 (44)	245 (52)	
Age — yr	59.8±11.2	60.7±13.0	59.7±10.8	0.13
Sex — no. (%)				0.45
Male	326 (57)	51 (54)	275 (58)	
Female	244 (43)	44 (46)	200 (42)	
Stage of disease — no. (%)				0.18
II	312 (55)	58 (61)	254 (53)	
III	258 (45)	37 (39)	221 (47)	
Site of tumor — no. (%)†				<0.001
Proximal	257 (45)	84 (89)	173 (36)	
Distal	305 (54)	9 (10)	296 (62)	
Multiple	6 (1)	1 (1)	5 (1)	
Tumor grade — no. (%)†				<0.001
Well differentiated (G1)	97 (17)	8 (9)	89 (19)	
Moderately differentiated (G2)	376 (66)	49 (53)	327 (69)	
Poorly differentiated (G3)	65 (11)	24 (26)	41 (9)	
Undifferentiated (G4)	28 (5)	12 (13)	16 (3)	
No. of positive nodes — no. (%)				0.21
0	312 (55)	58 (61)	254 (53)	
1–4	128 (22)	15 (16)	113 (24)	
>4	130 (23)	22 (23)	108 (23)	
Vital status at 8 yr — no. (%)				0.03
Alive	385 (68)	73 (77)	312 (66)	
Dead	185 (32)	22 (23)	163 (34)	

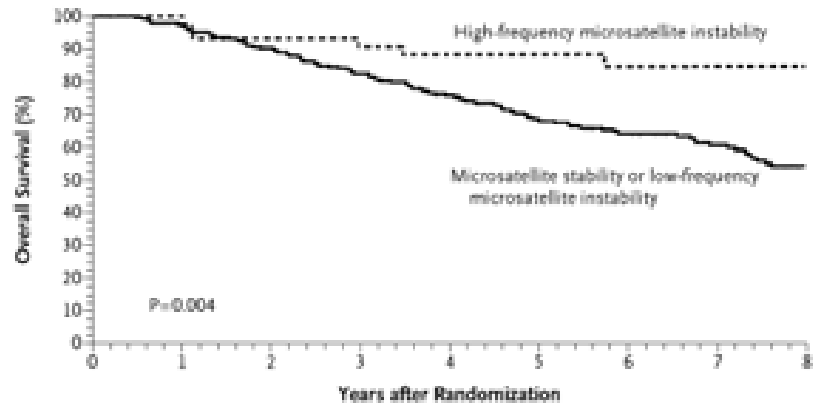
\* Plus-minus values are means ±SD. P values for the comparison between patients with tumors exhibiting high-frequency microsatellite instability and patients with tumors exhibiting microsatellite stability or low-frequency microsatellite instability were calculated by the chi-square test for all variables except the mean age at diagnosis, for which an unpaired t-test was used. Because of rounding, not all percentages total 100.

† Data pertaining to the site of the tumor and the tumor grade are not available for all 570 patients.

16.7%  
pacientes  
MSI-H

# Diferencias significativas en cuanto al beneficio al tratamiento en función del estatus MSI-H y MSS

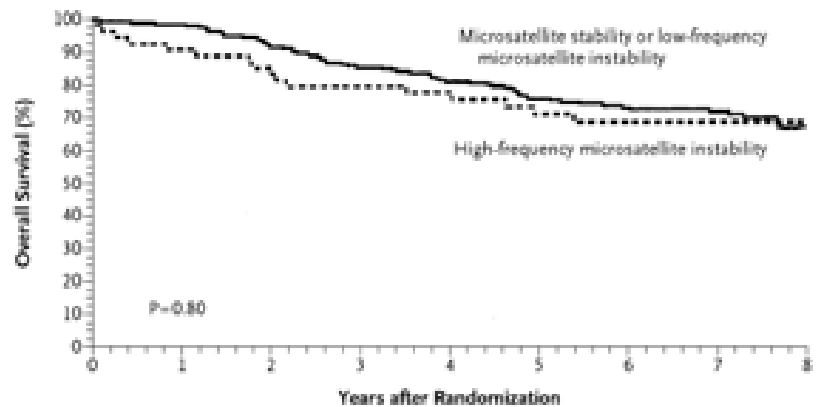
## A No Adjuvant Chemotherapy



### No. at Risk

Microsatellite stability or low-frequency microsatellite instability	245	238	220	200	176	137	105	82	53
High-frequency microsatellite instability	42	42	39	38	35	29	23	22	14

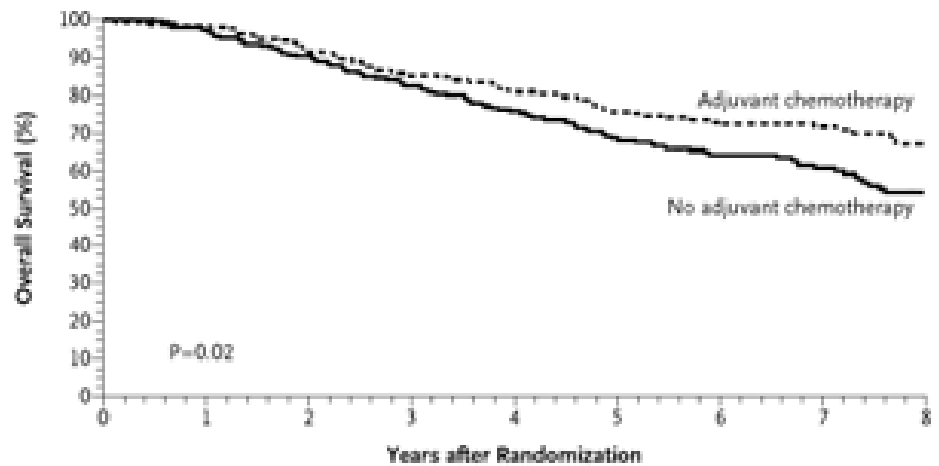
## B Adjuvant Chemotherapy



### No. at Risk

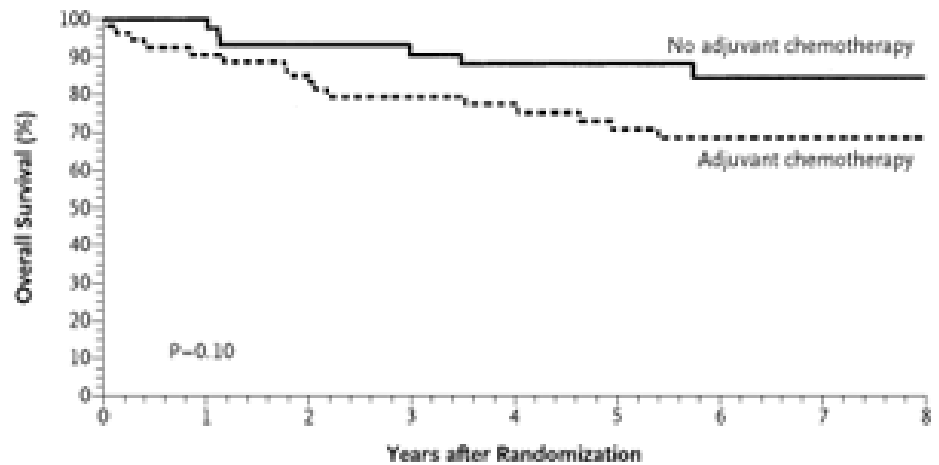
Microsatellite stability or low-frequency microsatellite instability	230	226	209	194	181	147	123	92	59
High-frequency microsatellite instability	53	48	45	41	38	31	24	19	14

**A Patients with Tumors Exhibiting Microsatellite Stability or Low-Frequency Microsatellite Instability**



No. at Risk	0	1	2	3	4	5	6	7	8
No adjuvant chemotherapy	245	238	220	200	176	137	105	82	53
Adjuvant chemotherapy	230	226	209	194	181	147	123	92	59

**B Patients with Tumors Exhibiting High-Frequency Microsatellite Instability**



No. at Risk	0	1	2	3	4	5	6	7	8
No adjuvant chemotherapy	42	42	39	38	35	29	23	22	14
Adjuvant chemotherapy	53	48	45	41	38	31	24	19	14

- Pacientes con CCR esporádico de tipo MSI-H se comportan como los pacientes con HNPCC en términos de supervivencia, gozando de un mejor pronóstico estadio por estadio que los pacientes con CCR MSS.
- Pacientes con CCR esporádico con MSS o L-MSI se benefician del tratamiento adyuvante con 5-FU
- En pacientes con tumores no avanzados (estadios II y III) con MSI-H, el régimen convencional de tratamiento posquirúrgico con 5-fluorouracilo no incrementa la supervivencia global ni el intervalo libre de enfermedad, e incluso pueden llegar a tener peor pronóstico

# Tumor Microsatellite Instability and Clinical Outcome in Young Patients with Colorectal Cancer

NEJM Gryfe et al. 2000

Pacientes con CCR con H-MSI tienen diferentes características clínicas que afectan al pronóstico

607 pacientes CCR en todos los estadios (incluyendo 173 Duke's B) (<50 años) estudio IMS

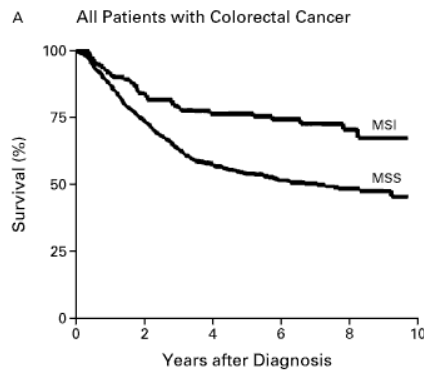
Características clínicas, supervivencia y H-MSI



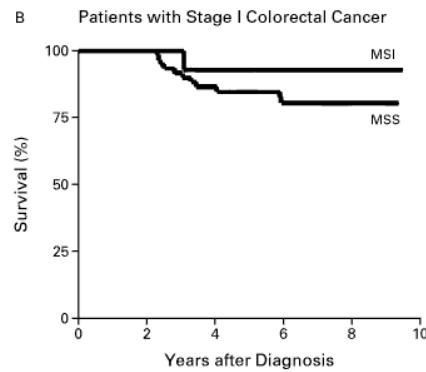


17% CCR H-MSI

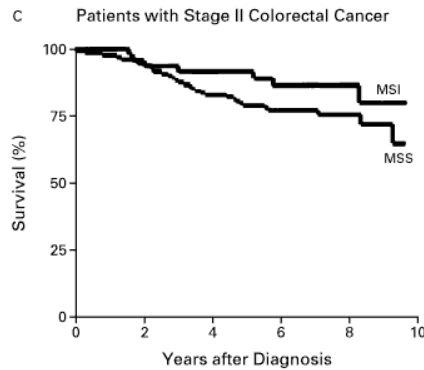
La supervivencia fue significativamente mejor en los pacientes con H-MSI que en pacientes con tumores de MSS (supervivencia 5 años 76% (MSI-H) vs 54% (L-MSI);  $P < 0.001$ )



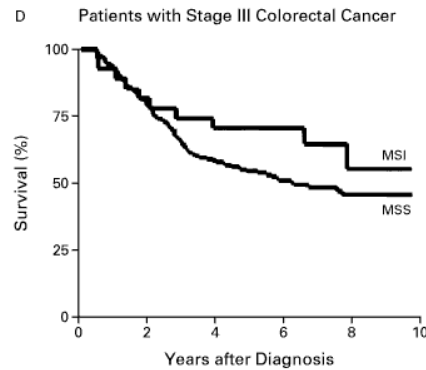
No. AT Risk		0	2	4	6	8	10
MSI	102	86	78	53	29	0	0
MSS	485	358	280	183	75	0	0



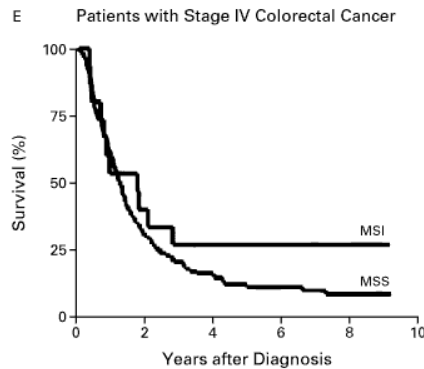
No. AT Risk		0	2	4	6	8	10
MSI	14	14	13	9	5	0	0
MSS	59	59	51	35	13	0	0



No. AT Risk		0	2	4	6	8	10
MSI	46	44	42	25	15	0	0
MSS	127	120	105	72	28	0	0



No. AT Risk		0	2	4	6	8	10
MSI	27	22	19	15	6	0	0
MSS	180	143	105	66	30	0	0



No. AT Risk		0	2	4	6	8	10
MSI	15	6	4	4	3	0	0
MSS	119	36	19	10	4	0	0

• H-MSI esta asociada con un aumento significativo de la supervivencia independientemente de otros factores pronóstico estándar

• CCR con MSI-H tienen una menor probabilidad de metastatizar en ganglios regionales o a distancia

Review. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes´B colorectal cancer patients: how much evidence is enough?

*Ann. Oncol.* 2003 Graziano & Cascinu

IMS 26 estudios y 17 investigaciones retrospectivas

asociación significativa entre MSI-H o expresión reducida de hMLH1 y hMSH2 y una mejora en el pronóstico.

5-20% tumores esporádicos H-MSI

# Characteristics of studies on the prognostic role of MSI

Ref	N° Ptes	Stage	% of MSI-H	Results
Guidoboni	118	B-C	40	MSI-H was independently associated with better survival. The difference in improved outcome was not significant in Dukes 'B patients only
Samowitz	1026	A-D	12	MSI-H was independently associated with better survival. The difference in improved outcome was not significant in Dukes 'B patients only
Halling	508	B-C	15	MSI-H was independently associated with improved survival. The difference in improved outcome was not significant in Dukes 'B patients only
Curran	159	B	14	MSI-H was not associated with significant differences in long-term survival.
Gryfe	607	A-D	17	MSI-H was independently associated with better survival. The prognostic role of MSI-H was found in all disease stages
Watanabe	121	B	21	MSI-H was not associated with significant differences in long-term survival.
Gervaz	88	B	24	MSI-H was not associated with significant differences in long-term survival.