

Sánchez, Ariel Germán

Validación, correlación clínica y análisis poblacional de un nuevo panel de marcadores microsatélites mononucleótidos en adenocarcinoma colorrectal

Tesis para la obtención del título de posgrado de

Doctor en Bioquímica

Director: Eynard, Héctor Gabriel

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.
Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Químicas

**Validación, Correlación Clínica y Análisis Poblacional de un
Nuevo Panel de Marcadores Microsatélites Mononucleótidos en
Adenocarcinoma Colorrectal**

**Tesis para optar al título de Doctor en Bioquímica
de la Universidad Católica de Córdoba
por**

ARIEL GERMAN SANCHEZ

Córdoba, 2017



Director: Prof. Dr. Hector Gabriel Eynard
Servicio de Cirugía del Hospital Privado Universitario de Córdoba

Co-Directora: Prof. Dra. Mariana Bollo
Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, Córdoba

Tribunal Examinador de Tesis Doctoral

Prof. Dr. Alberto Rosa
IRNASUS – CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba.
Servicio de Genética Médica y Laboratorio de Diagnóstico de Genética y Biología Molecular, Sanatorio
Allende, Córdoba

Prof. Dr. Nestor Garcia
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, CONICET. Universidad Nacional de Córdoba

Prof. Dra. Roxana Cano
Facultad de Ciencias Químicas. Unidad Asociada: Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas y de la Salud,
CONICET. Universidad Católica de Córdoba.

Comisión de Tesis

Prof. Dr. Alberto Rosa

IRNASUS – CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba.
Servicio de Genética Médica y Laboratorio de Diagnóstico de Genética y Biología Molecular, Sanatorio
Allende, Córdoba

Prof. Dra. Carla Astegiano

Laboratorio de Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG), Centro de Estudio de las Metabolopatías
Congénitas (CEMECO), Hospital de Niños, Córdoba y Universidad Católica de Córdoba).

Prof. Dra. Roxana Cano

Facultad de Ciencias Químicas. Unidad Asociada: Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas y de la Salud,
CONICET. Universidad Católica de Córdoba.

DEDICATORIA

A Mariana y Lucero, que donaron su tiempo de familia y paciencia para que pueda llevar a cabo este proyecto.

A mis Padres, quienes son los que dejan en mí, valores de vida y espíritu de crecimiento.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresita Alvarellós, sin su gran incentivo y predisposición, este trabajo no hubiera podido llevarse a cabo y su participación en el mismo fue esencial.

A mis Directores de Tesis Dr. Hector Eynard y Dra. Mariana Bollo, siempre estuvieron atentos a mis necesidades y confiaron en mi trabajo, aportando su experiencia, paciencia y tiempo para que pueda encaminar el estudio por la vía correcta.

Al Dr. Ignacio Juaneda, gracias a su profesionalidad, responsabilidad y constancia todas las muestras clínicas de los pacientes llegaron en forma correcta al laboratorio para ser analizadas, con su debido consentimiento informado.

Al Dr. Alberto Rosa, quien me orientó en varios puntos críticos del estudio para así sortear diferentes dificultades que se presentaron durante este trabajo.

A la Dra. Ana Basquiera, quien estuvo presente para resolver inquietudes inherentes al estudio.

A la Dra. Patricia Calafat y Bioq. Vanesa Palla, quienes colaboraron realizando los análisis de Inmunohistoquímica.

Al Dr. Aldo Eynard, quién aportando toda una vida dedicada a la investigación, accedió amablemente a corregir mis desvíos de redacción.

Al Dr. Emilio Palazzo, quien fue uno de los profesionales que motivó el estudio de los microsatélites en muestras clínicas de nuestro hospital.

A mis compañeras y colegas de trabajo, quienes colaboraron y siguieron de cerca mis tropiezos y victorias.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Cáncer Colorrectal (CCR).....	2
1.2 Epidemiología del CCR.....	3
1.2.1 Situación epidemiológica del CCR en Córdoba.....	8
1.3 Vías moleculares en el desarrollo del CCR.....	9
1.3.1 Vía Mutadora (Inestabilidad de microsatélites).....	10
1.3.2 Vía del fenotipo “metilador” (vía serrada).....	13
1.4 Síntomas en CCR.....	14
1.5 Diagnóstico del CCR.....	15
2. Importancia del estudio de Microsatélites en CCR.....	15
3. Fenotipo de cánceres colorrectales con presencia de inestabilidad microsatelital.....	17
4. Síndrome de Lynch (SLy).....	18
4.1 Técnicas de cribado en Síndrome de Lynch.....	20
4.1.1 Análisis de la inestabilidad de microsatélites.....	20
4.1.2 Electroforesis.....	22
4.1.2 Curvas de fusión de alta resolución.....	24
4.1.3 Inmunohistoquímica.....	26
5. Tratamiento del CCR.....	28
5.1 Tratamiento adyuvante en CCR con inestabilidad de microsatélites.....	28
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	30
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos.....	31
PACIENTES Y MÉTODOS.....	33
1. Pacientes.....	34
2. Extracción de ADN genómico.....	34

3. Estudio de inestabilidad en BAT25 y BAT26 mediante PCR-HRM	35
4. Estudio de inestabilidad en CAT25 mediante PCR-HRM	36
5. Análisis de microsatélites utilizando electroforesis capilar.....	36
6. Parámetros utilizados en la validación de las PCR-HRM.....	37
6.1 Especificidad y sensibilidad analítica:.....	37
6.2 Robustez:	37
6.3 Prueba de precision intra-corrída (repetibilidad):.....	37
6.4 Prueba de precisión inter-corrída (reproducibilidad):	38
7. Definición de presencia de inestabilidad de microsatélite positiva en los tumores.....	38
8. Análisis Inmunohistoquímico.....	38
9. Esquema de tratamiento adyuvante	39
10. Análisis estadístico	39
RESULTADOS	41
1. Desarrollo y validación de PCR-HRM para CAT25	42
1.1 Amplificación utilizando ISP	42
1.2 Amplificación utilizando NewCAT25	42
1.3 Amplificación utilizando SmallCAT25.....	43
1.4 Pruebas de robustez utilizando SmallCAT25.....	44
1.5 Pruebas de reproducibilidad utilizando SmallCAT25	47
1.6 Rango de normalidad para CAT25	48
1.7 Estudio de CAT25 en CCR	50
1.8 Sensibilidad y especificidad analítica de PCR-HRM para CAT25	52
1.9 Valores Predictivos para CAT25	53
2. Desarrollo y validación de PCR-HRM para BAT25	53
2.1 Amplificación del microsatélite BAT25.....	53
2.2 Pruebas de robustez para BAT25 mediante PCR-HRM.....	53
2.3 Pruebas de reproducibilidad para BAT25 mediante PCR-HRM.....	54
2.4 Rango de normalidad para BAT25	56

2.5 Estudio de BAT25 en CCR	56
2.6 Sensibilidad y Especificidad Analítica de PCR-HRM para BAT25	58
2.7 Valores Predictivos para BAT25	58
3. Desarrollo y validación de PCR-HRM para BAT26.....	59
3.1 Amplificación del microsatélite BAT26.....	59
3.2 Pruebas de robustez para BAT26 mediante PCR-HRM.....	59
3.3 Pruebas de reproducibilidad para BAT26 mediante PCR-HRM.....	60
3.4 Rango de normalidad para BAT26.....	61
3.5 Estudio de BAT26 en CCR	62
3.6 Sensibilidad y Especificidad Analítica de PCR-HRM para BAT26	64
3.7 Valores Predictivos para BAT26.....	64
4. Resultados de los tres marcadores	65
5. Inmunohistoquímica	67
6. Análisis de datos clínicos	71
6.1 Datos clínicos de pacientes y tumores.....	71
7. Correlación de los casos MSI(+) con los criterios de Bethesda	75
7.1 Desglose de pacientes con tumores MSI(+) y criterios de Bethesda modificados.....	76
7.1.1 Pacientes que cumplen criterios	76
7.1.2 Casos MSI(+) excluidos del cumplimiento de los criterios de Bethesda	76
8. Impacto de tumores MSI(+) en sobrevida y tratamiento.....	78
8.1 Sobrevida global y libre de enfermedad	78
8.2 Tratamiento adyuvante	79
8.3 Tratamiento adyuvante y estadio.....	81
8.4 Tratamiento neoadyuvante	85
DISCUSIÓN.....	86
1. Estudio de CAT25, BAT25, BAT26 en CCR utilizando PCR-HRM y electroforesis capilar	87
2. Inmunohistoquímica en CCR con MSI(+)	92
3. Correlación de los datos epidemiológicos y clínicos con resultados del estudio de MSI	94

4. Evaluación de los criterios de Bethesda	95
5. Análisis de sobrevida y tratamiento.....	99
CONCLUSIONES.....	104
BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXOS	119
ANEXO 1. Historia del Síndrome de Lynch y familia G.....	120
ANEXO 2. Criterios de Amsterdam y Bethesda	124
ANEXO 3. Interpretación de curvas de fusión de alta resolución.....	125
1. Equipamiento con capacidad para realizar curvas de fusión de alta resolución.....	128
ANEXO 4. Estadificación, sistema TNM y estadios en CCR.....	131
1.1 Agrupación de los estadios del cáncer.....	135

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracilo
ACCENT	<i>Adjuvant Colon Cancer Endpoints</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CASP2	Gen de la caspasa 2
CCR	Cáncer colorrectal
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CT	<i>Ciclos Threshold</i>
EC	Electroforesis capilar
ECO	<i>Ecotm Real-time PCR system</i>
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
FAP	Poliposis Adenomatosa Familiar
HNPCC	Cáncer colorrectal no polipósico hereditario
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
IARC	Agencia Internacional para la investigación del cáncer
IHQ	Inmunohistoquímica
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LV	Leucovorina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MLH1	Gen humano homólogo de mutL1
MMR	Sistema de reparación de <i>mismatch</i> del ADN
MSH2	Gen humano homólogo de mutS 2
MSH6	Gen humano homólogo de mutS 6
MSI	Inestabilidad de secuencias microsátélites
MSI-	Inestabilidad de secuencias microsátélites negativa
MSI+	Inestabilidad de secuencias microsátélites positiva
MSI-H	Inestabilidad de secuencias microsátélites alta
MSI-L	Inestabilidad de secuencias microsátélites baja
MSS	Secuencias microsátélites estables
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
pb	Pares de bases
PCN	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PMS1	Gen de la segregación postmeiotica incrementada tipo 1
PMS2	Gen de la segregación postmeiotica incrementada tipo 2
RG	Rotor-Gene tm 6000

SFC	Síndrome Familiar de Cáncer
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Libre de Enfermedad
SLy	Síndrome de Lynch
SP	Sangre Periférica
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>
EE.UU.	Estados Unidos
VLT	Voluntarios Libres de Tumor
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo
Z480	LightCycler [®] Z480

RESUMEN

El Síndrome de Lynch (SLy) es una enfermedad hereditaria que involucra, entre otros tumores, al cáncer colorrectal (CCR). El 95% de los casos de CCR relacionados a SLy presentan inestabilidad de secuencias microsatélites (MSI) en el ADN; de allí surge la importancia del estudio de estos fragmentos genómicos repetitivos en *tandem*. Además, el análisis de MSI se propone como una herramienta en la decisión de implementar tratamiento adyuvante. Se propuso estudiar la MSI a nivel clínico en casos de CCR en pacientes de nacionalidad argentina (Córdoba y provincias aledañas) y además realizar un análisis poblacional del grado de monomorfismo de los microsatélites BAT25 y BAT26, adicionando a CAT25, un nuevo marcador microsatélite aún no estudiado en Argentina.

Se estudiaron 110 pacientes adultos con diagnóstico de CCR; aquellos que presentaron inestabilidad demostrada en el análisis [MSI(+)], fueron correlacionados con los criterios de Bethesda modificados (CBM) y variables clínicas. Además, 9 de estos tumores fueron estudiados por inmunohistoquímica (IHQ) para identificación de enzimas reparadoras del ADN. El estudio poblacional de monomorfismo fue realizado en muestras de ADN de leucocitos de 208 personas adultas libres de tumor.

La frecuencia de MSI en los CCR analizados fue de 10% (11/110). Los resultados del análisis de CAT25 en MSI fueron comparables con los encontrados utilizando el panel completo en CCR. El estudio poblacional demostró cuasimonomorfismo en los microsatélites del panel. El análisis de la IHQ mostró expresión incorrecta de las enzimas reparadoras en 9/9 casos. La localización del tumor en colon derecho ($p=0,0001$), con característica histológica mucinosa ($p=0,003$) y el género femenino ($p=0,003$), tuvieron asociación con la condición MSI(+). En 10/11 pacientes con CCR MSI(+) pudieron aplicarse los CBM, 3 los cumplían y 7 no. La supervivencia global (SG) fue mejor en pacientes con CCR MSI(+) que en aquellos con CCR MSI(-), en tanto que el análisis de supervivencia libre de enfermedad (SLE) no mostró diferencias entre los grupos.

El porcentaje de MSI hallado en CCR concuerda con lo publicado anteriormente. La incorporación de CAT25 produjo resultados no reportados con anterioridad para Argentina, mostrando la mejor efectividad de los tres marcadores para identificar un tumor MSI(+). La condición cuasimonomórfica del panel, permite estudiarlos en el tumor sin dependencia de tejido normal. Según el cumplimiento de los CBM, 3/10 sugieren ser casos hereditarios y 7/10 esporádicos. Los hallazgos de SG pueden colaborar en la decisión de no suministrar terapia adyuvante en pacientes que poseen CCR MSI(+) en estadio II.

Palabras clave: Cáncer colorrectal- CAT25- Curvas de fusión de alta resolución- Inestabilidad de microsatélites

SUMMARY

Lynch syndrome (SLy) is an inherited disease that involves colorectal cancer (CCR), among other tumors. Microsatellite instability (MSI) is found in 95% of SLy-related cases; this is the reason why the study of these repetitive genomic fragments *in tandem* is relevant. In addition, MSI analysis has been proposed as a useful tool in decision-making of adjuvant treatment.

Our goals were to study MSI in Argentine patients with diagnosis of CRC (Córdoba and surrounding provinces) and to perform a population analysis of the degree of monomorphism of BAT25 and BAT26 microsatellites, incorporating CAT25, a new microsatellite marker that has not been studied in Argentina to date.

In this study, 110 adult patients with diagnosis of CRC were analyzed. Patients with CCR and instability demonstrated in the analysis [MSI(+)], were correlated with modified Bethesda criteria (CBM) and clinical variables. Besides, 9 from these MSI(+) tumors were studied by immunohistochemistry (IHC) technique for identification of DNA repair enzymes. The population-based monomorphism study was performed on leukocyte DNA samples from 208 tumor-free adult subjects.

The frequency of MSI in the analyzed CCR cases was 10% (11/110). The results of CAT25 analysis in MSI testing were comparable to those found using the complete panel in CCR. The population study demonstrated quasimonomorphism in the panel of microsatellites. IHC analysis showed incorrect expression of the repairing enzymes in 9/9 cases. Tumor location in the right colon ($p = 0.0001$), mucinous histological findings ($p = 0.003$) and female gender ($p = 0.003$), were associated with MSI(+) condition. In 10/11 patients with MSI(+) CCR, the CBM could be applied, 3 patients fulfilled the criteria and 7 did not. Overall survival (OS) was better in patients with MSI(+) CCR than in those with MSI(-) CCR, while disease-free survival (SLE) analysis did not show any differences between groups.

The percentage of MSI found in CCR was in accordance with previously published reports. The addition of CAT25 yielded unreported results in Argentina, showing the best effectiveness of the three markers to identify MSI(+) tumors. The quasimonomorphic condition of the panel allows studying the tumor without dependence from normal tissue. According to the compliance with the CBM, 3/10 patients appeared to be hereditary cases and 7/10 sporadic. The finding of OS can assist in the decision of avoid adjuvant therapy in patients with MSI(+) CCR in stages II.

Keywords: Colorectal cancer- CAT25- Microsatellite Instability- high resolution melting curves.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer Colorrectal (CCR)

El CCR es uno de los cánceres más estudiados, debido no solo a su alta prevalencia, sino también a la aparición de lesiones precursoras (adenomas tubulares, vellosos y serrados) que pueden identificarse mediante endoscopia, para luego ser extirpadas (1). Es una enfermedad multifactorial influenciada por determinantes genéticos y ambientales. En la actualidad, cuando se diagnostica un cáncer colorrectal, en más del 60% de los casos la enfermedad ya se encuentra avanzada a nivel regional o a distancia. El grado de avance es el principal factor que influye en la sobrevida global, que se ubica en alrededor del 60%. Así es que cuando el diagnóstico se efectúa en etapas tempranas (Estadios I y II), situación que ocurre sólo en el 37% de los casos, la sobrevida global puede superar el 90% (2).

Se estima que la dieta, el estilo de vida y otros factores no genéticos poseen un impacto elevado en el riesgo de desarrollar CCR; sin embargo, actualmente, algunas de estas variables son controversiales cuando se las evalúa para predisposición o protección en CCR, sobre todo los componentes de la dieta (3). Un estudio realizado en Córdoba, Argentina, encontró que la cocción de carnes a altas temperaturas y la cercanía de la fuente de calor a las mismas se correlacionaban con un incrementado riesgo de generación de CCR (4).

Los factores genéticos tienen un rol fundamental en la predisposición, iniciación y progresión del CCR (5). La disponibilidad de biopsias de CCR para realizar estudios genéticos ha hecho posible determinar cuáles mutaciones somáticas ocurren en ciertos genes durante esta secuencia de eventos y hasta se puede estimar en algunos casos el orden de aparición de estas alteraciones (5). Por ejemplo, las mutaciones en el gen APC (*Adenomatous polyposis coli*) que predispone a la Poliposis adenomatosa familiar (FAP) aparecen como un evento temprano, a menudo seguido por mutaciones en los genes de la familia RAS. Por el contrario, cambios en TP53 tienden a ocurrir tardíamente (6, 7).

El CCR es tradicionalmente dividido en esporádico y hereditario. La mayoría de los textos denotan que existe una tasa de 20 a 25% de CCR hereditarios, aunque la proporción de todos los casos que se consideren familiares depende del criterio que se utilice para definirlo como tal. Por ejemplo, de todos los pacientes con diagnóstico de CCR en Finlandia y Suecia, 11 a 13% tienen al menos un familiar de primer grado con CCR (8, 9) y en Australia esta condición es del 16% (10). Sin embargo, la proporción es mucho mayor si se consideran familiares de segundo y tercer grado. Es debatible considerar que una patología como el CCR es de origen hereditario cuando un paciente que presenta dicho tumor, posee familiares con cánceres de otro tipo, en particular aquellos que pueden ser causados por mutaciones en genes

que predisponen a más de un tipo de cáncer. Un estudio demostró que 53% de todos los probandos con CCR tenían familiares de primer grado con cáncer (8).

Con excepción de los síndromes de cáncer claramente de origen hereditarios, en el presente, no es posible determinar si un caso dado de cáncer diagnosticado en una familia posee predisposición heredada con otro integrante afectado, o se manifestó por simple desarrollo. Similarmente en un caso “esporádico”, la ausencia aparente de historia familiar de cáncer puede no reflejar la situación verdadera de un componente de predisposición heredado. Esto puede ocurrir por varias razones, tales como tamaño familiar pequeño, adopción, diagnóstico erróneo, azar y antecedentes familiares acotados. Por lo que la distinción entre los casos esporádicos y hereditarios es aún confusa para muchos casos.

Para estimar si una dada enfermedad es heredada o no, se pueden realizar dos tipos de estudios: uno es utilizando una cohorte poblacional, en donde se examinan las historias familiares para un determinado rasgo fenotípico desde una cohorte de individuos que presentan dicho rasgo. Se registra luego, el número de familiares de primer grado que poseen el rasgo fenotípico buscado. Esta proporción es comparada con la proporción esperada obtenida desde un grupo control, para de esa forma obtener una relación o tasa, a menudo referida como la tasa de riesgo familiar. Este método elimina la influencia de fenocopias (casos en los cuales el rasgo se presentó por azar en los familiares estudiados). Se han realizado estudios de esta clase que demuestran una significativa aunque moderada tasa de riesgo hereditario (2 a 4) para el CCR si se la compara con tumores de tiroides, testículo y laringe (tasas de riesgo ≥ 8) (11–13). La otra forma de obtener estos valores es el estudio en gemelos, en donde se minimiza el componente del ambiente cuando en estos casos es compartido (5). Un estudio que incluyó 44.788 pares de gemelos desde Suecia, Dinamarca y Finlandia, encontró que el CCR era el segundo en importancia (luego del cáncer de próstata) de acuerdo a su predisposición genética del 35% (14). Sin embargo, la identificación de casos hereditarios en CCR en el presente, no se ve reflejada en este porcentaje, por lo que se deduce que quedan componentes genéticos sin descubrir aún no relacionados a este cáncer, como por ejemplo, alelos alterados de baja penetrancia (15, 16).

1.2 Epidemiología del CCR

Según los últimos datos publicados desde la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en el año 2012, en el mundo, hubo 14,1 millones de nuevos

casos de cáncer y 8,2 millones de muertes debido a esta enfermedad. Los cánceres más comúnmente diagnosticados fueron: pulmón (1,82 millones), mama (1,67 millones) y CCR (1.36 millones) (17).

Según cifras del Instituto Nacional del Cáncer de Argentina, el CCR es el segundo tipo de cáncer por frecuencia poblacional; ya que representa el 11,8% de todos los casos en ambos sexos, solo superado por el de mama (16,8%). Además, este Instituto reporta que se diagnostican más de 13.000 nuevos casos por año y mueren más de 7.000 personas a causa de este cáncer en nuestro país.

Las siguientes figuras (Figuras 1, 2 y 3) fueron extraídas de la página web del IARC; en las mismas se puede visualizar desde un panorama general de todos los tipos de cáncer en el mundo, hasta la cantidad de casos de CCR en Argentina, notificando además su mortalidad.

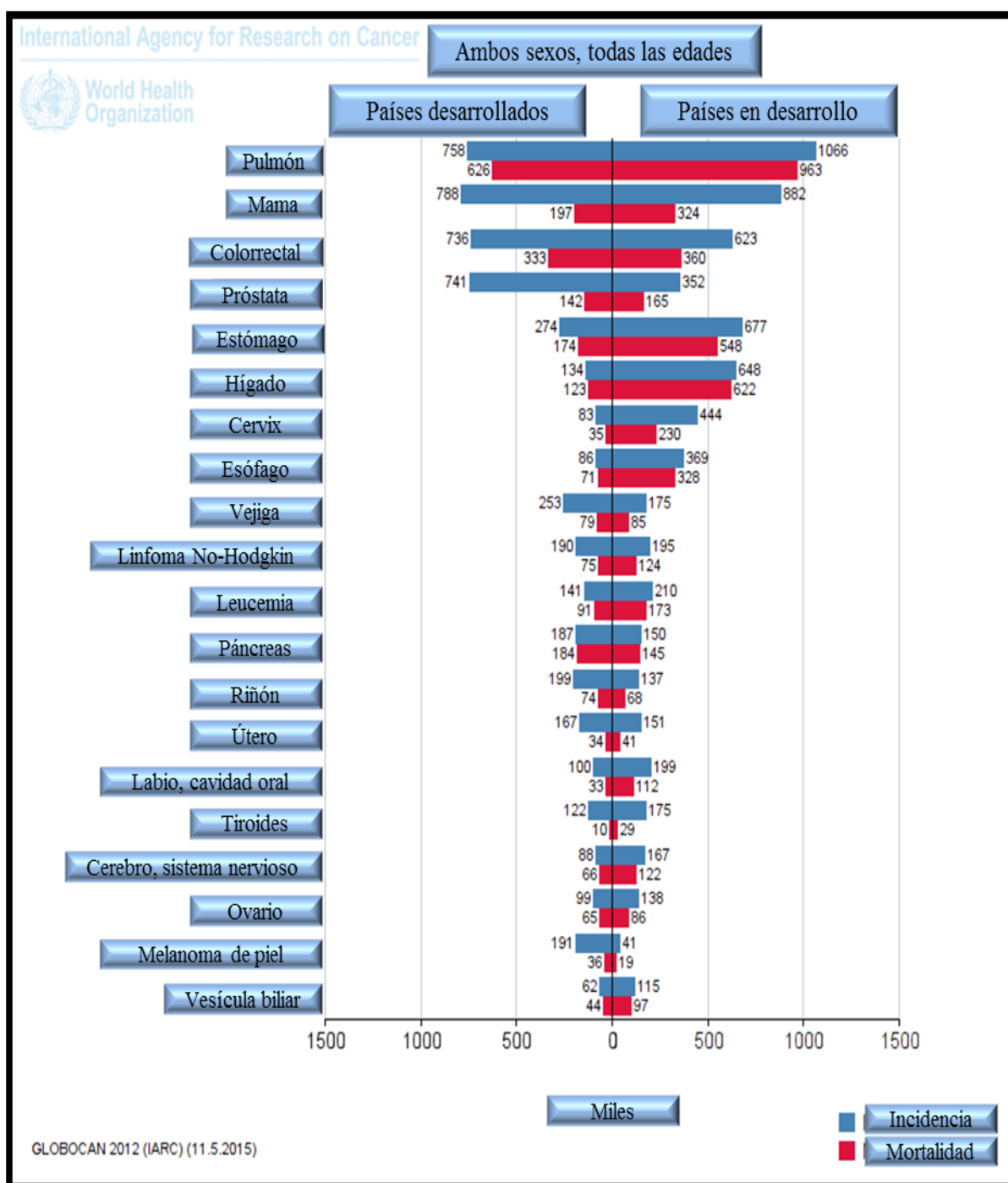


Figura 1. Distribución de los tipos de cáncer a nivel mundial

Se logra observar la distribución (en miles) de diferentes tipos de cáncer en regiones del mundo desarrolladas y en desarrollo. El CCR ocupa el cuarto y quinto lugar según su incidencia, en países desarrollados o en desarrollo respectivamente. Superado en ambas regiones por cáncer de pulmón y mama. En cuanto a mortalidad es la segunda causa de muerte en países desarrollados y la cuarta en países en desarrollo.

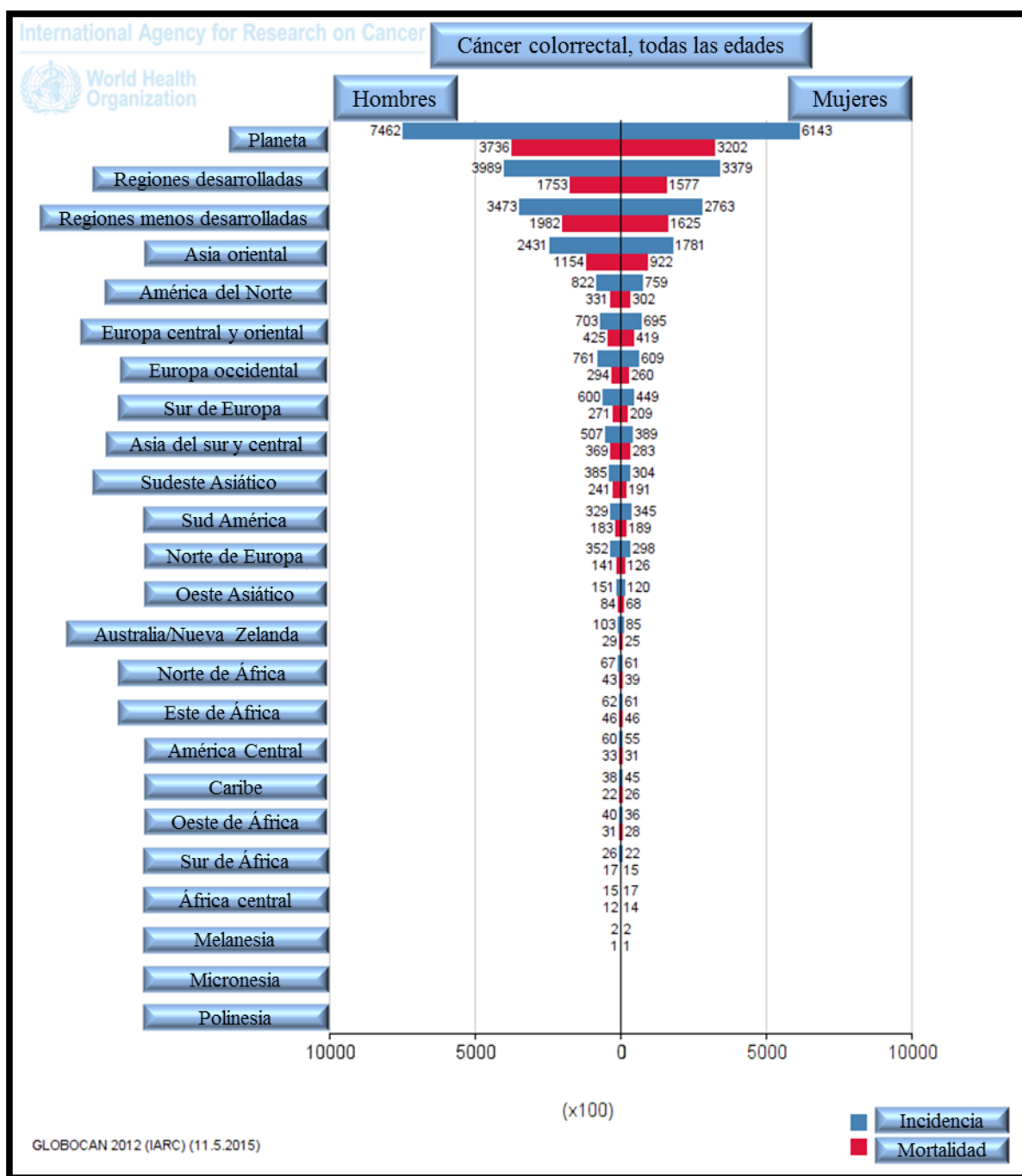


Figura 2. Distribución del Cáncer colorrectal a nivel mundial

Se puede apreciar la incidencia y mortalidad del CCR a nivel mundial para ambos sexos. En regiones más desarrolladas la incidencia del CCR es mayor que en regiones menos desarrolladas. Además existe un número mayor de casos en hombres que en mujeres independientemente de la región analizada.

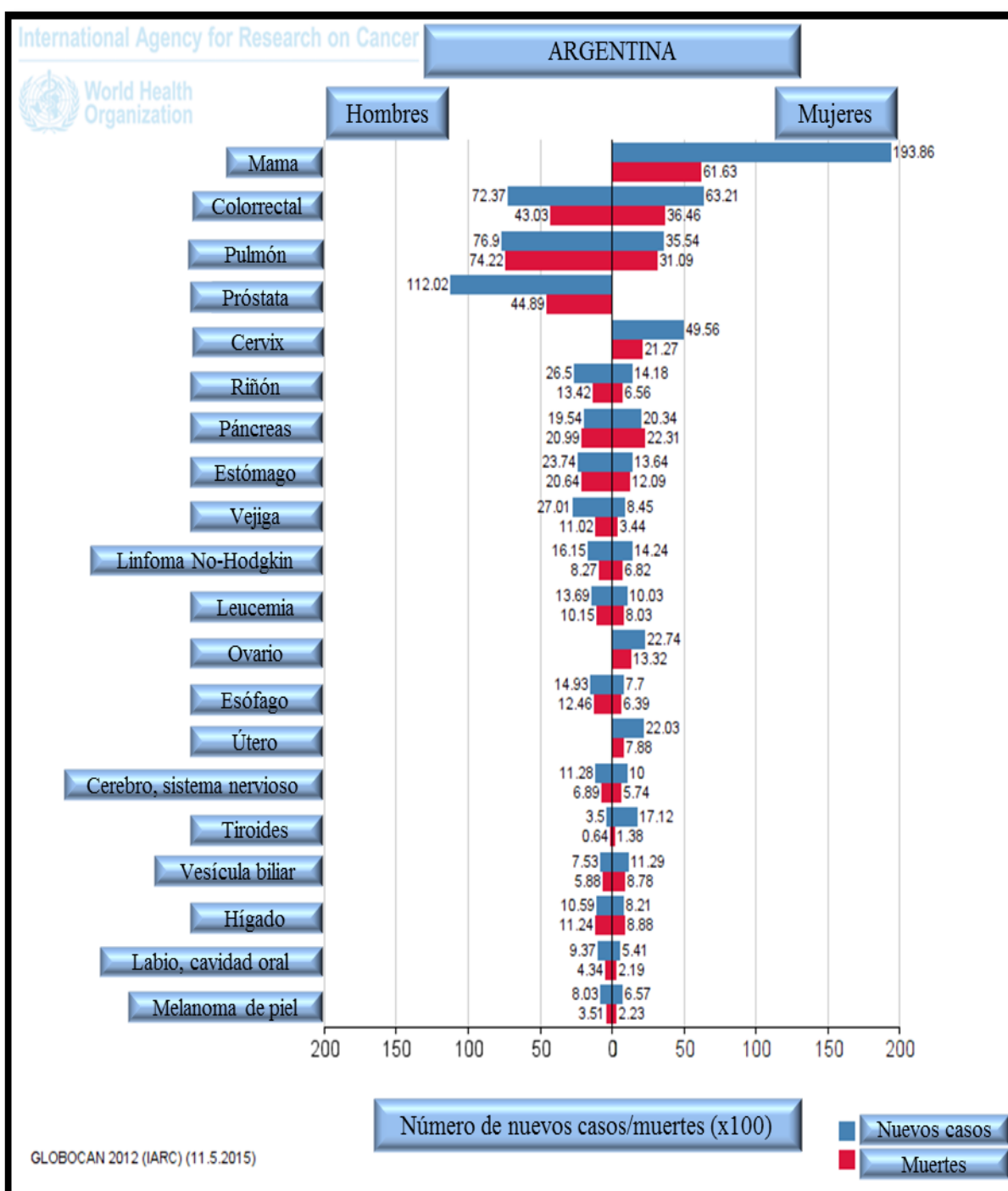


Figura 3. Cáncer colorrectal en Argentina

Se ve reflejada la situación del CCR en la Argentina, teniendo en cuenta los nuevos casos y muertes, ya sea en hombres como en mujeres. Se puede observar un número mayor de casos de CCR en hombres, en donde ocupa el tercer lugar ya que es precedido por el de próstata y pulmón. En tanto que en mujeres solo lo supera en número el cáncer de mama.

1.2.1 Situación epidemiológica del CCR en Córdoba

En el año 2014 se difundió un estudio (“Informe sobre cáncer en la Provincia de Córdoba, 2004-2009”) elaborado por el Registro de Tumores de la Provincia de Córdoba (Argentina), liderado por el Dr. Martín Alonso, el cual contiene datos epidemiológicos de todos los cánceres diagnosticados en la provincia de Córdoba.

La publicación da cuenta que 9.000 personas por año desarrollan cáncer en la provincia de Córdoba y cerca de 4.500 mueren por esta causa. Los datos corresponden al período 2004-2009.

Como ocurre a nivel mundial, el cáncer afecta fundamentalmente a adultos de edades avanzadas. En nuestra provincia, solo el 1,1% de todos los casos se presentan en menores de 15 años y el 45,4 % se manifiestan en mayores de 65 años.

Ambos sexos se ven afectados casi por igual: un 48,2% de los nuevos tumores diagnosticados correspondieron al sexo masculino, y 51,8% al sexo femenino, lo cual, no difiere de lo que ocurre a nivel nacional, aunque se registraron más muertes en hombres (61,4 %) que en mujeres (38,6 %).

La tasa de incidencia global de cáncer para el período 2004-2009 es de 220 casos por cada 100.000 hombres y 194,4 casos por cada 100.000 mujeres; sin incluir los casos de cáncer de piel no melanomas. Los tumores más frecuentes en hombres fueron los de próstata (18,9%), pulmón (13,8%) y colon (8,5%), mientras que en las mujeres fueron mama (32,5%), colon (7,7%) y pulmón (5,1%) (Figura 4).

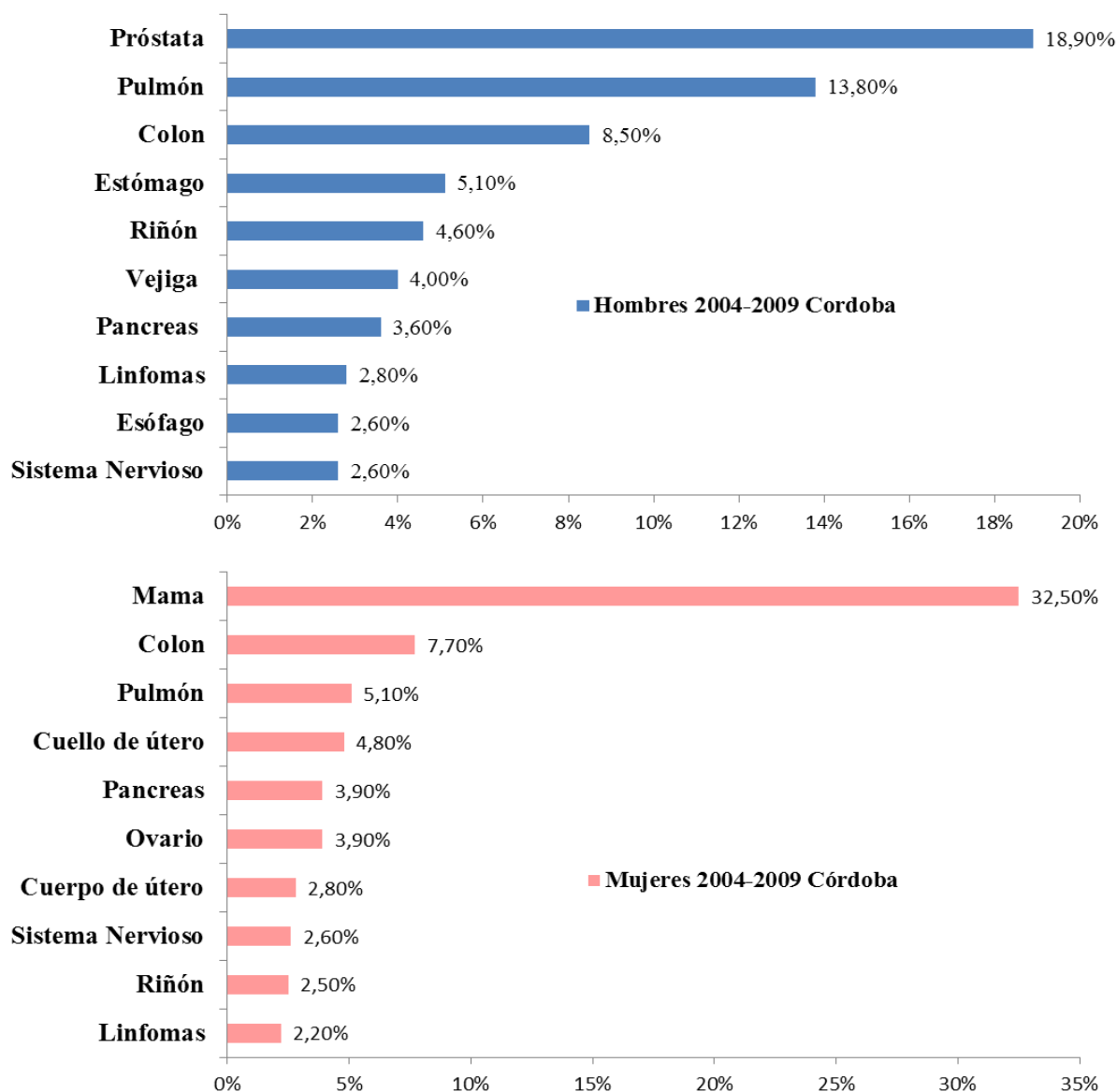


Figura 4. Epidemiología del cáncer en la provincia de Córdoba

Epidemiología del cáncer en Hombres y Mujeres de la Provincia de Córdoba, Argentina. Fuente: Extraído y modificado desde página web del Ministerio de salud de la provincia de Córdoba, Argentina, año 2016. (<http://prensa.cba.gov.ar/salud/se-presenta-el-informe-sobre-cancer-en-la-provincia/>)

1.3 Vías moleculares en el desarrollo del CCR

En general se acepta que el desarrollo de un tumor es provocado por cambios acumulativos en el genoma celular; estas alteraciones pueden ser genéticas (mutaciones) o epigenéticas, las cuales afectan la expresión de ciertos genes que directa o indirectamente son cruciales en la proliferación celular.

En 1990 Fearon y Vogelstein propusieron su modelo de carcinogénesis en CCR (6), el cual sugiere una serie de eventos que inician la alteración del tejido sano y promueven la transformación neoplásica del mismo hasta llegar a estadios malignos (Figura 5).

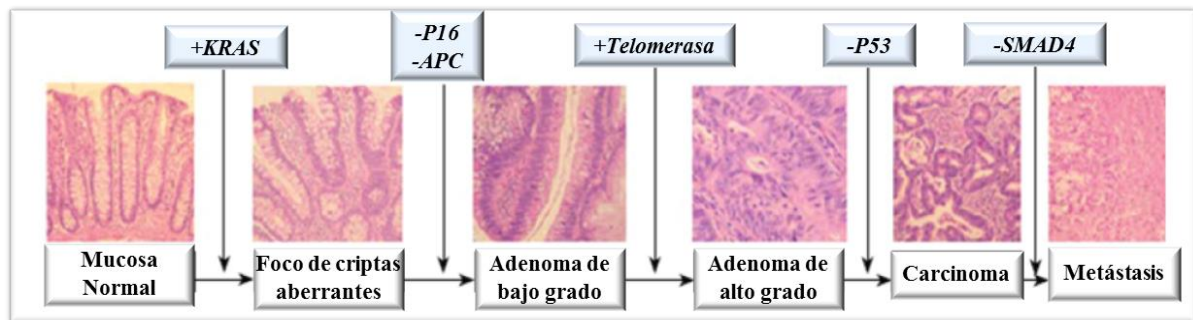


Figura 5. Modelo de progresión del cáncer colorrectal propuesto por Vogelstein et al. 1990.

Los paneles muestran a nivel histológico, las características morfológicas de la lesión en cada paso. Las alteraciones moleculares involucradas en cada transición están indicadas por encima de las flechas. (+)=mutación activante; (-)=mutación inactivante. Extraído y modificado desde Bosman y col., 2014(1)

Este modelo sentó las bases de un gran número de estudios que se han llevado a cabo sobre el tema. En el presente, se reconocen al menos tres vías por la que se puede generar este tipo de cáncer: Inestabilidad de microsatélites (Vía Mutadora), Inestabilidad cromosomal (Vía supresora), y el fenotipo metilador de islas CpG (1)(18, 19) aunque también se proponen otras como por ejemplo la generada por alteraciones en la expresión de MicroRNAs (20).

Nuestro estudio profundizará en la descripción de la vía mutadora y la relacionada al fenotipo metilador; debido a su relación con el objetivo de esta tesis.

1.3.1 Vía Mutadora (Inestabilidad de microsatélites)

Esta vía genera tumores hipermutadores que a diferencia de la vía supresora presentan poca aneuploidía. El prototipo de esta vía fue descubierto en bacterias entre 1970 - 1980 y se caracterizó durante la década de los '90 (21, 22) cuando se estudiaban los orígenes genéticos del cáncer de colon no poliposo hereditario (según sus siglas en inglés HNPCC), ahora conocido como Síndrome de Lynch (SLy). Este síndrome se caracteriza por presentar alteraciones genéticas en componentes del sistema reparador del ADN (MMR según sus siglas en inglés desde *Mismatch Repair*). El MMR está compuesto por una maquinaria enzimática capaz de corregir errores que suceden durante la replicación del ADN, como pueden ser un par de bases no apareadas, o pequeñas inserciones o deleciones.

En procariotas, el sistema MMR consiste de una familia de enzimas (mutS y mutL) que detectan errores en el ADN en la fase S del ciclo de replicación, por ejemplo aquellos que resultan de una incorporación errónea de bases en la nueva hebra provocando incompatibilidad de bases en el ADN. La denominación “mut” en los nombres de las enzimas reparadoras se refiere a la hipermutación generalizada que se observaba en las bacterias con pérdida de función de la proteína mutS (23).

El sistema MMR es más complejo en levaduras y mamíferos. Los genes homólogos de mutS y mutL de levaduras fueron descritos y se les otorgó el nombre de Mut S Homólogo (MSH) y Mut L Homólogo (MLH). Tiempo después, fueron también clonados desde el genoma de levaduras, copias adicionales de estos genes homólogos extendiendo los términos desde MSH1 hasta MSH6 y MLH1 hasta MLH3. Otro homólogo de MutL llamado gen de la segregación postmeiótica incrementada tipo 1 (PMS1 derivado de su nombre en inglés *post-meiotic segregation increased-1*) fue también identificado en levaduras. Cada uno de estos genes ha evolucionado desde las secuencias iniciales de mutS y mutL, y se han asociado con funciones específicas de reparación del ADN nuclear durante la meiosis o en ADN mitocondrial. Análisis filogenéticos indican que MSH1 fue el miembro inicial de la familia MutS y que los homólogos evolucionaron a partir de este gen progenitor, pero no hay homólogos del gen MSH1 en organismos superiores (24).

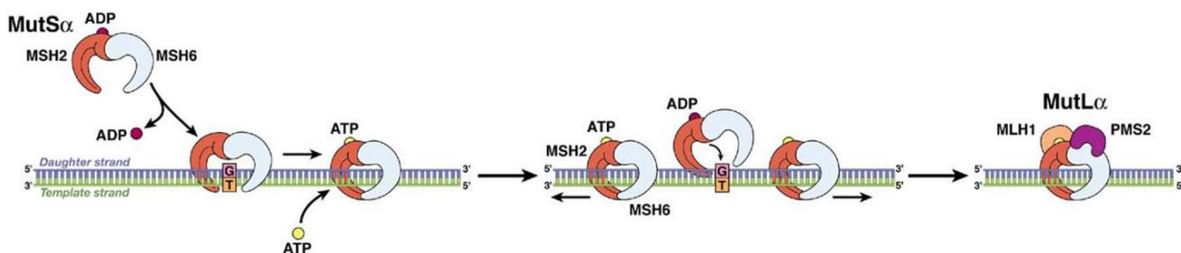
En levaduras y otros eucariotas las enzimas reparadoras no funcionan como homodímeros (lo cual sucede con mutS y mutL), sino que trabajan formando heterodímeros, así MSH2 forma un dímero con MSH6 o MSH3, dichas duplas se las conoce como MutS α o MutS β respectivamente (25). Estos complejos poseen diferentes habilidades para unirse a las secuencias de ADN mal apareadas y como resultado, levaduras y otros eucariotas tienen una gran capacidad para reconocer y reparar diferentes tipos de errores en la incorporación de bases en su ADN. Por ejemplo, MutS α (MSH2-MSH6) tiene una gran afinidad para reconocer apareamientos erróneos de simple base, de hecho MSH6 fue llamada inicialmente la “proteína de unión a Guanina-Timina” (26). Luego, se descubrió que el gen MSH3 formaba un heterodímero con MSH2 creando un complejo proteico con habilidad incrementada para unirse a bucles o lazos de ADN de mayor tamaño, generados por apareamientos erróneos de bases en la molécula (27). La evolución de los diversos homólogos de mutS incrementó la habilidad de las células para reconocer y reparar los errores en la síntesis del ADN y elevar la fidelidad de la replicación en organismos superiores. La filogenia y la bioquímica de los factores involucrados en el sistema MMR han sido ampliamente estudiadas (28, 29).

En mamíferos y específicamente en humanos también se encuentran gran parte de estos genes, el MLH1 (ubicación: 3p21), el MSH2 (ubicación: 2p16), el MSH6 (Ubicación:

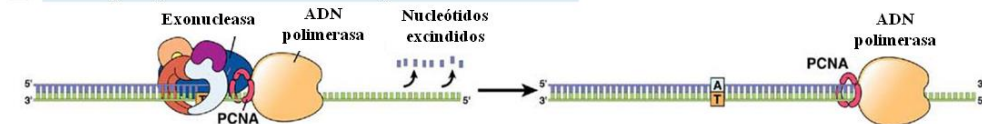
2p15), el PMS1 (ubicación: 2q31.1) y el PMS2 (gen de la segregación postmeiotica incrementada tipo 2) (ubicación:7p22). En humanos, todos ellos trabajan también como heterodímeros. Así, cuando MSH2–MSH6 (MutS α) o MSH2–MSH3 (MutS β) detectan las alteraciones en el ADN comentadas anteriormente, un segundo heterodímero, como MLH1–PMS2 (MutL α), MLH1–PMS1 (MutL β) o MLH1–MLH3 (MutL γ), se une también en el sitio que contiene el apareamiento erróneo y el proceso de reparación se lleva a cabo con la ayuda de otras enzimas como la exonucleasa I, polimerasa δ y DNA ligasa (Figura 6) (29).

Cuando ocurren mutaciones en ambas copias de un gen pilar del MMR (como por ejemplo MLH1), resultará en secuencias de ADN alteradas. Se sabe que cuando el sistema MMR no funciona correctamente la tasa de mutación aumenta unas 100 veces en células de mucosa colorrectal (30) y si estas alteraciones no pueden corregirse, se pueden generar mutaciones (puntuales y cambios de lectura) en genes fundamentales en el control del ciclo celular que promoverán una replicación celular descontrolada, generando una neoplasia.

A Reconocimiento enzimático de un par de bases mal apareado



B Complejo Exonucleasa y resíntesis



C Bucle de inserción/delección y variaciones en el complejo MutL

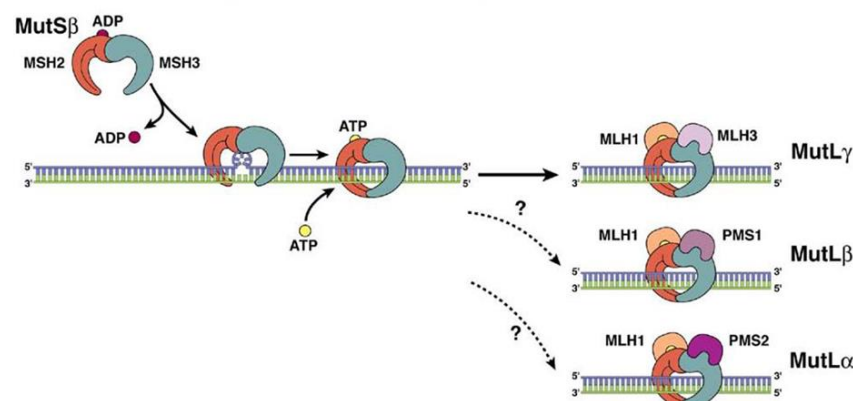


Figura 6. Funciones del sistema MMR

A- MSH2-MSH6(MutS α) reconoce a modo de pinza deslizante un par de bases desapareadas en donde la ADN polimerasa ha colocado una base equivocada (G) teniendo en cuenta la hebra madre (T). Este paso requiere de adenosina trifosfato (ATP) que proveerá de energía al pasar a adenosina difosfato (ADP). El complejo MutS α se retira del lugar y deja paso a MLH1-PMS2 (MutL α), el cual busca a la ADN polimerasa en la hebra creciente.
 B- MutL α encuentra e interactúa con la ADN polimerasa, la exonucleasa-1 y el antígeno nuclear de células en

proliferación (PCNA, derivado del inglés *proliferating cell nuclear antigen*). Este gran complejo escinde la hebra naciente en dirección de retroceso hasta el sitio del apareamiento incorrecto, cuando llega allí, ocurre la resíntesis y se corrige el error cometido. C- Posibilidades del MMR. Mientras MSH2-MSH6 reconoce un simple par de bases mal apareadas y pequeños bucles de inserción-delección, MSH2-MSH3(MutS β) complementa este trabajo reconociendo grandes bucles de este tipo. A la derecha se observan las posibles interacciones que se pueden generar a partir de los componentes del MMR formando diferentes dímeros MutL, como por ejemplo, MLH1 puede unirse a PMS2, PMS1 o MLH3. La interacción preferida de MSH2-MSH3 es con MLH1-MLH3(MutL γ), pero el rol preciso de los otros dímeros MutL en esta reacción no está aún entendido en su totalidad. Extraído y modificado de Boland y col. , 2010 (31).

Por otro lado, los microsatélites (secuencias repetitivas de 1 a 6 nucleótidos de ADN alojados a lo largo del genoma) se ven altamente afectados por el “deslizamiento anormal” (en inglés, *slippage*) de la polimerasa por ser secuencias repetidas. Esto crea alteraciones en el número de nucleótidos que componen el microsatélite, generando alelos con mayor o menor pares de bases que los originales. Nuevamente, si existiese una falla del MMR estos cambios no pueden ser reparados y se origina lo que se denomina **Inestabilidad de Microsatélites (MSI)**, derivado del inglés *Microsatellite instability*). Esta última es un buen marcador de errores en la reparación del ADN, y su estudio se expondrá con mayor profundidad más adelante.

1.3.2 Vía del fenotipo “metilador” (vía serrada)

En esta vía se ve exacerbada, por causas aún no determinadas, la metilación en las islas CpG pertenecientes a promotores de varios genes, lo que se traduce en un silenciamiento transcripcional de los mismos con consecuencias directas en genes involucrados en el control del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, reparación del ADN, invasión y adhesión celular. Estas islas están presentes en 40% de los promotores de genes en mamíferos y se trata de regiones que poseen altos niveles de Citocina-Guanina unidas por un grupo fosfato (“p” derivado del inglés phosphate), por ello la denominación CpG.

Se observó que lesiones mucosas no adenomatosas planas ubicadas a menudo en el colon derecho poseían un fenotipo metilador. Estas lesiones aparecen como resultado de una retención anormal de las células superficiales debido a hiperproliferación e inhibición de la pérdida de células ya muy diferenciadas (1). Están compuestas de glándulas con apariencia de dientes serrados. Además, existe un subtipo de estas alteraciones que tiene un significativo potencial maligno y son llamados adenomas serrados sésiles (1)

Sumado a la hipermetilación, en esta vía se destaca la presencia de la mutación V600E en el gen BRAF.

Por otro lado, la metilación en el promotor del gen MLH1 provoca falla en el sistema MMR con la consecuencia ya descrita en la vía mutadora.

1.4 Síntomas en CCR

Los síntomas destacados en CCR se describen en varios estudios (32, 33) y se detallan a continuación:

Sangre en las heces: Es uno de los síntomas más frecuentes. Puede tratarse de sangre roja, más habitual en tumores de recto, sigma y colon descendente, o de sangre negra, que se mezcla con las heces dando lugar a deposiciones de color negro también llamada melena. Estas aparecen generalmente cuando el tumor está situado en el colon ascendente. Este síntoma puede ser intermitente.

Anemia: Tras cierto tiempo de sangrado y cuando la hemorragia no es detectada o no se acude al médico para su diagnóstico y tratamiento, suele aparecer anemia que puede producir, en mayor o menor medida, una serie de síntomas como sensación de falta de aire, cansancio, palpitaciones y mareo.

Cambio de hábitos intestinales: Aparece diarrea o estreñimiento en personas con ritmo intestinal previo normal, aunque, lo más frecuente es que se intercalen periodos de estreñimiento con periodos de diarrea.

Heces más estrechas (en cinta): Generalmente esto se produce porque el tumor está estrechando el intestino y no permite el paso de las heces normalmente.

Tenesmo o sensación de evacuación incompleta: Suele aparecer en tumores localizados en el recto o en el colon izquierdo.

Dolor abdominal: Suele ser un síntoma frecuente, aunque generalmente, se trata de un dolor inespecífico. Cuando el tumor cierra parcialmente el calibre del tubo intestinal se produce un cuadro de dolor abdominal tipo cólico. Cuando el cierre es completo se acompaña de estreñimiento y vómitos.

Cansancio extremo o la pérdida de peso sin causa aparente: Son síntomas generales e inespecíficos que ocurren con frecuencia en determinadas enfermedades, entre las que se encuentran los tumores en este caso se debe a que se consumen nutrientes esenciales para su crecimiento.

1.5 Diagnóstico del CCR

El diagnóstico inicial del CCR generalmente se realiza con una colonoscopia y se confirma mediante el análisis histológico de una biopsia de la lesión. Si el hallazgo corrobora la presencia de un carcinoma, se procede a la estadificación mediante una tomografía computada de tórax, abdomen y pelvis para poder establecer el estadio, planificar una evaluación quirúrgica y una terapia óptima. Si el cáncer es rectal, se debería realizar una resonancia magnética nuclear de pelvis. Se solicitan además, los marcadores oncológicos antígeno carcinoembrionario (CEA) y CEA19-9.

2. Importancia del estudio de Microsatélites en CCR

Tiempo después de publicado el modelo genético de pasos múltiples para la carcinogénesis colorrectal (6), diferentes grupos de investigación comenzaron a indagar sobre posibles nuevos genes supresores utilizando técnicas innovadoras. Los trabajos de Peinado et al.(34) y Thibodeau et al.(35), sentaron las bases del estudio de los microsatélites en CCR, acuñando el término “inestabilidad de microsatélites”. Además pudieron observar que los CCR en estudio, se diagnosticaban en pacientes jóvenes y mostraban ausencias de mutaciones en KRAS o p53. Basado en estos hallazgos, los autores concluyeron que la MSI representaba una vía única de desarrollo tumoral y sugerían que la fidelidad alterada en la maquinaria de replicación celular podría ser causada por un defecto hereditario, aunque no tenían evidencia para demostrarlo (36). Los estudios llevados a cabo desde un consorcio internacional liderados por Bert Vogelstein en los Estados Unidos de América y Albert de la Chapelle en Finlandia encontraron, entre otros hallazgos, MSI en el 13% de los CCR esporádicos y debido a esto propusieron que los tumores hereditarios y una subclase de esporádicos compartían una vía común en el desarrollo tumoral (37, 38).

La MSI fue el primer marcador de ADN disponible para identificar CCR hereditario, aunque ninguno de los investigadores involucrados en su descubrimiento, llegó a dilucidar el mecanismo por el cual se generaba (31).

En el año 1994 se demostró que las alteraciones en los microsatélites no se debían a errores en la replicación sino que provenían de la falta de eficacia en la reparación del ADN (39).

Con el peso de estos descubrimientos tomaron énfasis los estudios en los microsatélites y su aplicación clínica en CCR (40). Estas secuencias repetitivas generalmente se encuentran en zonas no codificantes del genoma y poseen una alta tasa de mutación, por lo que son muy polimórficos (41). A pesar del alto grado de polimorfismo entre individuos, el patrón de microsatélites dentro del mismo individuo se mantiene estable si el sistema MMR funciona correctamente.

En 1997, el "*Taller Internacional sobre Inestabilidad de Microsatélites y fenotipo mutador en la detección del cáncer y predisposición familiar*", patrocinado por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), propuso un panel de cinco marcadores de microsatélites (conocidos como los marcadores o el panel de Bethesda) para evaluar la presencia de MSI: dos de ellos mononucleótidos (BAT25 número de acceso en GenBank: 9834508 y BAT26 número de acceso en GenBank: 9834505) y tres dinucleótidos (D17S250 número de acceso en GenBank: 177030, D5S346 número de acceso en GenBank: 181171 y D2S123)(42). A partir de este taller, los tumores con inestabilidad (alteración en tumor vs tejido normal) en dos o más de estos marcadores se definen como de inestabilidad alta, MSI-H. Los tumores con inestabilidad en un marcador o que no muestran la inestabilidad, se definen como de inestabilidad baja (MSI-L) o estables (MSS), respectivamente.

La reunión de Consenso de Bethesda en el año 2002 reconoció que los marcadores dinucleótidos tienen menor sensibilidad y especificidad que los mononucleótidos para identificar los tumores MSI-H y sugirió que los microsatélites mononucleótidos deberían sustituir a los dinucleótidos en el panel del NCI (43), pero no propusieron cuales utilizar, dejando la inquietud para investigaciones futuras en el tema.

Por otro lado, el estudio de la MSI no solo es importante en casos con sospecha de SLy sino que también puede ser usado para predecir la respuesta del paciente a la quimioterapia adyuvante; y aunque esto todavía es tema de debate, sustenta la importancia de su realización con el objetivo de determinar finalmente la influencia de la MSI como factor pronóstico y predictivo en el manejo de los CCR con MSI demostrada (44).

Por último, guías recientes sobre el uso de biomarcadores moleculares en CCR, destacan estudios sobre la importancia de la MSI y la selección de pacientes con indicación de inmunoterapia (45).

3. Fenotipo de cánceres colorrectales con presencia de inestabilidad microsateletal

Los CCR con presencia de MSI-H pueden ser esporádicos (cerca del 12% de todos los CCR) o hereditarios (cerca del 3% de todos los CCR) (46). Los primeros se desarrollan típicamente en colon proximal, con una preponderancia en género femenino (46). En tanto que los pacientes que presentan CCR a edad temprana, con localización proximal y que poseen MSI-H, están altamente asociados con el SLy (47), uno de los síndromes tumorales hereditarios más frecuentes.

Una característica histopatológica de los CCR con MSI-H es la alta tasa de linfocitos infiltrantes en el tumor (48), que generalmente se ve acompañada de folículos linfoides, lo cual es conocido como reacción “símil Crohn” (Figura 7). Este ambiente de alta respuesta inmune puede deberse a la aparición de nuevos epítopes antigénicos derivados de los errores cometidos por la falla en el sistema MMR (49) y además podría ser el responsable de generar un pronóstico clínico favorable (10% más de sobrevivida a 5 años), comparado con aquellos que no poseen MSI-H, pertenecientes al mismo estadio (50–52). Generalmente estos CCR con MSI-H presentan áreas de diferenciación mixta, ya sea medular, mucinosa y de células en anillo de sello (Figura 7). A su vez, su patrón de crecimiento es expansivo pero no tiende a la diseminación.

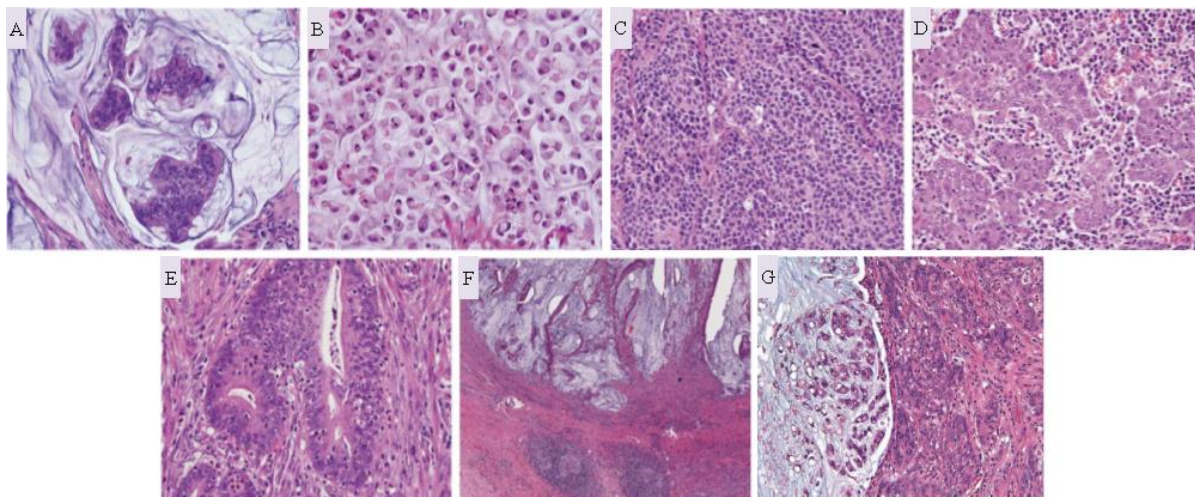


Figura 7. Características histológicas de los cánceres colorrectales con deficiencia en el sistema MMR

Los tipos tumorales característicos incluyen: mucinoso (A), células en anillo de sello (B) y medular (C y D). El tumor medular a la izquierda, está compuesto de láminas de células monomórficas sin una diferenciación glandular apreciable, el ejemplo de la derecha muestra una estructura trabecular y está asociado a un prominente infiltrado linfocitario. Las características histológicas típicas incluyen frecuentes linfocitos que infiltran el tumor (E), un borde pujante con reacción tipo Crohn (F) y heterogeneidad tumoral (G). En “G” también se puede apreciar mucina (izquierda) y un patrón cribiforme (derecha). (Tinción de Hematoxilina-eosina, visualización de A-E en 400X, F en 40X y G en 200X). Extraído y modificado de Bellizi y col., 2009 (23)

4. Síndrome de Lynch (SLy)

El SLy es una enfermedad hereditaria que involucra entre otros tumores al CCR. Los primeros hallazgos clínicos de este síndrome, se deben a las observaciones hechas en una familia (Familia G) en 1913 por el médico patólogo Aldred Warthin, profundizadas luego por el Dr. Henry Lynch (para mayor información histórica de este síndrome, léase Anexo I).

El SLy fue confirmado como una enfermedad autosómica dominante, pero la causa genética entre las mutaciones germinales y el síndrome comenzó a dilucidarse con el descubrimiento de las alteraciones en el gen MSH2 (53) y poco tiempo después el gen MLH1 fue también asociado con el SLy (54). En la actualidad se conoce que los genes involucrados en la mayoría de los casos de SLy son MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. Se estima que el 90% de los casos se originan por mutaciones en MLH1 y MSH2, en tanto que el resto se debe a alteraciones en MSH6 y PMS2 (55, 56). Además, se ha observado que deleciones de los sitios de poliadenilación del gen EPCAM, llevan a un silenciamiento epigenético de MSH2 contribuyendo a las alteraciones genéticas que también causan el SLy (56).

En el año 2000, Yan et al. (57) identificaron una transversión de Timina a Guanina en el sitio aceptor del empalme del exón 4 en el gen MSH2 en un miembro de la Familia G. A partir de allí el testeo de esta mutación en los otros miembros de la familia se facilitó. Este hallazgo, proveyó una oportunidad de mejorar el manejo clínico y la valoración del riesgo en esta gran familia con historia de alta tendencia hacia el desarrollo de cáncer.

Los familiares de primer grado de un paciente afectado con este síndrome tienen un 50% de probabilidad de heredar el gen mutado (46). La penetrancia de estas mutaciones es incompleta pero en un reciente meta-análisis que estudió personas portadoras de las mismas se pudo apreciar un riesgo aumentado de contraer la enfermedad en las primeras décadas de vida (≥ 100 veces a los 30 años) que disminuía con la edad (4 veces a los 70 años), siempre comparando con personas no portadoras (58). Se estima que estos portadores poseen 25-70% de posibilidades de desarrollar CCR y 30-70% de desarrollar Cáncer de Endometrio, además del riesgo de presentar estos y otros tipos de tumores que pueden ser Sincrónicos o Metacrónicos (55,59,60). El CCR perteneciente al SLy es el más frecuente de los cánceres de colon hereditarios pero solo es aproximadamente el 5% de todos los tipos de CCR (5).

Las principales características clínicas de este síndrome es su comienzo temprano (<45 años) sumado a la aparición de múltiples neoplasias (59). Los demás tumores que también pueden presentarse son de: estómago, ovario, uréter/pelvis renal, cerebro, intestino delgado, tracto hepatobiliar y piel (tumor sebáceo), con riesgos de presentación variables pero menores (Figura 8) (61, 62)

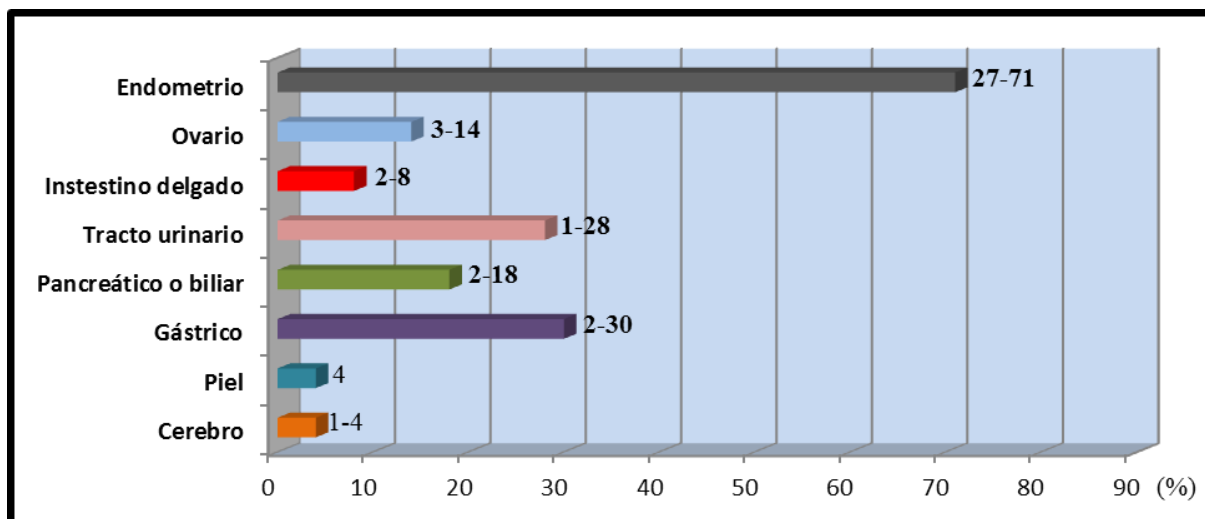


Figura 8. Riesgo estimado de cánceres extracolónicos

Se observa el riesgo (%) de contraer diferentes cánceres extracolónicos que posee una persona portadora de una mutación en el MMR a lo largo de su vida. Figura modificada desde Koornstra y col. (62).

En 1989 se conformó el Grupo Internacional Colaborativo en HNPCC y sus objetivos principales fueron: 1- Establecer criterios para la identificación de casos con HNPCC y así proveer una base uniforme para futuros estudios. 2- Mejorar la educación en los pacientes como en el cuerpo médico en HNPCC. 3- Promover estudios colaborativos internacionales en HNPCC. 4- Alentar la generación de registros nacionales o regionales de HNPCC (63). Este grupo elaboró los criterios de Ámsterdam I para la pesquisa de pacientes con sospecha de HNPCC (o SLy) y posteriormente estos criterios fueron ampliados (Ámsterdam II) para abarcar los casos extracolónicos (64) (Ver Anexo 2)

En 1997 en el workshop de Bethesda (42), además de proponer un panel de consenso de microsatélites, el Instituto Nacional del Cáncer (EE.UU.) confeccionó las guías o criterios de Bethesda para la selección de pacientes con CCR que deberían realizarse un estudio de MSI en el tumor. Estas guías fueron revisadas en 2004 (43) e incluyen historia familiar y características patológicas específicas del CCR tales como células en anillo de sello, reacción inflamatoria tipo Crohn, presencia de mucina y localización del CCR en colon derecho (Ver Anexo 2).

Existen muchos programas de cribado para el SLy, sin embargo, los protocolos son muy variados y dependen de cada centro de atención médica.

4.1 Técnicas de cribado en Síndrome de Lynch

4.1.1 Análisis de la inestabilidad de microsatélites

El ensayo de MSI es aceptado como método primario para la identificación de individuos con sospecha de SLy, ya que es un sello de la enfermedad (37).

El panel de microsatélites de Bethesda es ampliamente utilizado para el análisis de MSI, pero la sugerencia del cambio de los dinucleótidos por marcadores mononucleótidos en dicho panel realizada en 2002, orientó la búsqueda hacia nuevos marcadores microsatélites que cubrieran las nuevas necesidades del testeo (43).

Una característica muy valorada es la condición monomórfica o cuasimonórfica del marcador mononucleótido. Esto implica que, la variación de pares de bases en la extensión del marcador es nula o muy baja en todas las células del organismo en una población. Esta condición facilitaría el estudio, ya que no haría falta comparar el resultado de los marcadores en tejido tumoral *vs.* sano desde un mismo paciente, desestimando de esta forma la muestra de tejido sano (65). Además, también se busca que los marcadores elegidos para el estudio puedan correlacionarse con la falta de actividad de alguna de las enzimas reparadoras del ADN.

En 2005 se describió un nuevo marcador, el T25 (CAT25) mononucleótido, situado en la región 3' no traducida del gen de la caspasa 2 (CASP2) (7q34-q35) (GenBank adhesión no. NM_032982; nucleótidos posición de 2685 a 2709) que muestra un patrón cuasimonomórfico en tejido normal (66). El microsatélite CAT25 puede ser un marcador útil y sencillo para MSI, que parece mostrar la misma sensibilidad y especificidad del panel de Bethesda y puede ser estudiado en el ADN del tumor solamente debido a su condición cuasimonomórfica (66–68). Algunos autores han sugerido el uso de CAT25 en combinación con BAT25 y BAT26 (66, 69, 70). Un estudio reciente utiliza estos tres marcadores, y clasifica a los tumores como MSI-H cuando al menos 2 de los microsatélites están alterados (71).

La alta eficiencia que demostró CAT25 en todos los estudios que fue incluido nos alentó a utilizarlo en este trabajo de tesis. Al ser un marcador genético, puede variar según la población analizada y en Argentina aún no se han hecho estudios que demuestren su comportamiento poblacional y utilidad en los ensayos de MSI.

Entre las ventajas de realizar el análisis de MSI *vs* IHQ a las muestras de CCR, se puede destacar que realizando la MSI se podrían identificar tumores con alteraciones en el MMR cuando la IHQ muestra expresión “normal” de las proteínas reparadoras en el tejido

estudiado. Esto puede ocurrir en situaciones donde se presentan mutaciones que no generen proteínas truncas, como por ejemplo inserciones/deleciones que no cambian el marco de lectura, y permiten que se expresen productos estables, conservando su antigenicidad, pero no su función.

Además, debemos considerar que el resultado de la IHQ depende del panel con que se estudie la muestra. El MMR, como se mencionó anteriormente, está compuesto por las enzimas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, MSH3 y PMS1, en tanto que el panel que generalmente se utiliza para la realización del estudio analiza la presencia o ausencia de las primeras cuatro. En consecuencia, el análisis de MSI se presenta como más abarcativo ya que permite detectar la deficiencia en todas las enzimas descritas (y no descritas) hasta el momento del MMR (72).

Además, podemos agregar que la IHQ requiere más cantidad de muestra que cuando se realiza MSI, ya que se realizarán tantos cortes como tinciones, en tanto que desde un solo corte se puede extraer cantidad de ADN suficiente para realizar MSI (72). Por último, el resultado de una IHQ debe ser informado por un médico patólogo experimentado, ya que muchas veces pueden aparecer patrones focales o tinciones ambiguas que deberán ser correctamente identificadas. En tanto que la interpretación de un resultado de MSI hecho por electroforesis capilar (EC) requiere de un simple manejo de un programa de computación específico.

En cuanto a las limitaciones, se puede acotar que aunque la MSI es un sello del SLy no es específico del mismo. Se ha demostrado que entre 10-15% de los CCR esporádicos poseen inestabilidad en los microsatélites. En estos casos el principal responsable de la inestabilidad es la hipermetilación en el promotor del gen MLH1, provocando el consecuente silenciamiento transcripcional. La presencia de hipermetilación en MLH1 no excluye el hallazgo de mutaciones germinales en el MMR (73); de hecho esta alteración epigenética puede funcionar como “segundo golpe” anulando así el otro alelo del gen, favoreciendo el surgimiento de una neoplasia (74). La presencia de la mutación V600E en el gen BRAF se ha demostrado que posee correlación con los CCR esporádicos cuando también se demuestra hipermetilación en MLH1 (75). Además se ha demostrado la ausencia de V600E en tumores asociados a SLy (76, 77). Por lo tanto tumores con MSI positiva, que posean la mutación V600E y presencia de hipermetilación en MLH1, podrían clasificarse como esporádicos. Si las dos últimas alteraciones nombradas están ausentes, es altamente probable la presencia de una mutación germinal asociando ese tumor a un caso hereditario. Este breve algoritmo evitaría el secuenciamiento de los genes que codifican a las enzimas reparadoras y estudios de

rearrreglos del gen MLH1, ambos procedimientos engorrosos y no tan accesibles debido a su costo.

4.1.2 Electroforesis

La utilización de las secuencias microsatélites como marcadores genéticos se inicia con el desarrollo y generalización de la técnica Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, derivado del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (78). Al final de la década de 1980, se publican los primeros trabajos sobre el aislamiento y caracterización de los microsatélites (41, 79). A partir de entonces su uso se ha difundido rápidamente, revolucionando los campos de la biología molecular en genética de poblaciones, y con aplicaciones clínicas.

Cuando se estudian los microsatélites mediante corridas electroforéticas utilizando los revelados de plata (80) y radioisótopos (81), la interpretación de los resultados, puede tener complicaciones debidas a la formación de bandas secundarias (en inglés, “*stutter bands*”) que se presentan como artefactos de la amplificación, con longitud de bases similares al fragmento principal como consecuencia del *slippage* de la polimerasa (Figura 9).

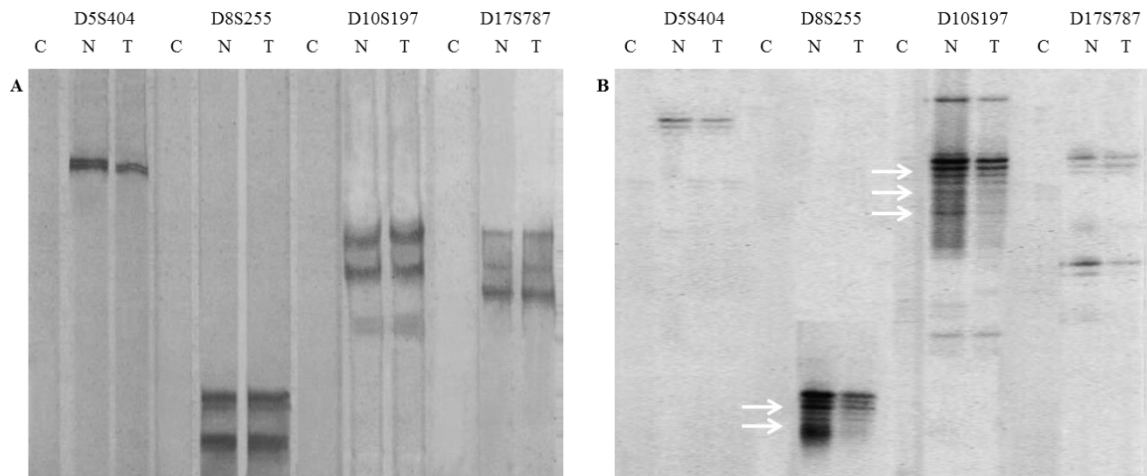


Figura 9. Análisis de microsatélites en gel de poliacrilamida

Se visualiza el análisis de 4 marcadores microsatélites (D5S404, D8S255, D10S197 y D17S787) en geles de poliacrilamida teñido con plata (A) y con exposición autoradiográfica (B). ADN tumoral (T), ADN normal (N), control (C) de PCR sin templado. El ADN había sido extraído desde un paciente con cáncer de colon. El patrón de bandas totales obtenido con los 2 métodos fue diferente. La autoradiografía mostró las clásicas “*stutter bands*”, las cuales estuvieron casi ausentes en los geles teñidos con plata. Sin embargo los 2 métodos mostraron patrones iguales para los cuatro marcadores en ADN tumoral y normal. Extraído y modificado desde Christensen y col., 1999 (82).

Como una mejora en los métodos de análisis de los microsatélites y con el advenimiento de la tecnología, emergió la electroforesis automatizada realizada en

secuenciadores de ADN (83, 84). En estos casos se deben marcar con un fluoróforo (Ej.: FAM) a uno de los dos iniciadores de la PCR que se haya diseñado para amplificar el microsatélite de interés. El amplicón es corrido en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y la marca fluorescente ayuda a identificar el producto que se ve reflejado en un programa de computadora, desde donde se puede visualizar un patrón de picos que nos dan idea de los tamaños moleculares (debido a que se analizan junto a un marcador de peso molecular), también se pueden extrapolar la altura y el área de cada pico visualizado. Esta metodología tiene la ventaja que disminuye (pero no elimina) el problema de las *stutter bands*, además se pueden utilizar cantidades mínimas de muestra de partida ya que este método es más sensible que la tinción con plata y el marcado con radioisótopos. Por último, estima como ya se dijo, el tamaño del microsatélite con buena exactitud (82).

En el año 2000, Berg et al. (85) llevaron a cabo el análisis de MSI mediante una PCR múltiple. En el mismo se amplificaron todos los microsatélites del panel de Bethesda en un mismo tubo y el producto final fue analizado mediante Electroforesis capilar (EC) en un secuenciador de ADN. Para este caso la estrategia de detección fue aprovechar las diferencias en los largos de los amplicones y además usar diferentes marcas fluorescentes para poder discriminar los distintos marcadores estudiados (Figura 10).

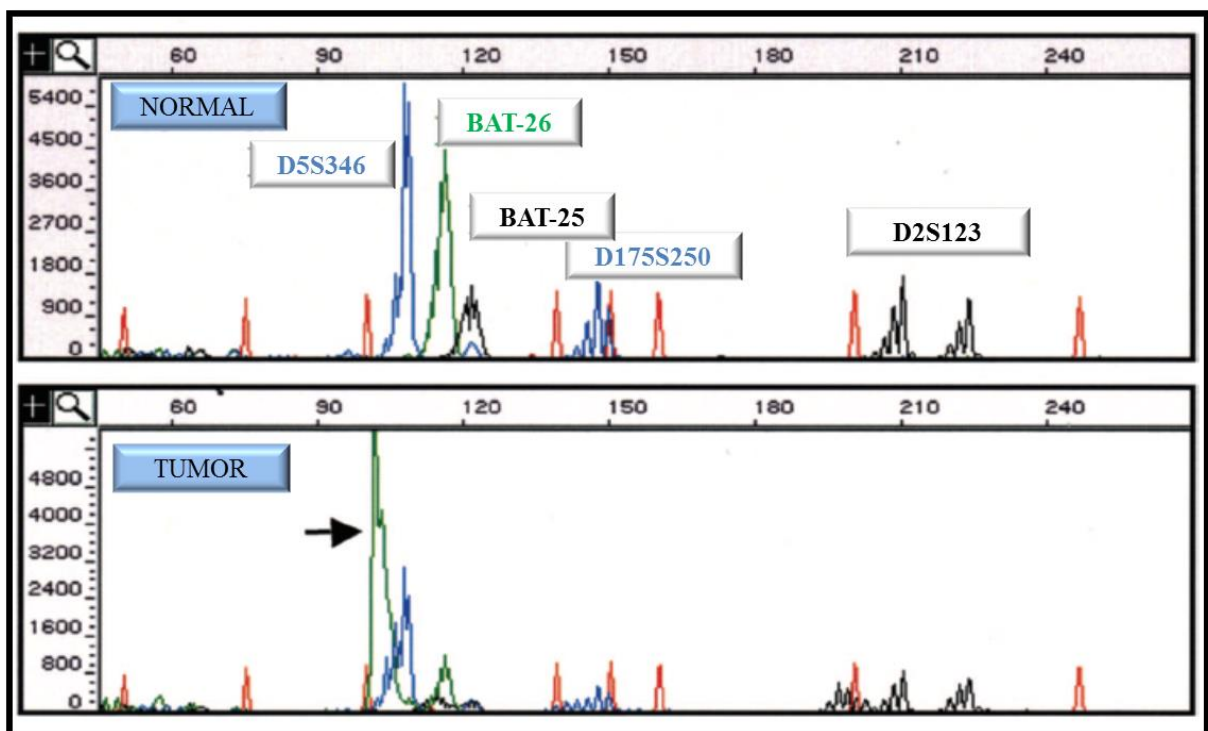


Figura 10. Análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar

En el eje "x" se muestra el tamaño del amplicón en pares de bases y el eje "y" denota la intensidad de fluorescencia del producto de PCR. Los picos en color rojo son parte del estándar interno que permite extrapolar el tamaño de las moléculas a analizar. Los picos verdes, azules y negros identifican a productos de amplificación de los marcadores microsatélites del panel de Bethesda. Se puede ver el corrimiento de picos en

BAT-26, BAT-25 y D2S123 en el tumor (flecha) con respecto a la muestra normal, esto denota inestabilidad de microsatélites alta en dicho tumor. Extraído y modificado desde Muryphy y col., 2006 (86)

Por otro lado, se demostró la factibilidad de detectar mediante EC un 10% de alelos mutados mezclados con 90% de alelos normales. Si se deseara aumentar aún más la sensibilidad, el análisis debería ser realizado con PCR individuales y no en formato múltiple, con ello se pueden detectar potencialmente 1 a 5 células tumorales en 100 normales. Estos hallazgos son de vital importancia para sustentar los estudios donde se analiza MSI a partir de un fragmento de biopsia tumoral (fresca o parafinada), ya que está escasamente disponible en los centros de salud del mundo, un microscopio con captura láser que permita a partir de una lámina de tejido tumoral realizar una microdissección y discriminar en el estudio, células cancerígenas de las normales del entorno para poder analizarlas por separado.

Como se puede observar en la Figura 10, las *stutter bands* detectadas por EC son frecuentes y generalmente son de menor o mayor tamaño que el producto principal, el cual, es considerado el pico que posee mayor intensidad de fluorescencia, es decir el de mayor altura y a partir de él, se extrapola el tamaño del microsatélite amplificado (85).

En la actualidad, la EC se afianzó como la técnica de elección para el estudio de los microsatélites (86, 87).

4.1.2 Curvas de fusión de alta resolución

El análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM, derivado del inglés *High Resolution Melting*) es una extensión de la técnica de fusión convencional (88, 89) que fue utilizada por muchos años en estudios de disociación del ADN orientados a composición y estructura de dicha molécula (90). La técnica de HRM fue en un principio creada utilizando iniciadores de la PCR marcados con un fluoróforo (91), con esta modificación y luego de terminada la reacción de amplificación, cualquier variación dentro del dominio de fusión que incluyera el iniciador marcado podía ser detectado mediante un análisis de fusión aun si fueran cambios de nucleótido simple. Luego de este descubrimiento, surgió la inquietud de que de esta forma sólo se estudiaba la región del iniciador pero las demás regiones del amplicón quedaban sin analizar. Debido a esto, se diseñó un análisis de HRM libre de sondas fluorescentes que permitió abarcar todo el largo del amplicón incluyendo la posición de los iniciadores (92). Las curvas de HRM, proveen información del ADN a estudiar teniendo en cuenta el comportamiento del mismo en la transición de doble hebra hacia simple hebra a medida que se incrementa la temperatura (como cualquier análisis de fusión), pero en este caso, el instrumento a utilizar debe poder coleccionar señales de fluorescencias con mayor

precisión óptica y térmica que los que realizan uno de fusión convencional, además del uso de reactivos creados para tal fin (intercalantes de ADN de tercera generación) y programas informáticos diseñados específicamente para la interpretación de curvas generadas con alta fidelidad.

Previo a la realización de un HRM, la secuencia de ADN a analizar debe estar en altas concentraciones, lo cual se logra mediante la amplificación de la secuencia diana por PCR en presencia de un reactivo intercalante fluorescente de tercera generación [EvaGreen™ (Biotum), LC Green® (Biofire Diagnostics), SYTO 9® (Invitrogen), entre otros]. Esta molécula no interactúa con ADN simple hebra, pero se intercala activamente cuando entra en contacto con ADN doble hebra, emitiendo fluorescencia solo en este estado. Este cambio de intensidad de fluorescencia es el que se examina con la mayor sensibilidad posible obteniendo datos sobre la disociación del ADN provocada por el aumento de la temperatura del sistema a la que fue expuesto. Inicialmente, la fluorescencia detectada es elevada ya que el ADN está en forma de doble hebra y luego gradualmente va disminuyendo a medida que la temperatura aumenta hasta llegar a la desnaturalización completa de la molécula generando la simple hebra y una fluorescencia cercana a cero. El comportamiento de la molécula durante este paso genera una curva que es característica de un segmento de ADN particular (Figura 11)

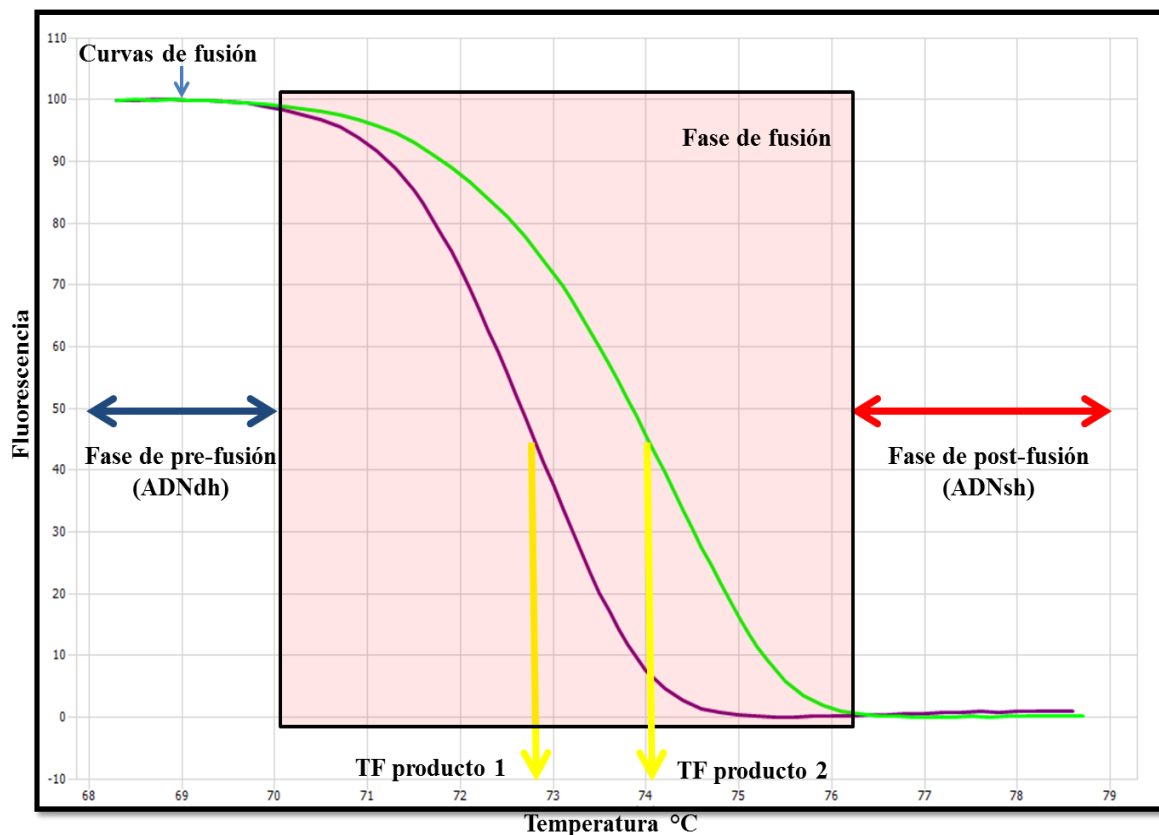


Figura 11. Etapas de una curva de HRM

Las curvas de fusión (verde y violeta) grafican la transición desde el alto nivel de fluorescencia inicial en la fase de pre-fusión transitando por un marcado descenso de fluorescencia de la fase de fusión para llegar a la

fluorescencia basal de la fase de post-fusión. La molécula intercalante de ADN sólo fluoresce cuando está unida a doble hebra (ADN_{dh}), a medida que aumenta la temperatura el ADN se va desnaturalizando generando ADN simple hebra (ADN_{sh}), esto provoca simultáneamente que el intercalante se vaya liberando del ADN y por lo tanto la fluorescencia disminuye en este proceso. El punto medio de la fase de fusión, en el cual ocurre el mayor cambio de fluorescencia se conoce como la temperatura de fusión (TF) o pico de fusión (por curvas con picos de temperaturas generados desde la derivada de las curvas de fusión) y define o identifica a un dado fragmento de ADN(producto 1 o 2).

Se generan así diferentes curvas de fusión, cuya forma dependerá del largo de la molécula de ADN a analizar, de su secuencia de bases y de la cantidad/composición de sales con la que está en contacto la molécula en estudio.

Los intercalantes de ADN de tercera generación no producen inhibición de la PCR en altas concentraciones como los de primera generación (Ej.: SYBR Green I)(93, 94), por ello pueden utilizarse grandes cantidades de los mismos, permitiendo una saturación en la unión a la molécula de ADN doble hebra, logrando de esta manera una mayor fidelidad de señal de fluorescencia (95).

La técnica de HRM basada en su simplicidad (por ejemplo, no requiere pasos post-PCR para llegar al resultado), flexibilidad, rapidez, bajo costo, naturaleza no destructiva del producto, sensibilidad y especificidad, se convirtió en una herramienta de elección. Además resulta una alternativa para las técnicas electroforéticas en el estudio de variantes en el ADN (96), pudiendo en potencia, ser aplicada para detectar todo tipo de modificaciones incluyendo: cambios de simple nucleótido, inserciones, deleciones, sustituciones de pares de bases (93) y estudios de metilación (97). Ver Anexo 3 para análisis de curvas HRM.

4.1.3 Inmunohistoquímica

A partir de 1996 aparecen los primeros anticuerpos comerciales para la detección de las enzimas del MMR. El primero estaba dirigido a detectar la proteína MSH2.

Los estudios iniciales en CCR utilizando IHQ, proponían un panel que incluía anticuerpos que reconocían a las proteínas generadas por los genes MLH1 y MSH2. Este panel acotado, resultó poseer una sensibilidad del 85% al predecir la presencia de una mutación germinal en los genes MLH1 y MSH2, algo más bajo que la que propone la MSI (93%). Esta baja sensibilidad se debía en mayor medida a la falta de eficacia de la detección de la IHQ para con MLH1 (74% de sensibilidad)(98).

Sin embargo, con la inclusión de los anticuerpos para detectar el producto de los genes MSH6 y PMS2, se logró incrementar significativamente la sensibilidad de la técnica, mostrando valores equivalentes a la prueba de MSI.

La mayoría de las mutaciones encontradas en el gen MSH2 generan una proteína trunca, por lo tanto los CCR que poseen una mutación en este gen mostrarán ausencia de dicha proteína en el estudio de IHQ (99).

Sin embargo, más de un tercio de las mutaciones en el gen MLH1 son del tipo sin sentido que pueden resultar en proteínas mutantes catalíticamente inactivas, pero antigénicamente intactas (100).

Como ya se explicó anteriormente, estas proteínas funcionan como heterodímeros: MSH2-MSH6 y MLH1-PMS2. Se ha demostrado, además, que las proteínas MSH2 y MLH1 son las de mayor importancia funcional en estos dímeros (101, 102). Las anomalías sufridas por estas proteínas principales pueden inducir la degradación proteolítica de todo el dímero [hay excepciones para algunas mutaciones en MLH1 que conservan la antigenicidad de la misma y el estudio de IHQ solo mostrará la falta de PMS2 (98)]. Como resultado, las mutaciones en MLH1 o MSH2 a menudo causan pérdida concurrente del heterodímero MLH1-PMS2 o MSH2-MSH6. Lo contrario, sin embargo no sucede, ya que cuando se presentan mutaciones en las proteínas secundarias MSH6 y PMS2, puede no ser concurrente con la pérdida de las proteínas principales MLH1 y MSH2. Esto se puede fundamentar en la utilización de otras proteínas como MSH3, MLH3 y PMS1 para el reemplazo de las proteínas secundarias afectadas. Por lo tanto mutaciones en MSH6 y PMS2 pueden mostrar solo su ausencia en la IHQ sin afectar la detección de las demás proteínas del MMR.

Como ventaja de la IHQ sobre la MSI podemos destacar que permite el direccionamiento del secuenciamiento hacia el gen que codifica la proteína alterada (o al menos que no se visualiza en la tinción). Esto simplifica el estudio posterior de secuenciamiento del ADN.

Por otro lado, se sabe que el secuenciamiento del ADN masivo o de nueva generación, ha disminuido costos y tiempos comparado con el método de secuenciación de Sanger. Un reciente estudio utiliza secuenciación masiva para el análisis de paneles de genes del MMR involucrados en el SLy. Los autores destacan que el ensayo puede hacerse al mismo costo que el secuenciamiento y el análisis de delección/duplicación de un único gen por los métodos tradicionales, logrando sensibilidad y exactitud equivalentes o superiores (103).

5. Tratamiento del CCR

El manejo clínico del paciente con diagnóstico de CCR es un procedimiento de múltiples aristas y su tratamiento depende de la localización, biología y extensión tumoral, sumado a las características generales del paciente.

Aunque una extracción quirúrgica óptima es aún el pilar principal de un tratamiento curativo, la versatilidad en el tratamiento adyuvante puede resultar en una sobrevida prolongada, mejor calidad de vida y también en una cura definitiva para ciertos pacientes. Las decisiones en cuanto al trato clínico y tratamiento deberían estar fundadas en guías basadas en la evidencia, como las de la Sociedad América de Oncología (ASCO, del inglés *American Society of Clinical Oncology*)(104), la Red Nacional del Cáncer (NCCN, del inglés *National Comprehensive Cancer Network*)(105) y la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO, del inglés *European Society for Medical Oncology*)(106, 107). Estas guías están diseñadas para establecer estrategias de tratamientos estandarizados para el CCR y poder así eliminar las diferencias entre los distintos centros de salud tratantes.

El CCR es estadificado usando el sistema TNM (Ver Anexo 4), el cual está claramente correlacionado con la sobrevida del paciente. La valoración preoperatoria debería enfocarse en la presencia de compromiso en nódulos linfáticos regionales y metástasis distantes. Esto se debe a que el tratamiento estándar es la resección quirúrgica de la/s lesión/es sin un tratamiento precedente, independientemente del estadio “T”. Una tomografía computada puede valorar exactamente la presencia de una metástasis distante, aun cuando esta técnica varía su exactitud con el estadio del cáncer de colon.

Por otro lado, se pueden analizar además factores pronósticos extraídos desde características propias del tumor: sistema TNM, invasión vascular, escala pronóstica modificada de Glasgow (108), morfometría nuclear (109), entre otros (ejemplo: CEA y CEA 19-9). Estos factores pueden colaborar en el manejo del paciente post cirugía.

5.1 Tratamiento adyuvante en CCR con inestabilidad de microsatélites

Los pacientes con CCR que poseen MSI y por lo tanto portadores de un tumor deficiente en el MMR, están asociados con un buen pronóstico de la enfermedad independientemente del estadio tumoral, a pesar del hecho de que este tipo de tumores esté

relacionado a una pobre diferenciación, con análisis histológico que ubicaría a los pacientes en un grupo de alto riesgo si se utilizara la clasificación histopatológica tradicional (110, 111).

Debido a esta condición de mejor sobrevida, o menor agresividad de la enfermedad, se debe terminar de definir si los pacientes con CCR y deficiencias en el MMR deben o no recibir terapia adyuvante; si fuera suministrada, cuál sería el esquema recomendado y además cual estadio se vería beneficiado. Los esquemas de tratamiento adyuvante que se han utilizado en pacientes con tumores deficientes en el MMR incluyen algunos o combinación de los siguientes compuestos: 5 fluorouracilo (5-FU), Capecitbina/Leucovorina, Oxaliplatino, Irinotecan. Los datos más relevantes y con mayor influencia han sido extraídos desde estudios realizados con la administración de 5-FU (112, 113).

En base al pormenorizado análisis precedente, proponemos a continuación Hipótesis y Objetivos de esta Tesis.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los marcadores CAT25, BAT25 y BAT26 son cuasimonomórficos en nuestra población (Córdoba y provincias aledañas) y su inestabilidad es potencialmente útil para detectar MSI en CCR mediante la metodología propuesta.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Objetivo general

Evaluar la frecuencia de la inestabilidad de secuencias microsatélites (MSI), mediante un panel de microsatélites mononucleótidos (CAT25, BAT26 y BAT25) a través de PCR-HRM, en CCR de pacientes de nuestra población, para así poder determinar el impacto en el pronóstico en términos de sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global.

Objetivos específicos

1. Desarrollar y validar una PCR-HRM para cada uno de los microsatélites a estudiar (BAT25, BAT26 y CAT25). Además, analizar su inestabilidad por esta metodología en CCR de pacientes de nuestra población.
2. Determinar si los marcadores microsatélites a estudiar son cuasimonomórficos en nuestra población.
3. Correlacionar los resultados del análisis de MSI con la edad, sexo, sintomatología, histología, localización del tumor, ambiente e inmunohistoquímica.
4. Correlacionar los resultados del análisis de MSI con los criterios de Bethesda modificados.

5. Determinar si la presencia de inestabilidad de microsatélites analizada con el panel propuesto, tiene impacto en el pronóstico de pacientes con CCR de acuerdo a sus estadios y los posibles tratamientos (terapia adyuvante, neoadyuvante).

PACIENTES Y MÉTODOS

1. Pacientes

El trabajo de tesis se basa en un estudio retrospectivo en el que se enrolaron 110 pacientes (43 mujeres / 67 hombres) de nacionalidad argentina (pertenecientes a las provincias de Córdoba y aledañas) tratados en el Hospital Privado de Córdoba desde 2006-2009. Los criterios de inclusión fueron: pacientes adultos, con nuevo diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal confirmado histológicamente, en cualquier estadio patológico. Fueron excluidos quienes presentaran múltiples pólipos.

El promedio de edad fue de 66 años (rango: 30-89 años).

El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud del Hospital Privado Universitario de Córdoba (número de protocolo HP 4-80). El proyecto fue inscripto en el Registro Provincial de Investigaciones en Salud (RePIS) bajo el número 553.

Los pacientes firmaron consentimiento informado para participar en el mismo. De cada paciente se obtuvo: historia médica y familiar, 5ml de sangre periférica (SP) y una muestra del tejido tumoral correspondiente al espécimen quirúrgico.

El seguimiento de los pacientes se realizó con el servicio de cabecera de acuerdo a las guías establecidas por la Sociedad Americana de Oncología (ASCO 2005).

Para llevar a cabo el estudio del grado de monomorfismo de los marcadores microsatélites, se analizó el ADN extraído de SP de 208 personas (104 mujeres/ 104 hombres) sin diagnóstico de tumor al momento de la obtención de la muestra, y por ello considerados para este estudio, voluntarios libres de tumor (VLT). Estas personas pertenecen a nuestra población [de descendencia: 56% Europea, 41% Nativo Americano y 3% Africana (114)].

2. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico desde tejido tumoral fresco (es decir, no embebido en parafina), se obtuvo incubando las muestras con Proteinasa K (Promega, Madison WI, USA) a una concentración de 2 mg/ml durante toda la noche a 56 °C, seguido de una extracción con el reactivo MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche applied science, Mannheim, Germany) en el sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos MagNA Pure Compact (Roche applied science, Mannheim, Germany).

El ADN de sangre periférica se aisló desde 400µl de sangre periférica mediante el sistema automatizado y los reactivos ya descritos.

La concentración y pureza del ADN aislado se determinaron mediante la medición de las lecturas a 260 y 280 nm con espectrofotómetro UV (MaestroNano[®], MaestroGen Inc, Hsinchu City, Taiwan).

3. Estudio de inestabilidad en BAT25 y BAT26 mediante PCR-HRM

El estudio para BAT25 y BAT26 mediante PCR-HRM se llevó a cabo como ya se ha descrito (115), pero con algunas modificaciones. Brevemente, la PCR en tiempo real se realizó en un volumen final de 10 µl que contenía 5µl de Kapa[™] HRM Fast master mix 2x con evagreen (Kapa Biosystems, Wilmington, USA), 2µl de MgCl₂ 25 mM (Kapa Biosystems, Wilmington, USA), 8pmol de cada cebador (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) para BAT26 (A 5- TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3 y B 5- AACCATTC AACATTTTAAACC-3), 25ng de ADN genómico y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen. Los volúmenes y reactivos utilizados para BAT25 fueron iguales a BAT26, salvo la utilización de 1µl de MgCl₂ 25 mM (Kapa Biosystems, Wilmington, USA) y los cebadores específicos para BAT25 (A 5-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3 y B 5-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3).

Condiciones de PCR-HRM: 1 etapa de 95°C por 3min., 40 ciclos de 95°C por 10seg., 55°C por 30 seg. 72°C por 20seg., el HRM: 1 etapa de 95°C por 10seg., 1 etapa a 44°C por 5seg. con elevación de la temperatura hasta 90°C con adquisición de fluorescencia cada 0,1°C desde los 65°C.

Los análisis fueron hechos en un termociclador Eco[™] Real-time PCR system (Illumina, San Diego, USA) el cual posee software y hardware específico para la realización de PCR-HRM.

Se consideró que un CCR poseía inestabilidad para BAT25 o BAT26 mediante PCR-HRM cuando las curvas (normalizadas y gráfica diferencial) generadas desde el ADN tumoral diferían de las generadas por el control normal (ADN de SP del paciente en estudio).

4. Estudio de inestabilidad en CAT25 mediante PCR-HRM

El estudio del marcador CAT25 se realizó con iniciadores sintéticos ya utilizados y publicados por otros autores (ISP) (66), y creando nuevos (NewCAT25: F; 5'-CCTGCTTATCTGAAACTTCCC-3' y R; 5'-TGAGATCGTGCCACTGC-3' y SmallCAT25: F; 5'-CTTCCCAACTTCCCTGTTCTTT-3' y R; 5'-GGCGACAGAGCGAGACT-3') desde el número de acceso NM_032982 del Genbank con el PrimerQuest software (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) (116).

Las condiciones de PCR-HRM para amplificar a CAT25 utilizando SmallCAT25 fueron las siguientes: 1 etapa de 95°C por 3min., 42ciclos de 95°C por 5seg. y 64°C por 30seg., el HRM: 1 etapa de 95°C por 10seg., 1 etapa a 40°C por 5seg. con elevación de la temperatura hasta 90°C y adquisición de fluorescencia desde los 65°C cada 0.1°C. Los reactivos se optimizaron de la siguiente forma: 0.2 µl de cada SmallCAT25 primer (10 pmol/µl), 5 µl de KapaTM HRM Fast master mix 2x (Kapa Biosystems, Wilmington, USA), 1.2 µl de MgCl₂ 25 mM (Kapa Biosystems, Wilmington, USA), 1 µl de ADN genómico (25ng/µl) y 2.4 µl de agua para llegar a 10 µl finales. El tiempo final de reacción fue de una hora.

Los análisis fueron realizados en un termociclador Ecotm Real-time PCR system (ECO) (Illumina, San Diego, USA) el cual posee software y hardware específico para la realización de PCR-HRM.

Se consideró que un CCR poseía inestabilidad para CAT25, mediante PCR-HRM, cuando las curvas de fusión de alta resolución generadas desde el ADN tumoral, diferían de las generadas por el control normal (ADN de SP del paciente en estudio).

5. Análisis de microsatélites utilizando electroforesis capilar

Para la validación de los resultados obtenidos por PCR-HRM de CAT25, BAT25 y BAT26 se recurrió a la EC (ABI3730XL Applied Biosystems, Foster city, USA) utilizando el servicio de la empresa Macrogen, Seoul, Korea. Los archivos de las corridas fueron analizados en nuestro laboratorio mediante Peak Scanner Software 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA). El pico con mayor fluorescencia fue considerado el representativo del producto de PCR y de este se dedujo el peso molecular del amplicón. Las muestras de CCR fueron consideradas a presentar inestabilidad en los marcadores

microsatélites analizados cuando los resultados de la EC mostraban un tamaño de amplicón diferente entre el generado por ADN tumoral y el ADN de SP del mismo paciente.

Para este estudio los cebadores SmallCAT25F y BAT25A fueron marcados con FAM, en tanto que BAT26A se marcó con el fluoróforo HEX y todas las marcas fueron colocadas en el extremo 5' de los oligonucleótidos. Las condiciones de ciclado fueron iguales a las utilizadas para realizar la PCR-HRM.

En el análisis del grado de monomorfosidad poblacional, un marcador fue considerado cuasimonomórfico cuando en el estudio global, el largo de sus productos de PCR no difieran en más de 3 pares de bases (pb) del producto más representativo del rango obtenido para dicho marcador, como ya ha sido propuesto (117).

6. Parámetros utilizados en la validación de las PCR-HRM

La validación de las PCR-HRM desarrolladas fue llevada a cabo de acuerdo a los lineamientos asentados en las guías para desarrollo de técnicas moleculares genéticas, como ya se ha publicado (118).

6.1 Especificidad y sensibilidad analítica: Estos parámetros fueron calculados teniendo en cuenta los resultados obtenidos desde el análisis de EC, asignando a esta técnica como patrón.

6.2 Robustez: Para la evaluación de la variación en la cantidad de partida de templado, el ADN de SP desde el grupo de voluntarios fue adicionado en triplicado a los tubos de reacción a diferentes concentraciones (10ng, 25ng, 40 ng y 80ng).

Además, para el microsatélite CAT25 se realizó la misma corrida usando las muestras con MSI(+) en tres diferentes termocicladores con capacidad para realizar una PCR-HRM: ECO, Rotor-Gene[™] 6000 (RG) (Qiagen, Hilden, Germany) y LightCycler[®] Z480 (Z480) (Roche applied science, Mannheim, Germany).

6.3 Prueba de precisión intra-corrída (repetibilidad): Para esta prueba un operador corrió 10 replicados de ADN tumoral (con inestabilidad demostrada) vs. 10 replicados de ADN de SP del mismo paciente en una misma corrida analítica.

6.4 Prueba de precisión inter-corrída (reproducibilidad): Para esta prueba, se corrieron los mismos tipos de muestra que la prueba anterior, pero en triplicado durante tres días diferentes.

7. Definición de presencia de inestabilidad de microsatélite positiva en los tumores

Un tumor fue considerado de poseer inestabilidad de microsatélites positiva MSI(+) cuando al menos dos de los tres marcadores estudiados presentaba dicha alteración en el tumor con respecto al tejido normal (SP en este caso)(71). Además, se asume como equivalentes a las nomenclaturas MSI(+) y MSI-H (ver discusión, página 88).

8. Análisis Inmunohistoquímico

Para este estudio se utilizaron muestras de biopsias y piezas quirúrgicas recibidas en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Privado. Las mismas fueron fijadas en formol al 10% y embebidas en parafina. De los tacos seleccionados se realizaron cortes de 5 μ m para la tinción inmunohistoquímica.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: MSH2 (CELL MARQUE, clon 6219-1129) dil 1/100; MSH6 (CELL MARQUE, clon 44), dil 1/50; MLH1 (VENTANA, clon M1); PMS2 (VENTANA, clon ERP3947).

La técnica se llevó a cabo en plataformas Benchmark GX – VENTANA (ROCHE) y se revelaron con Optiview DAB Detection Kit (Roche) en todos los casos. Para las marcaciones de MLH1 y PMS2 además se utilizó Optiview Amplification Kit (Roche) según protocolos sugeridos por el fabricante.

Posteriormente, los portaobjetos con las muestras fueron deshidratados y montados para su visualización y evaluación al microscopio óptico.

Interpretación de los resultados: una muestra se considera negativa (o con ausencia de la proteína MMR) cuando no se observa ningún núcleo celular tumoral con tinción positiva para la proteína en estudio. Un resultado “Focal”, significa que la tinción es positiva solo en una zona limitada del tejido, es decir no es homogénea en el tumor.

Como controles internos positivos, se considerará la tinción que se observa en los núcleos celulares de: linfocitos infiltrantes, células del estroma y mucosa normal.

9. Esquema de tratamiento adyuvante

A los pacientes con MSI(+) que recibieron tratamiento adyuvante, se los trató con 5-Fluorouracilo/Leucovorina o 5-Fluorouracilo/Leucovorina/oxaliplatino.

10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Infostat (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>). El test t para diferencia de medias, fue utilizado cuando la variable cumplió con los criterios de normalidad (shapiro Wilks). Cuando la variable no cumplía con dichos criterios, el test no paramétrico aplicado fue el de Mann-Whitney (Wilcoxon). Las curvas de Kaplan-meier fueron obtenidas para la comparación de las sobrevividas usando LogRank Test. El cálculo de Hazard Ratio fue realizado mediante MedCalc Statistical Software version 16.8 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2016). El cálculo del test exacto de Fisher desde tablas de contingencia fue realizado con GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software ,La Jolla California USA).

Se calculó la sensibilidad y la especificidad analítica de la PCR-HRM para CAT25, BAT25 y BAT26 en la detección de la inestabilidad en cada marcador. Para ello se definieron como verdaderos inestables (I+) o no inestables (I -) a los resultados obtenidos desde la EC. El cálculo se realizó de la siguiente forma: para sensibilidad analítica (esto es porcentaje de I+ si la inestabilidad realmente está presente en la muestra analizada), se tomó el número de verdaderos (+) dividiéndolo por el número de falsos negativos sumado al de verdaderos (+) y este resultado multiplicado por 100. Para especificidad analítica (esto es porcentaje de I - si la inestabilidad está realmente ausente), se tomó el número de verdaderos (-), sobre el número de falsos positivos sumado a los verdaderos (-) y este resultado multiplicado por 100.

El valor predictivo positivo (VPP) se define aquí como: la probabilidad de que un tumor posea MSI(+) si el resultado del análisis por los marcadores propuestos fuera positivo (es decir, al menos 2 marcadores positivos de los 3 en estudio) , y se calculó como sigue: $VPP = (VP / FP+VP) \times 100$

El valor predictivo negativo (VPN) se define aquí como: la probabilidad de que un tumor sea MSI (-) cuando el resultado del análisis de los marcadores propuestos fuera negativo, y se calculó de la siguiente forma: $VPN = (VN / FN +VN) \times 100$. VP: Verdaderos positivos, VN: Verdaderos negativos, VP: Verdaderos positivos, FP: Falsos positivos.

La sobrevida total o global fue definida como el tiempo desde la cirugía al día de la muerte (por cualquier causa). La sobrevida libre de enfermedad fue definida como el tiempo desde la cirugía a la fecha de recurrencia de la enfermedad, o fallecimiento. Ambas sobrevidas fueron calculadas a 5 años desde la cirugía.

RESULTADOS

1. Desarrollo y validación de PCR-HRM para CAT25

1.1 Amplificación utilizando ISP

Los ISP generan un amplicón de 150 pb y para desarrollar la reacción se variaron las condiciones de ciclado y la concentración de Mg^{2+} para tratar de lograr una amplificación óptima. Utilizando diferentes combinaciones de estas variables, siempre se obtuvieron productos de PCR con numerosos picos de fusión y altos Ciclos umbrales (CT, del inglés *Cycle Threshold*) (Figura 12). Estas características invalidan el análisis de una PCR-HRM y por lo tanto se desiste en utilizar ISP en este estudio.

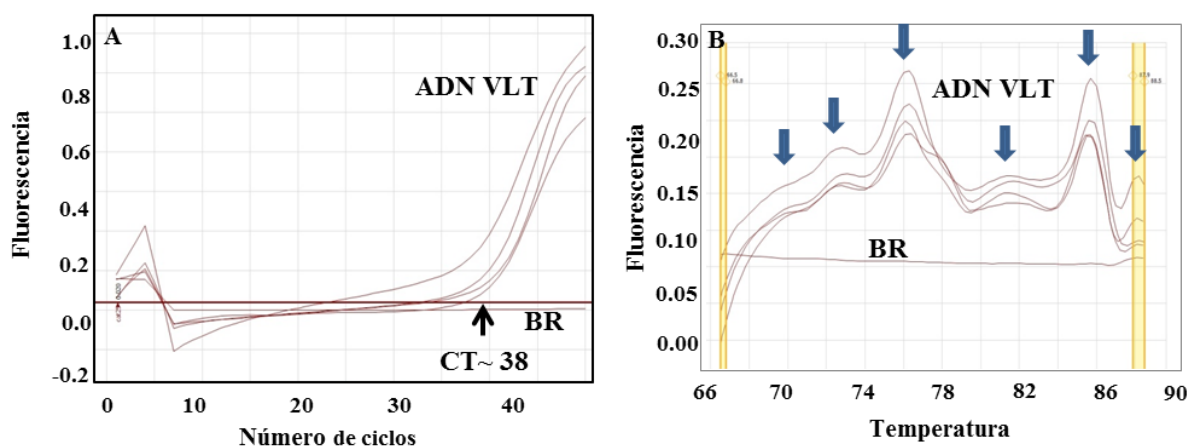


Figura 12. Amplificación de CAT25 utilizando ISP

A- Se observa la amplificación de 4 muestras de ADN de SP de la población VLT y un blanco de reacción (BR) utilizando los iniciadores ISP. Se visualizan aquí, CT elevados (~38). B- Se muestran los numerosos dominios o picos de fusión (flechas) correspondientes a diferentes productos generados en la amplificación.

1.2 Amplificación utilizando NewCAT25

Mediante el uso de NewCAT25 se buscó disminuir el tamaño del amplicón (119pb), y tratar de obtener un solo producto. Se probaron diferentes ciclados y se lograron amplificaciones con CT correctos (<30), pero el producto de la reacción terminaba generando dos picos de fusión que identificaban claramente dos productos o dos dominios de fusión en el mismo (Figura 13).

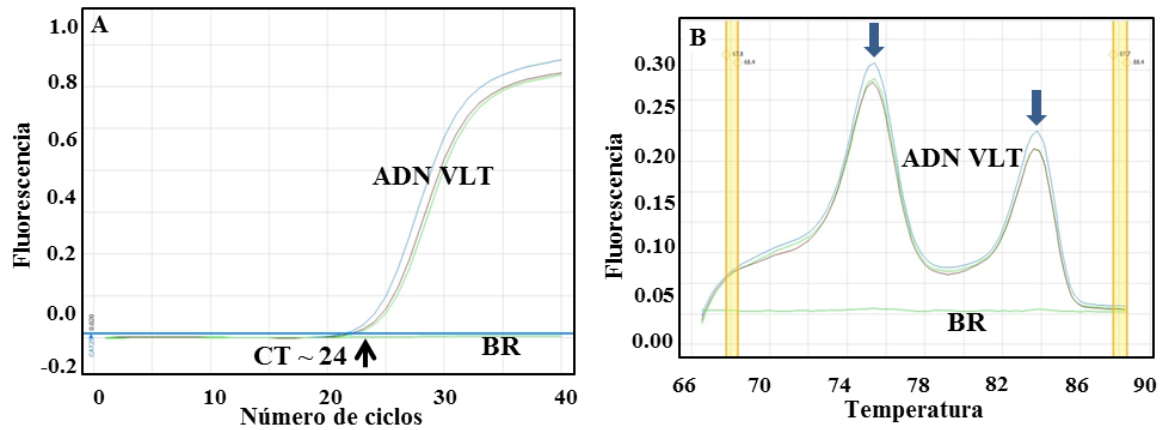


Figura 13. Amplificación de CAT25 utilizando newCAT25

A- Se puede apreciar la amplificación de 3 diferentes muestras de ADN de la población VLT y un blanco de reacción (BR), utilizando los iniciadores NewCAT25. Los CT son muy parejos y válidos (~24) para una PCR-HRM. B- Se observa claramente la aparición de 2 productos de amplificación (flechas).

1.3 Amplificación utilizando SmallCAT25

Se debió optimizar el ciclado-HRM y todos los componentes de la reacción ya que no hay publicado hasta el momento ningún estudio de CAT25 analizado mediante esta metodología. Con los iniciadores SmallCAT25 se acotó incluso más la región genómica en estudio, y con ellos se generó un solo amplicón de 65pb a CT esperados (< 30) (Figura 14). La optimización del ciclado-HRM y todos los componentes de esta reacción novel se pueden consultar en Pacientes y métodos.

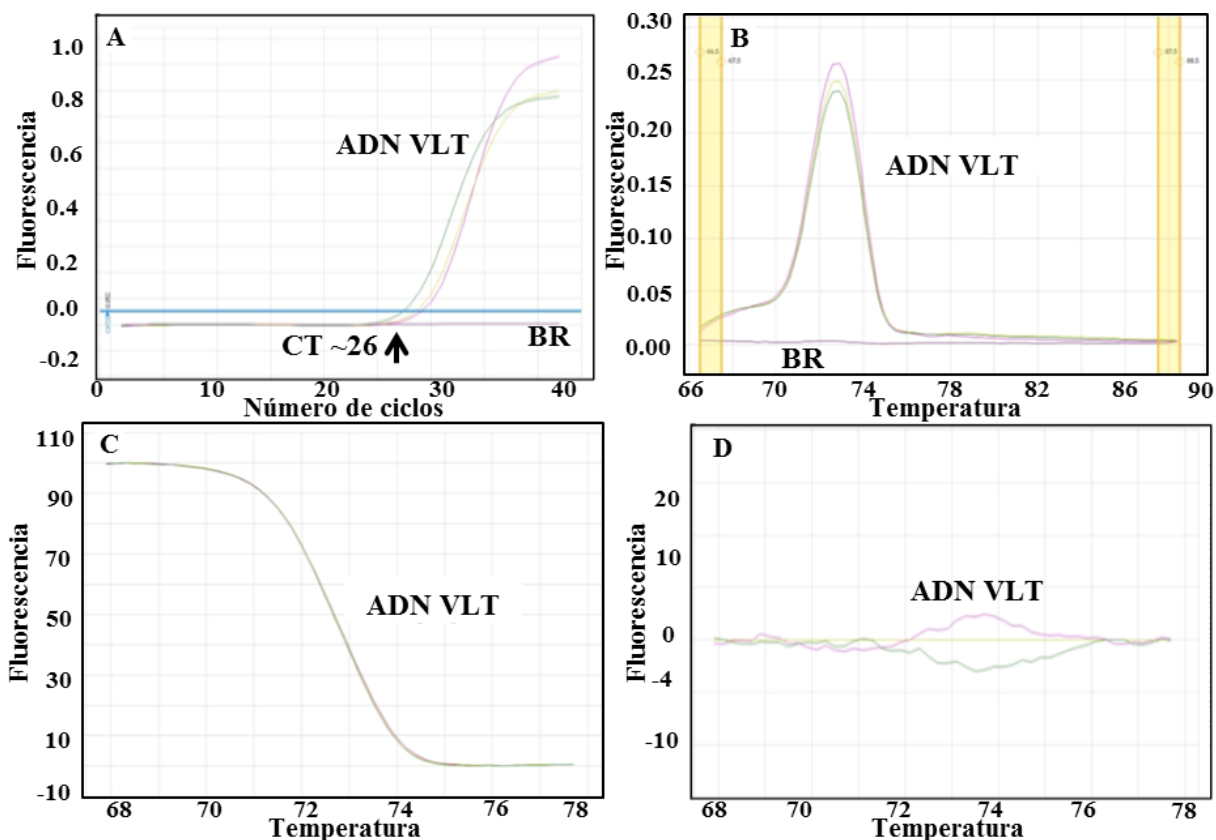


Figura 14. Amplificación de CAT25 utilizando SmallCAT25

A- Se puede ver la amplificación de 3 diferentes muestras de ADN de la población VLT y un blanco de reacción (BR). Aquí los CT se observan correctos (~26) para una PCR-HRM. B- Se corrobora la amplificación de solo un producto debido a la aparición de un único dominio de fusión. C- Curva normalizada de HRM de los productos de SmallCAT25. D- Gráfica diferencial de los productos de SmallCAT25

1.4 Pruebas de robustez utilizando SmallCAT25

Como se describió previamente en Pacientes y métodos, fueron analizadas diferentes concentraciones de ADN genómico desde el grupo VLT. Al colocar 80 ng/reacción las curvas de amplificación parecen saturadas y las curvas de HRM normalizadas podrían llevar a interpretaciones erróneas, en tanto que el rango de 40 a 10 ng/reacción fue el de mejor exactitud en la interpretación de las curvas de HRM (Figura 15).

Para todas las pruebas y análisis subsiguientes de CAT25 se utilizó ADN genómico en una concentración de 25 ng/reacción.

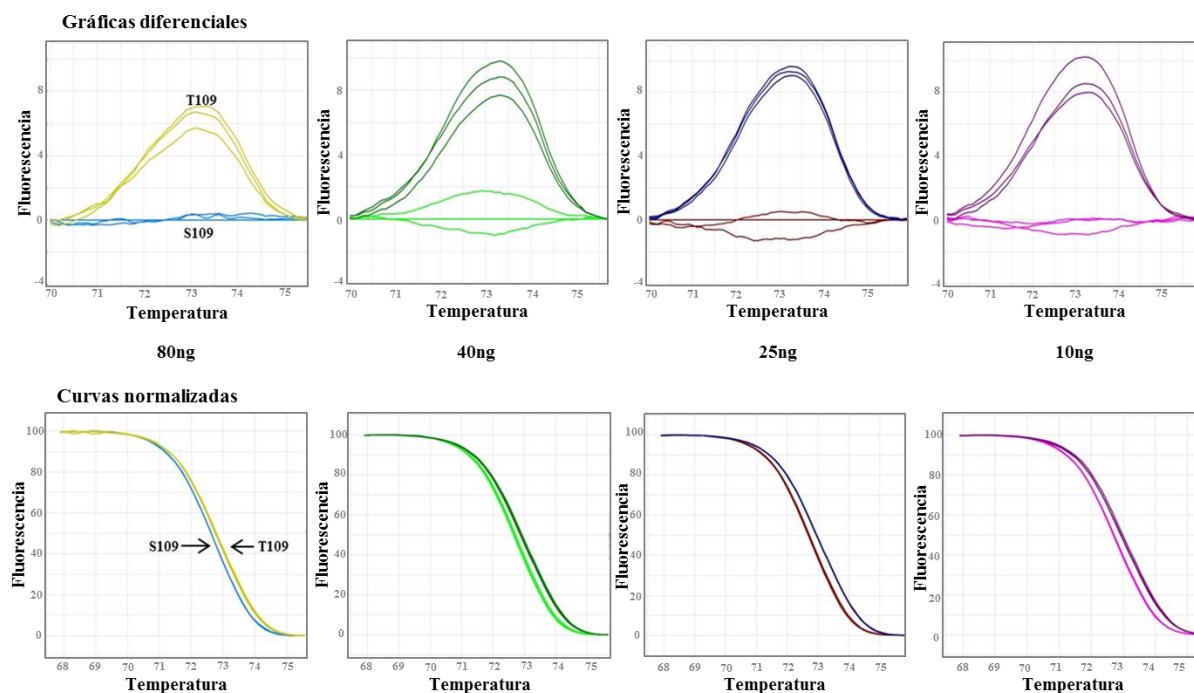


Figura 15. Variación de la cantidad de ADN genómico de partida para CAT25

Se pueden visualizar las curvas de HRM normalizadas (panel inferior) y gráficas diferenciales (panel superior) para CAT25 utilizando 10, 25, 40 y 80 ng de ADN de un tumor con MSI(+) (T109) vs. ADN de sangre periférica (S109) de un mismo paciente, ambas muestras por triplicado. En la amplificación se utilizaron los iniciadores SmallCAT25.

Con la intención de estudiar una variable más dentro de la robustez de la técnica, la reacción para detectar la inestabilidad en CAT25 fue realizada en tres diferentes termocicladores con capacidades para realizar una PCR-HRM. El análisis fue llevado a cabo con muestras de ADN apareadas de tumor/SP de los casos que mostraron MSI(+) en sus tumores. En los tres equipos utilizados se encontraron los mismos resultados finales para todos los casos estudiados (Figura 16). Los tiempos de reacción de la PCR-HRM están desglosados en la tabla 1.

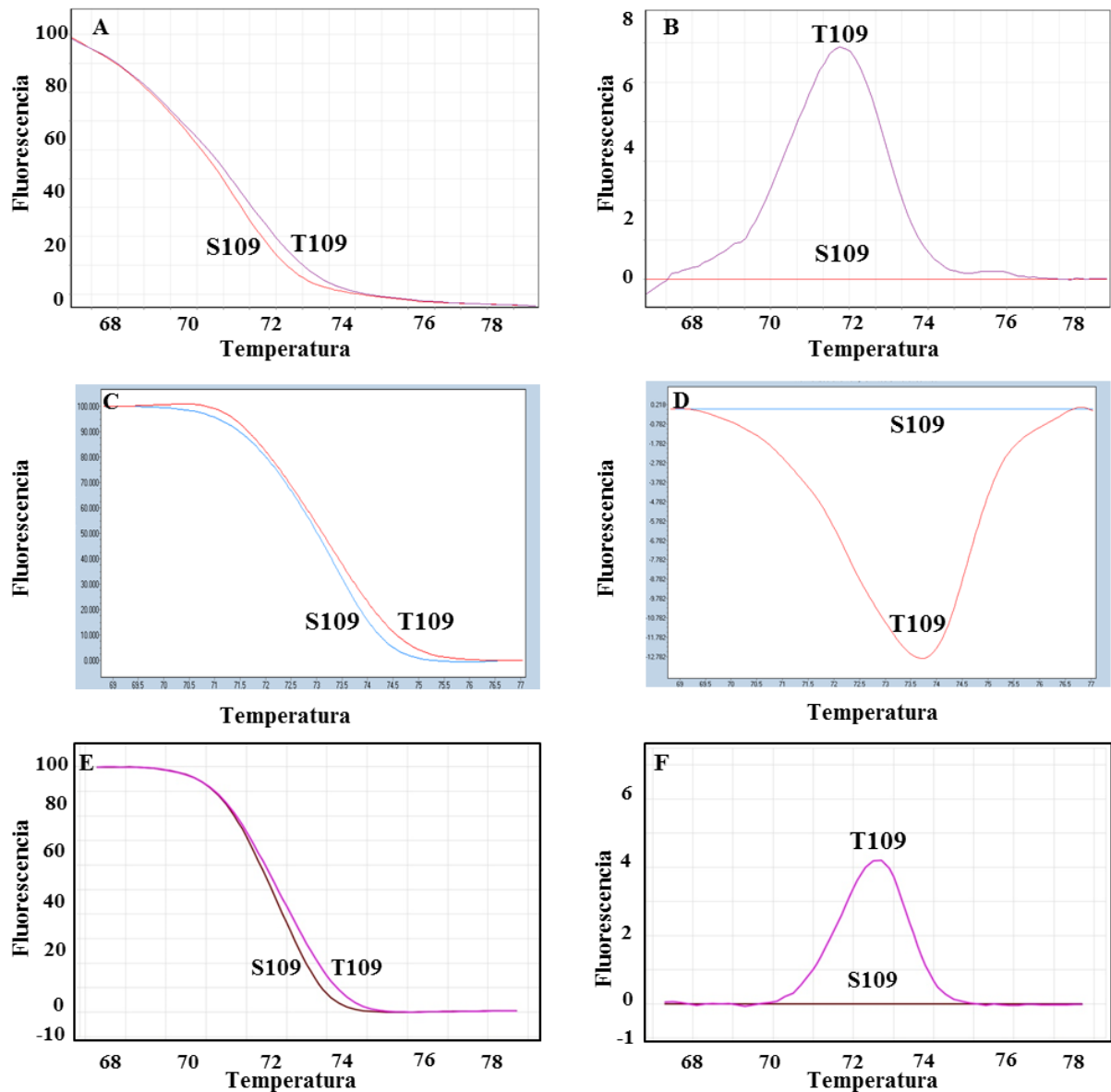


Figura 16. Estudio de CAT25 en tres diferentes aparatologías

A- Curva de HRM normalizada del tumor/S 109 analizada en RG. B- Curva de gráfica diferencial del tumor/S 109 analizada en RG. C- Curva de HRM normalizada del tumor/S 109 analizada en Z480. D- Curva de gráfica diferencial del tumor/S 109 analizada en Z480. E- Curva de HRM normalizada del tumor/S 109 analizada en ECO. F- Curva de gráfica diferencial del tumor/S 109 analizada en ECO.

S: Sangre periférica. T: tumor. RG: Rotor-Gene[™] 6000. Z480: LightCycler[®] Z480. ECO: Eco[™] Real-time PCR system

Tabla 1. Tiempos de reacción en los termocicladores usados para detección de inestabilidad en CAT25

CAT25/PCR-HRM	ECO	RG	Z480
PCR (min)	49	63	60
HRM (min)	6	38	20
PCR-HRM (min)	55	101	80

1.5 Pruebas de reproducibilidad utilizando SmallCAT25

Se demostró la reproducibilidad del estudio mediante pruebas intra e inter-ensayo (Figuras 17 y 18 respectivamente) con las condiciones mencionadas en Pacientes y métodos.

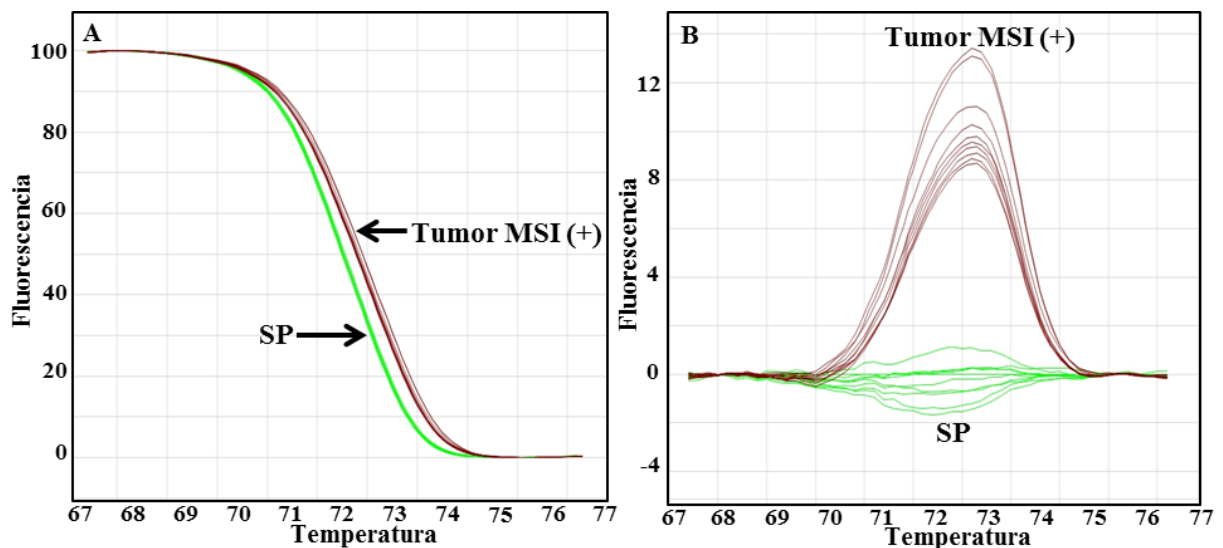


Figura 17. Prueba de reproducibilidad intraensayo para CAT25

A- Curvas normalizadas de HRM generadas desde ADN de un tumor con MSI(+) vs. ADN de sangre periférica (SP) de un mismo paciente, ambas muestras replicadas 10 veces. B- Gráfico diferencial de la reacción descrita.

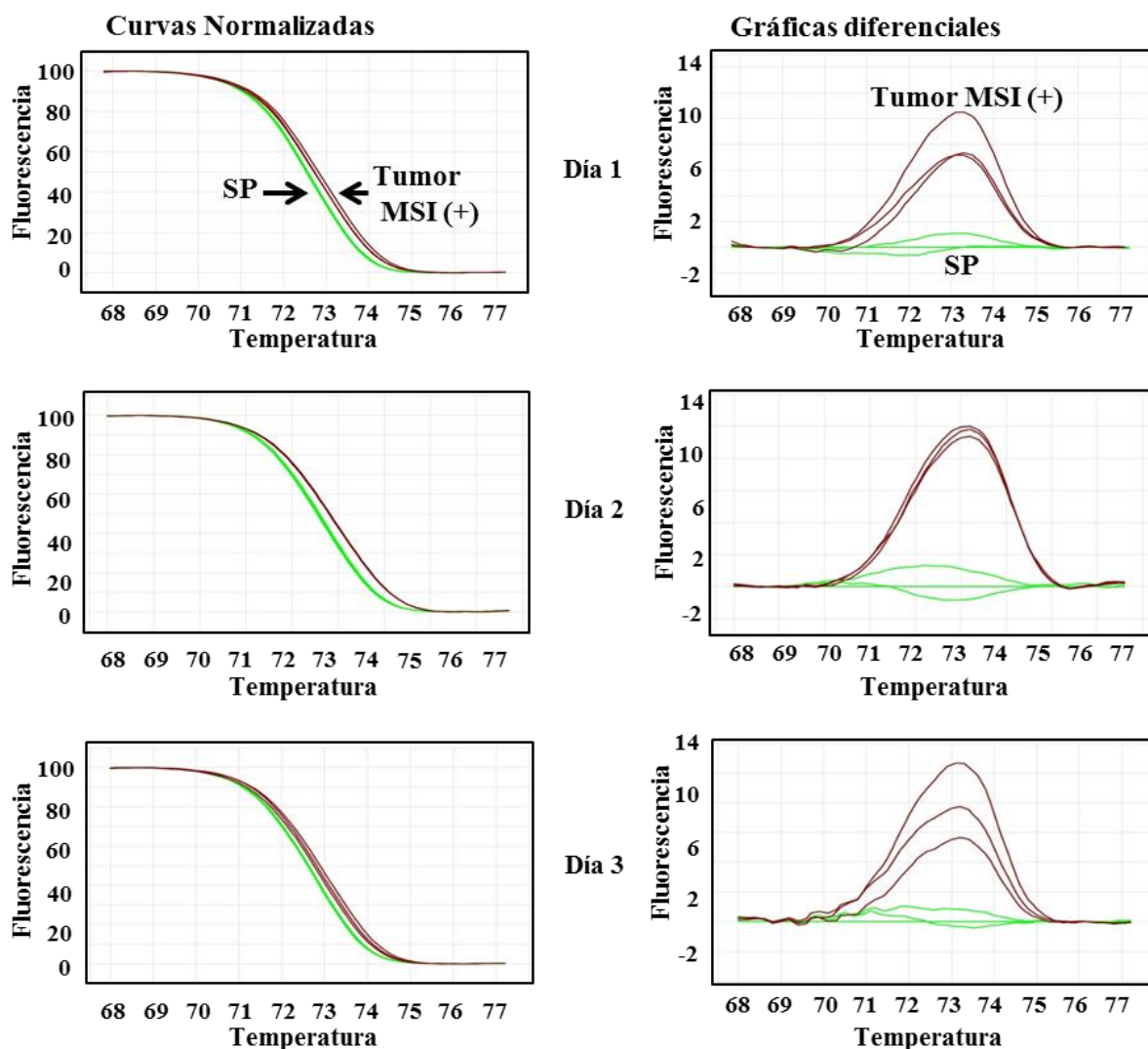


Figura 18. Prueba de reproducibilidad interensayo

Curvas de HRM normalizadas (izquierda) y gráficas diferenciales (derecha) para CAT25 en diferentes días, utilizando ADN de tumor con MSI(+) vs. ADN de sangre periférica (SP) de un mismo paciente, ambas muestras corridas por triplicado.

1.6 Rango de normalidad para CAT25

Para deducir si CAT25 es cuasimonomórfico en la población en estudio, se analizó el grupo de VLT (208 personas libres de tumor que aportan 416 alelos al estudio), mediante PCR-HRM y EC. La PCR-HRM mostró curvas homogéneas entre individuos (Figura 19) en tanto que desde los resultados de EC se logró establecer un rango de normalidad de 64 a 66pb para CAT25 utilizando los iniciadores SmallCAT25, lo cual confirma la cuasimonomorfosidad en nuestra población (Figura 20).

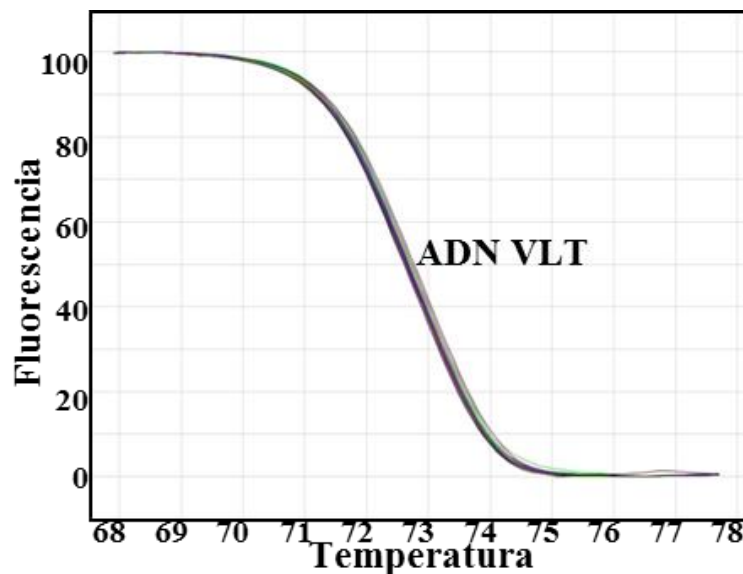


Figura 19. Curvas de HRM normalizadas desde el grupo VLT

Homogeneidad en las curvas de HRM normalizadas, generadas utilizando ADN de SP de 48 personas pertenecientes al grupo VLT.

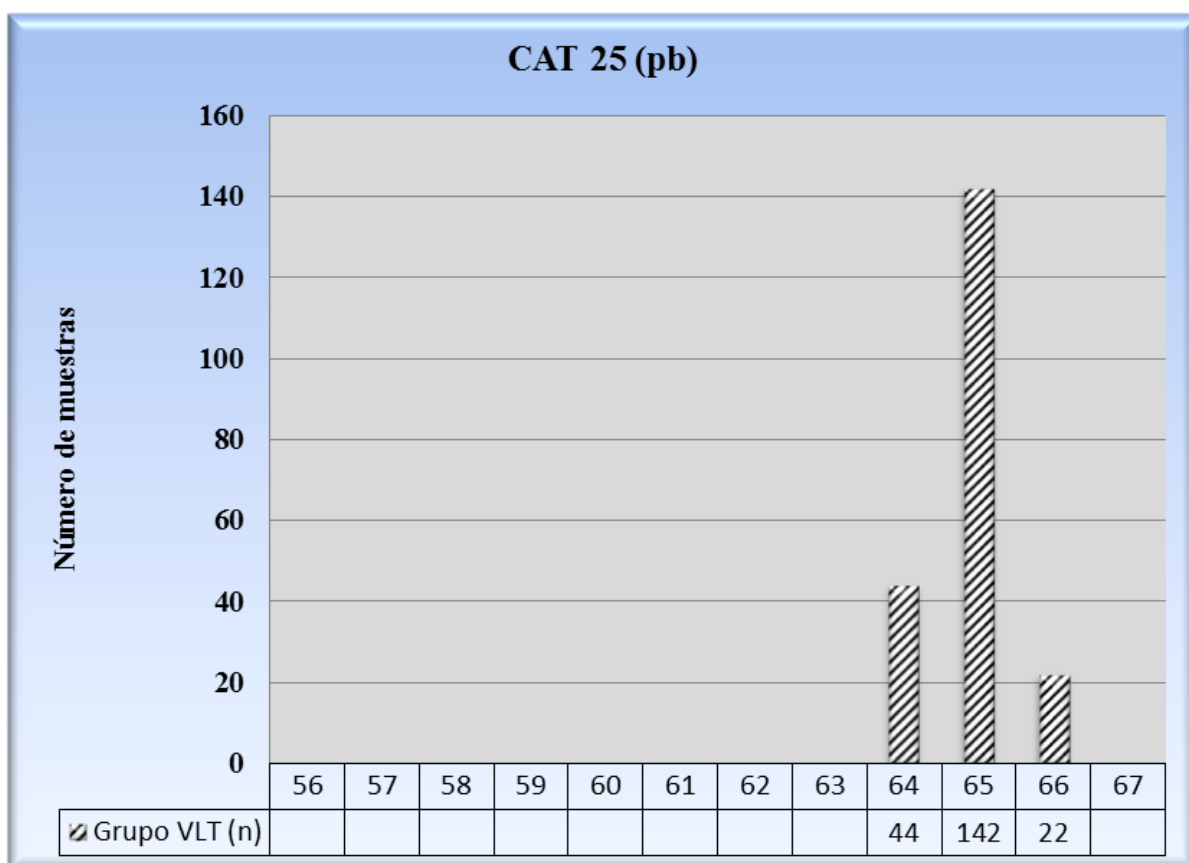


Figura 20. Distribución alélica de CAT25 en el grupo VLT

Distribución de CAT25 en pares de bases mediante el análisis de 416 alelos del grupo VLT, utilizando SmallCAT25 y EC. De los resultados se puede deducir un rango cuasimonomórfico de 64-66 pares de bases para CAT25.

1.7 Estudio de CAT25 en CCR

Se estudió la MSI de CAT25 en ADN genómico de 110 CCR/SP mediante PCR-HRM y EC. En los resultados de estos análisis se pudo observar que 11 de ellos poseían la inestabilidad en este microsatélite. Los tumores que presentaron dicha alteración mostraron curvas de HRM diferentes cuando se las comparaba con lo obtenido desde SP del mismo paciente. Los resultados de la EC para esas mismas muestras, justificaron los encontrados en la PCR-HRM, ya que se pudieron ver las diferencias de pb entre los amplicones obtenidos para CAT25 desde ADN de tejido tumoral y la SP (Figura 21, A y B).

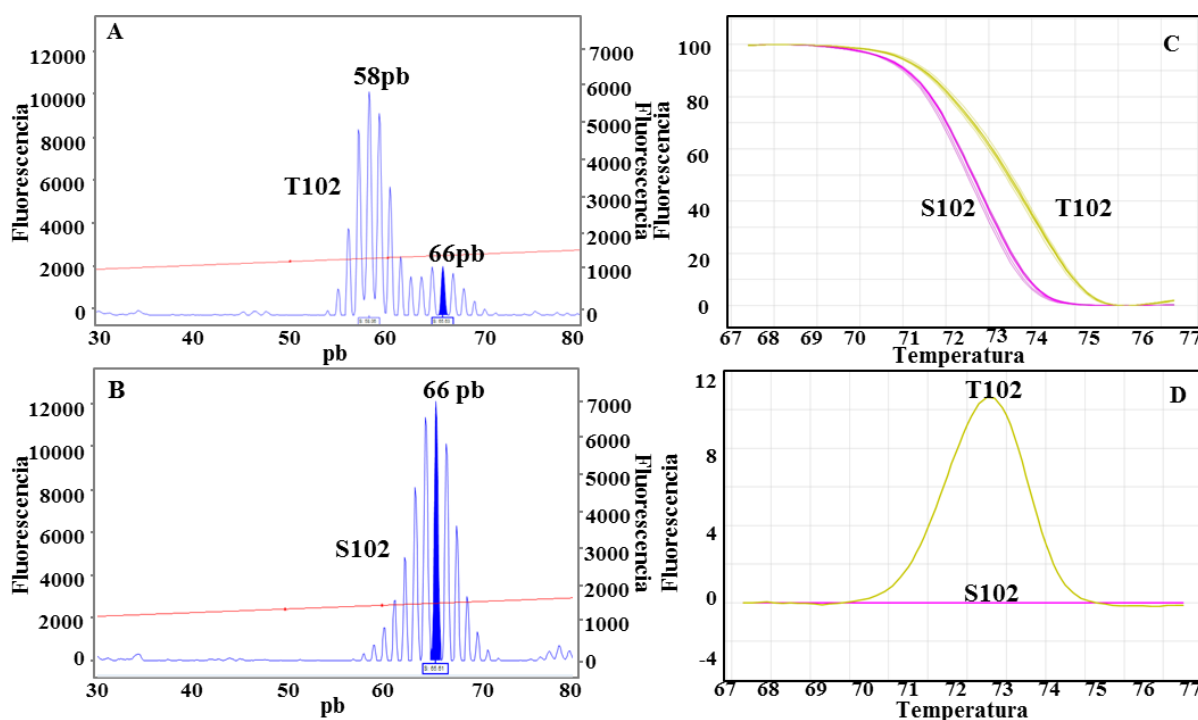


Figura 21. A. Comparación de análisis en EC y HRM para CAT25

A- Se visualiza mediante EC un pico de 66pb correspondiente a ADN de tejido normal que se procesó junto con la porción tumoral (tumor 102 con pico alterado a 58pb) en la extracción de los ácidos nucleicos. B- Pico normal de 66pb correspondiente a ADN extraído de sangre periférica de caso 102 (S102). C y D Se observa la diferencia en las curvas de HRM normalizada y gráfica diferencial respectivamente generadas a partir de ADN genómico sangre periférica (S102) vs. ADN del tumor (T102) del mismo paciente.

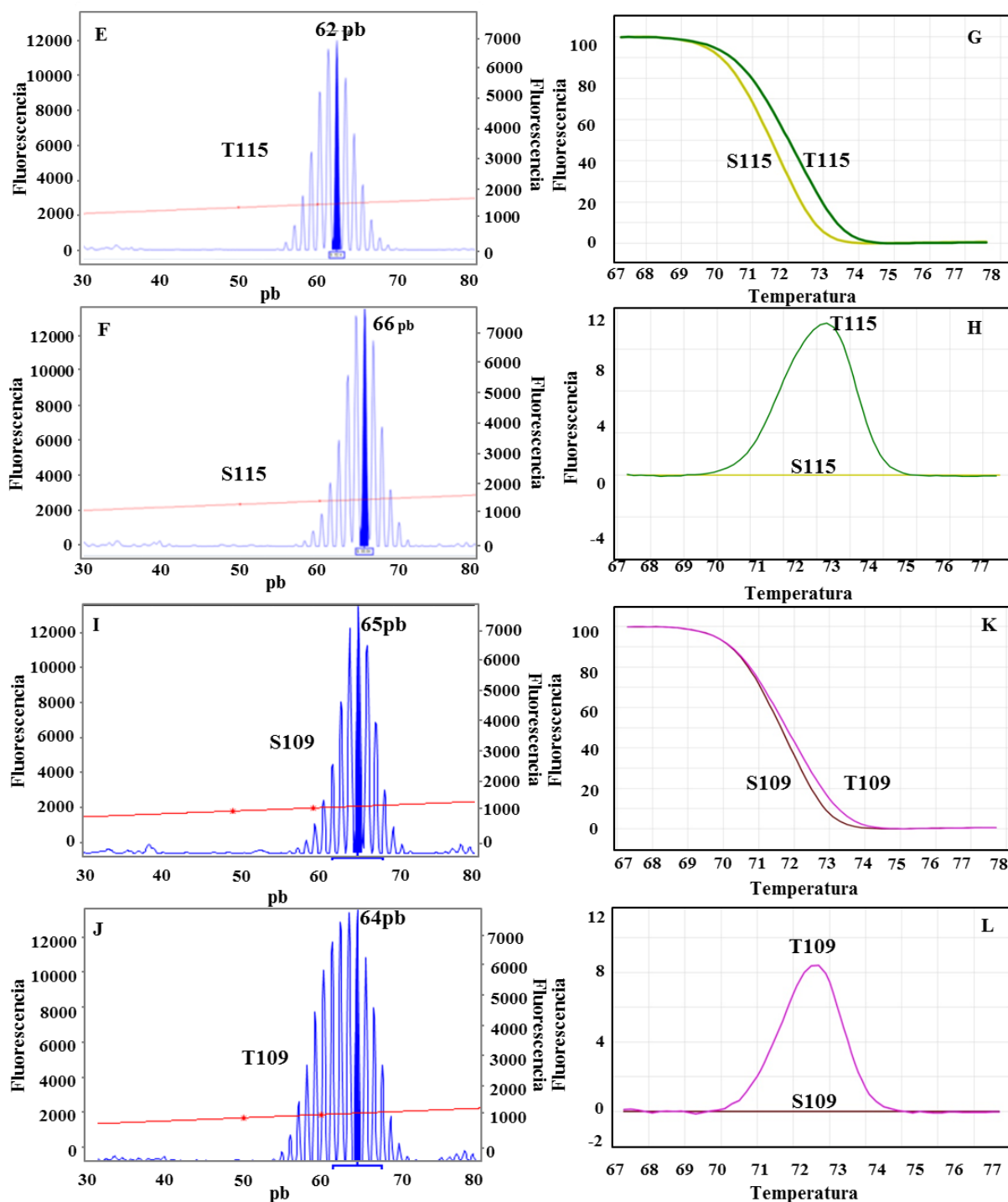


Figura 21. B. Comparación de análisis en EC y HRM para CAT25

E y F- Se puede apreciar, mediante EC, el corrimiento de -4 pb entre el amplicón de CAT25 generado desde ADN de tejido tumoral (T115) vs. el generado desde ADN de sangre periférica (S115) del mismo paciente, denotando la inestabilidad tumoral en CAT25. *G y H-* Se puede observar el mismo escenario descrito en E y F reflejado mediante las curvas de HRM normalizadas y gráfica diferencial respectivamente. *I y J-* Se observa cómo el análisis de HRM logra distinguir amplicones que difieren en 1pb denotando la inestabilidad en el marcador. Las curvas y picos son generadas desde ADN tumoral (T109) con 64pb y sangre periférica (S109) con 65pb, del mismo paciente. *K y L-* Se puede observar el mismo escenario descrito en I y J reflejado mediante las curvas de HRM normalizadas y gráfica diferencial respectivamente.

Las diferencias en la extensión del amplicón del tejido tumoral vs. SP del mismo paciente fue siempre negativa, es decir, cuando el tejido poseía inestabilidad en CAT25 la longitud del amplicón del tumor siempre tenía menos pares de bases que el correspondiente a la sangre periférica del mismo paciente. El pico principal en 1 tumor MSI(+) desde la EC estuvo incluido en el rango de pb cuasimonomórfico (Figura 22); esto no impidió que la PCR-HRM catalogara al mismo como alterado para CAT25 (Figura 21B, K Yy L).

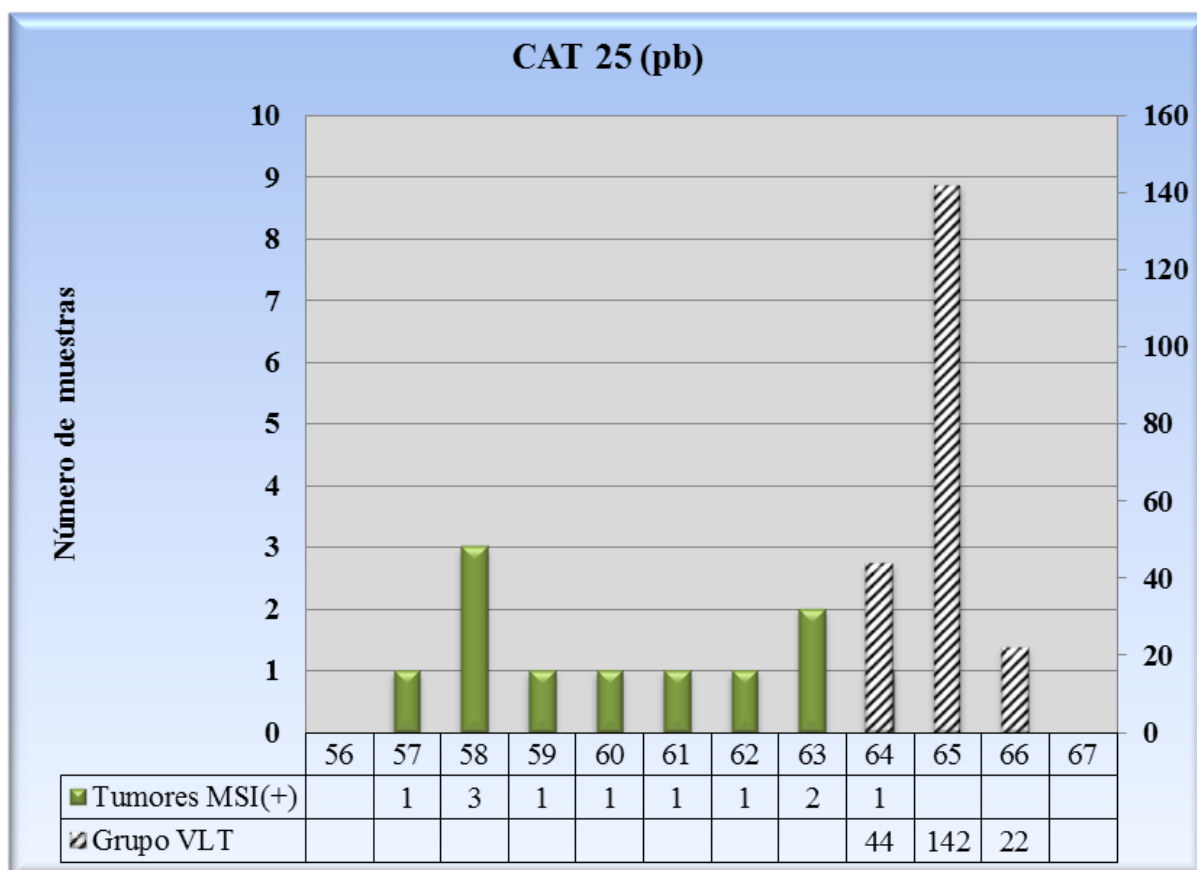


Figura 22. Distribución alélica de CAT25 en Tumores MSI (+) y grupo VLT

Visualización del largo de los amplicones de CAT25 generados mediante los iniciadores SmallCAT25 desde ADN de tumores MSI(+) y de sangre periférica del grupo de voluntarios libres de tumor (VLT). Todos los tumores poseen menor largo en pares de bases que el rango normal (64-66 pb) establecido por el grupo VLT, a excepción de un caso que quedó incluido en dicho rango.

1.8 Sensibilidad y especificidad analítica de PCR-HRM para CAT25

La sensibilidad y especificidad analítica para este marcador fueron del 100% ya que al comparar los resultados de la MSI desde los tumores estudiados mediante la técnica de PCR-HRM desarrollada con los obtenidos por EC (la cual se consideró como la técnica patrón), hubo 100% de concordancia (Ver Tabla 2, página 65).

1.9 Valores Predictivos para CAT25

Los VPP y VPN para este marcador fueron del 100% para predecir la MSI(+) en los tumores estudiados, ya que siempre que un tumor presentó inestabilidad en CAT25 (por cualquiera de los dos métodos) fue catalogado como MSI(+) de acuerdo a nuestro criterio de clasificación explicado en Pacientes y métodos.

2. Desarrollo y validación de PCR-HRM para BAT25

2.1 Amplificación del microsatélite BAT25

La amplificación generó un único amplicón como producto de reacción (Figura 23).

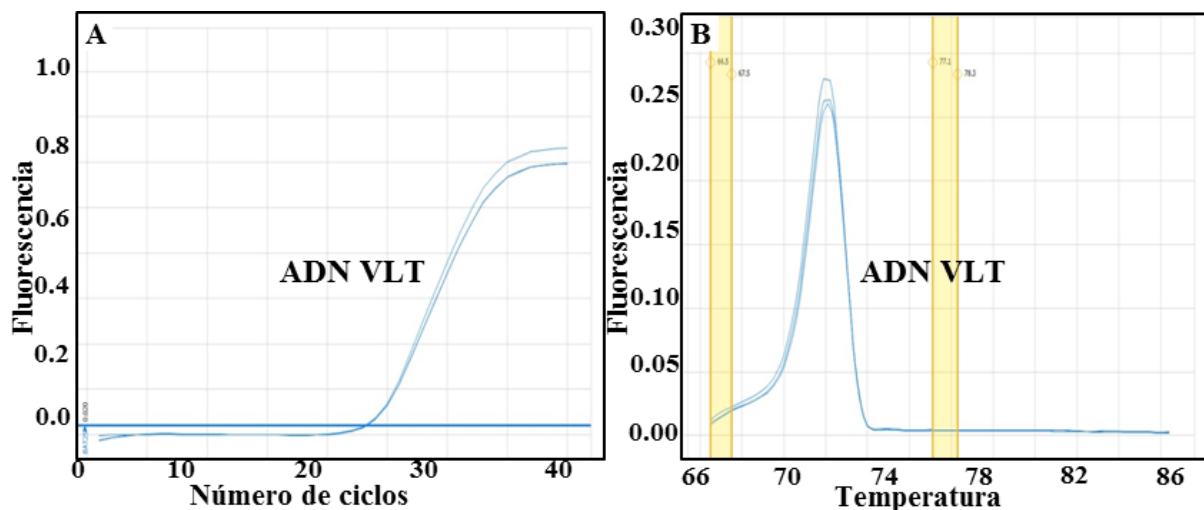


Figura 23. Amplificación de BAT25

A- Amplificación de 3 diferentes muestras de ADN de la población VLT. B- Se corrobora la amplificación de solo un producto debido a la aparición de un único dominio de fusión.

2.2 Pruebas de robustez para BAT25 mediante PCR-HRM

Como se describió previamente, fueron analizadas diferentes concentraciones de ADN genómico desde el grupo VLT. En el rango de 80 a 10 ng/reacción se obtuvo exactitud en la interpretación de las curvas de HRM (Figura 24), pero la utilización de 80 ng/reacción produjo curvas de amplificación saturadas.

Para todas las pruebas y análisis subsiguientes de BAT25 se utilizó ADN genómico en una concentración de 25 ng/reacción.

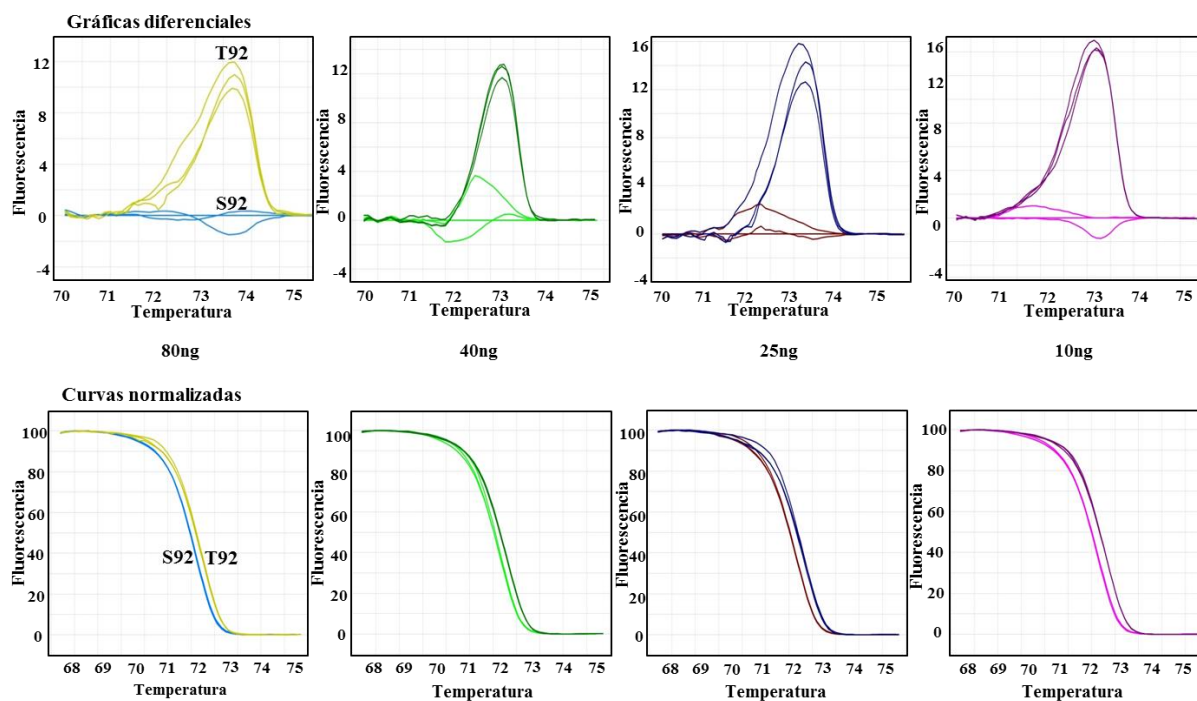


Figura 24. Variación de la cantidad de ADN genómico de partida para BAT25

Curvas de HRM normalizadas (panel inferior) y gráficas diferenciales (panel superior) para BAT25 utilizando 80, 40, 25, y 10 ng/reacción de ADN de un tumor con MSI(+) (T92) vs. ADN de sangre periférica (S92) de un mismo paciente, ambas muestras por triplicado.

2.3 Pruebas de reproducibilidad para BAT25 mediante PCR-HRM

Se demostró la reproducibilidad del estudio mediante pruebas intra e inter-ensayo (Figuras 25 y 26 respectivamente) con las condiciones citadas en Pacientes y métodos. En ambas pruebas, las curvas de HRM y gráfica diferencial muestran la reproducibilidad del estudio analizando ADN de tejido tumoral vs. ADN de SP del mismo paciente, pudiéndose observar en el análisis las diferencias en las curvas, que denotan la inestabilidad.

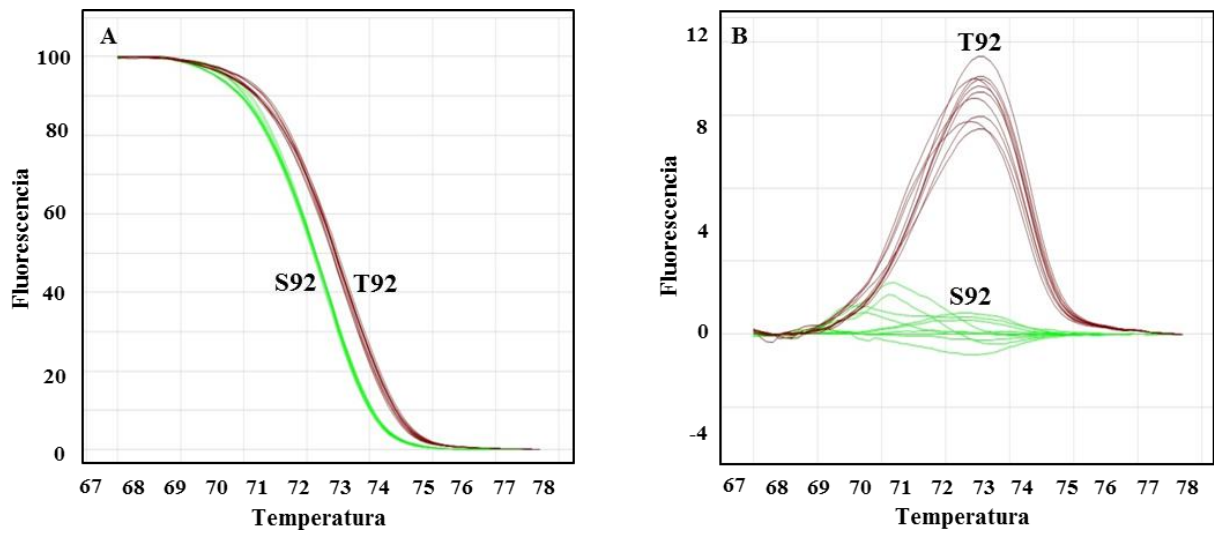


Figura 25. Prueba de reproducibilidad intraensayo para BAT25

A- Curvas normalizadas de HRM generadas desde ADN de un tumor (T92) con MSI(+) vs. ADN de sangre periférica (S92) de un mismo paciente, ambas muestras replicadas 10 veces. B- Gráfico diferencial de la reacción descrita.

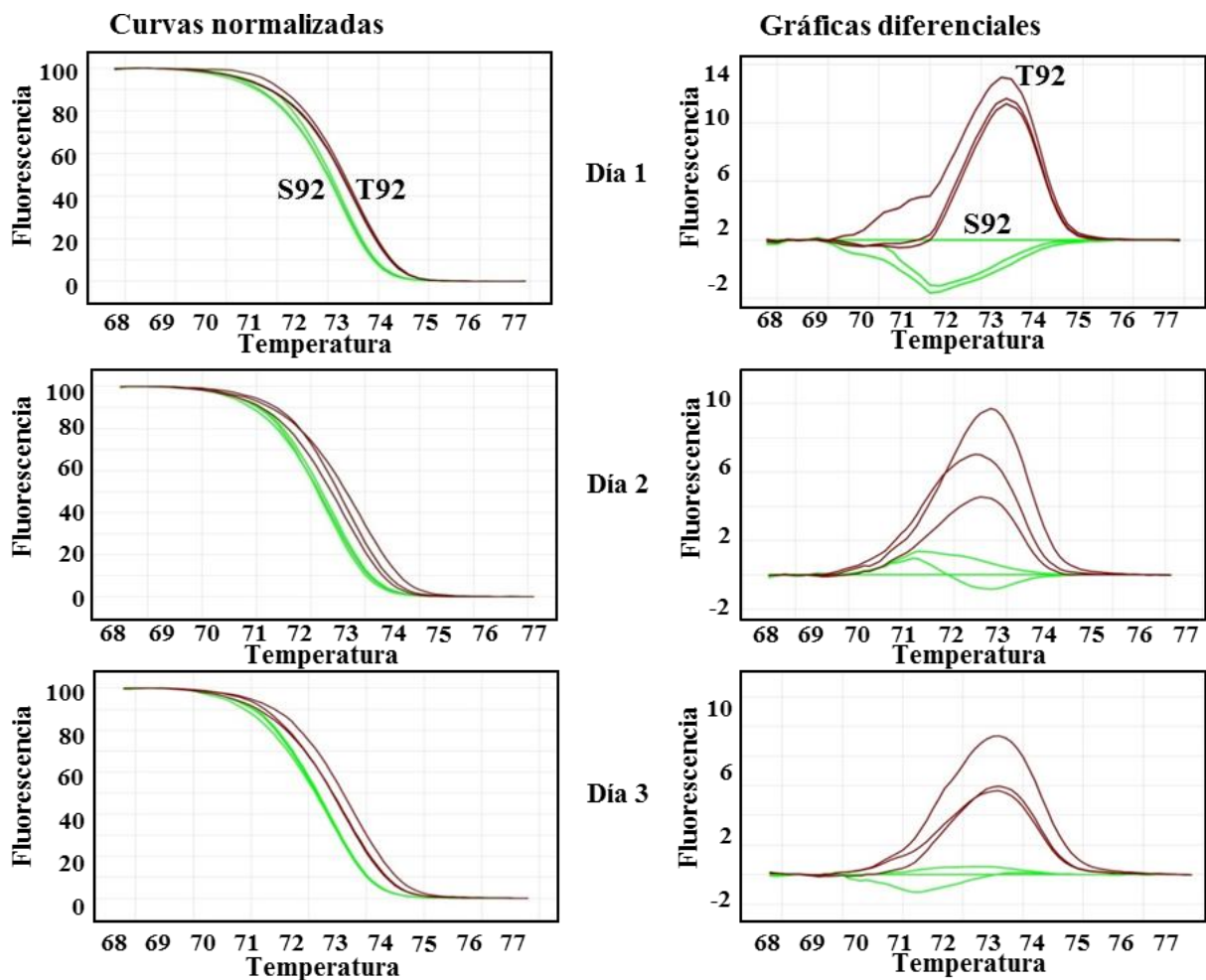


Figura 26. Prueba de reproducibilidad interensayo

Curvas de HRM normalizadas (izquierda) y gráficas diferenciales (derecha) para BAT25 en diferentes días, utilizando ADN de tumor (T92) con MSI(+) vs. ADN de sangre periférica (S92) de un mismo paciente, ambas muestras corridas por triplicado.

2.4 Rango de normalidad para BAT25

Para conocer si BAT25 es cuasimonomórfico en nuestra población, se estudió el grupo de VLT mediante EC. Desde los resultados se pudo deducir un rango de normalidad de 116 a 121pb para BAT25, lo cual confirma su cuasimonomorfosidad en nuestra población (Figura 27).

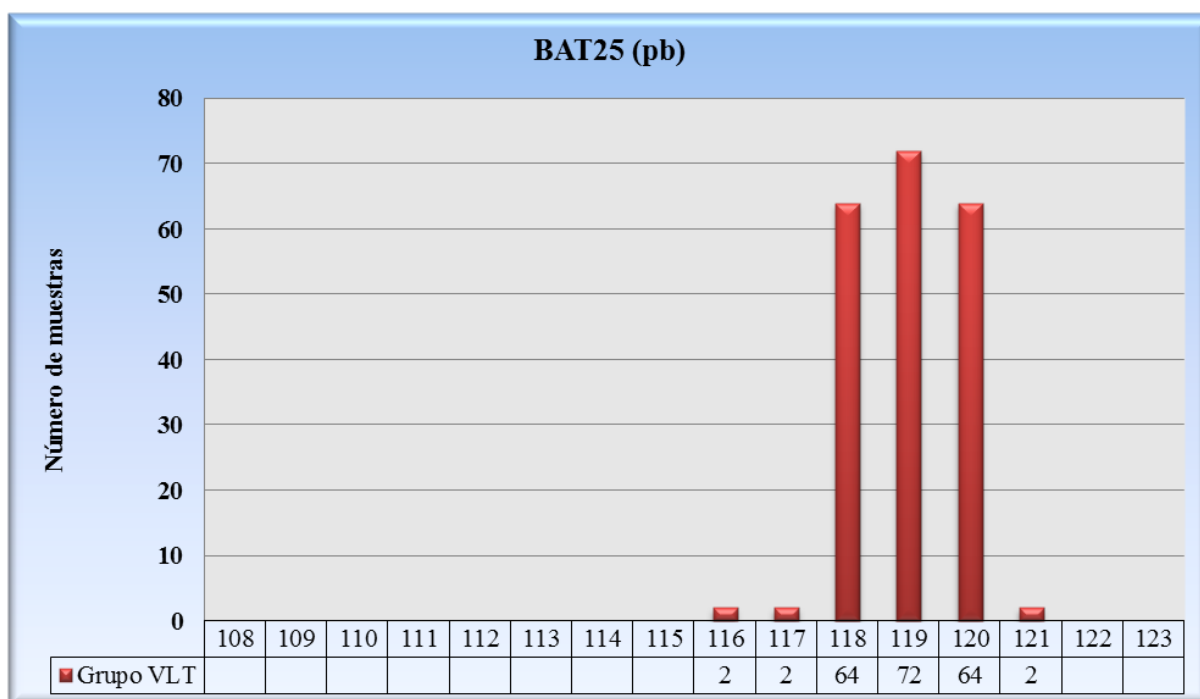


Figura 27. Distribución alélica de BAT25 en el grupo VLT

Distribución de BAT25 en pares de bases extraído desde el análisis de 416 alelos del grupo VLT utilizando EC. De los resultados se puede deducir un rango cuasimonomórfico de 116-121 pares de bases para BAT25.

2.5 Estudio de BAT25 en CCR

Se estudió la MSI de BAT25 en ADN genómico de 110 CCR/SP mediante PCR-HRM y EC. En los resultados de estos análisis, se observó que 9 de ellos poseían la inestabilidad en este microsatélite. Los tumores que presentaron dicha alteración mostraron curvas de HRM diferentes cuando se las comparaba contra los obtenidos desde la SP del mismo paciente. Los resultados de la EC avalaron los apreciados en la PCR-HRM, ya que se pudieron ver las diferencias de pb entre los amplicones obtenidos para BAT25 desde ADN de tejido tumoral y la SP (Figura 28).

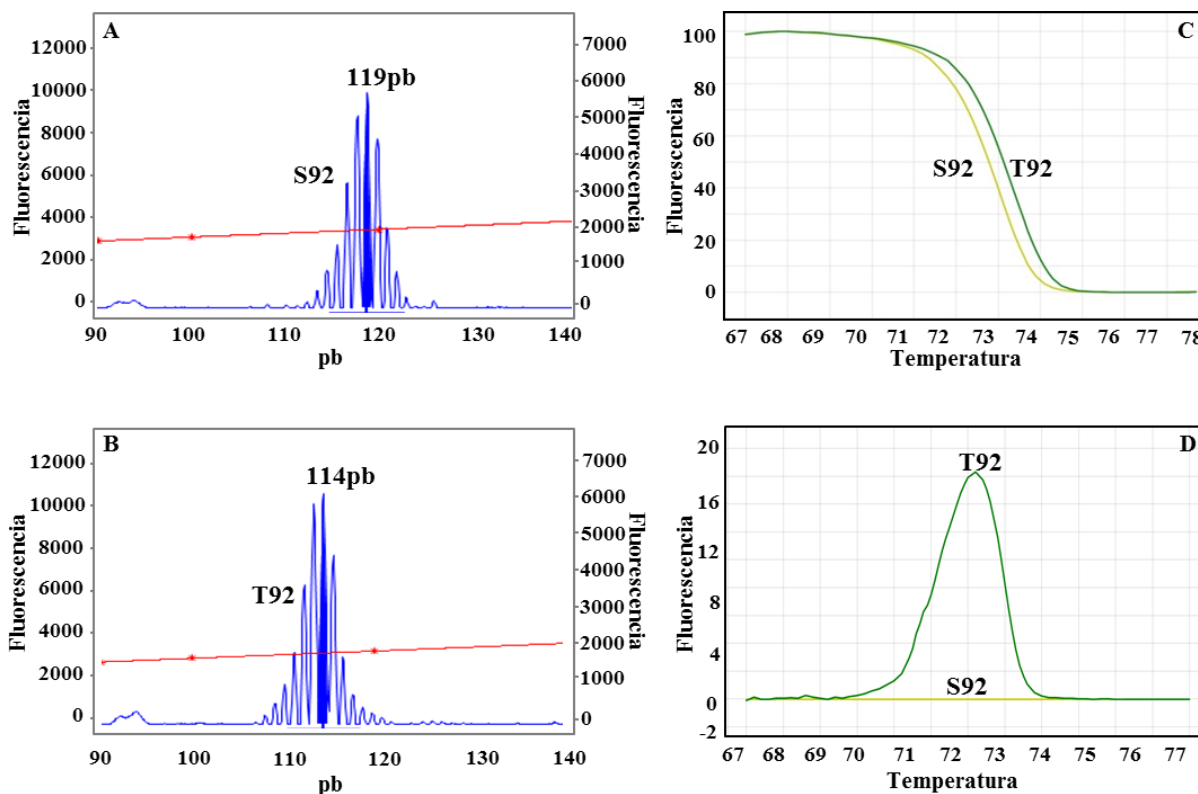


Figura 28. Comparación de resultados entre EC y HRM para BAT25

A y B- Visualización, mediante EC, del corrimiento de -5 pb entre el amplicón de BAT25 generado desde ADN de tejido tumoral (tumor T92) vs. el generado desde ADN de sangre periférica (S92) del mismo paciente, denotando la inestabilidad tumoral en BAT25. C y D- Se puede observar el mismo escenario descrito en A y B reflejado mediante las curvas de HRM normalizadas y grafica diferencial.

Las diferencias en el largo del amplicón del tejido tumoral vs. SP del mismo paciente fue siempre negativa, es decir, cuando el tejido poseía inestabilidad en BAT25 la longitud del amplicón del tumor siempre mostraba menos pares de bases que el correspondiente a la sangre periférica del mismo paciente. Esto también se puede apreciar si se comparan el largo de los amplicones generados desde los tumores MSI(+) vs. los generados por la SP del grupo VLT, tomados como rango normal (Figura 29).

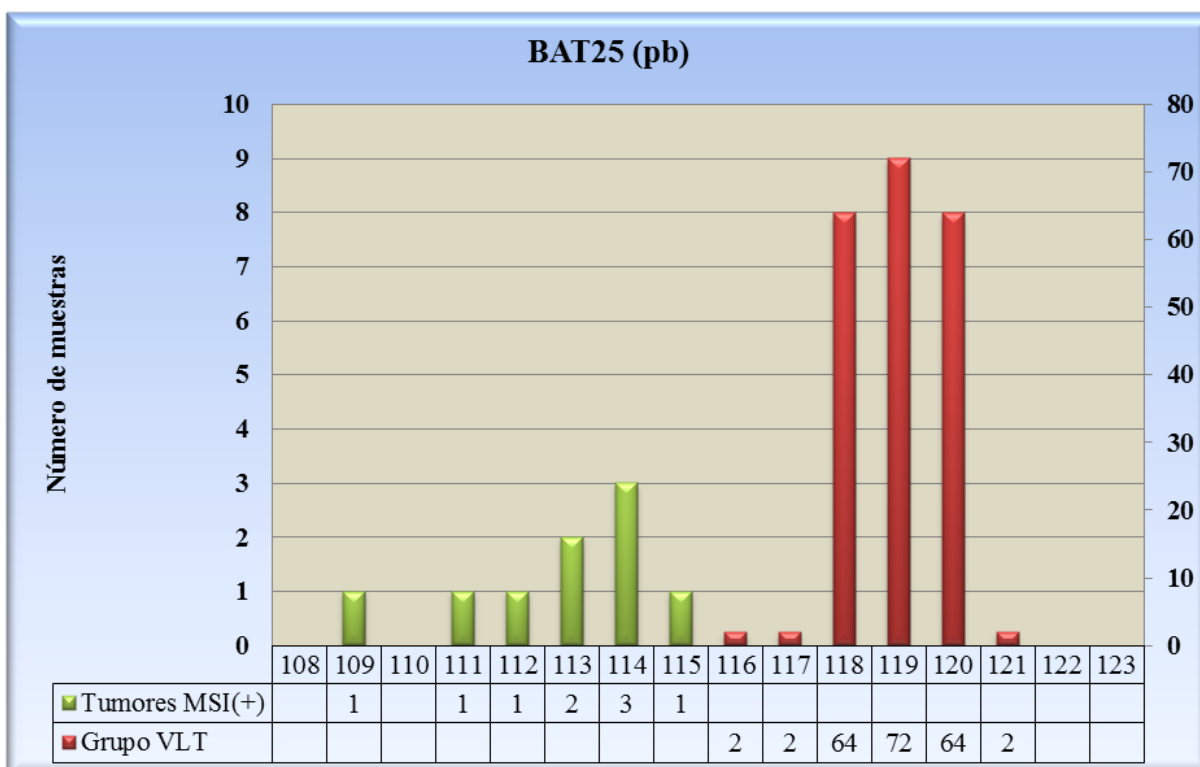


Figura 29. Distribución alélica de BAT25 en Tumores MSI (+) y grupo VLT

Visualización del largo de los amplicones de BAT25 generados desde ADN de tumores MSI(+) y de sangre periférica del grupo de voluntarios libres de tumor (VLT). Todos los tumores poseen menor largo en pares de bases que el rango normal establecido por el grupo VLT.

2.6 Sensibilidad y Especificidad Analítica de PCR-HRM para BAT25

La sensibilidad y especificidad analítica para este marcador fueron del 100% ya que al comparar los resultados de la MSI desde los tumores estudiados mediante la técnica de PCR-HRM desarrollada con los obtenidos por EC (la cual se consideró como la técnica patrón), hubo 100% de concordancia (Ver Tabla 2, página 65).

2.7 Valores Predictivos para BAT25

En los tumores analizados los VPP y VPN para este marcador fueron del 92% y 98% respectivamente para predecir la MSI(+), ya sea mediante EC o PCR-HRM. Estos valores surgen de un falso positivo para ambas técnicas (tumor 82) y 2 falsos negativos también por ambas técnicas (tumores 35 y 64, ver Tabla 2, página 65).

3. Desarrollo y validación de PCR-HRM para BAT26

3.1 Amplificación del microsatélite BAT26

La amplificación generó un único amplicón como producto de reacción (Figura 30).

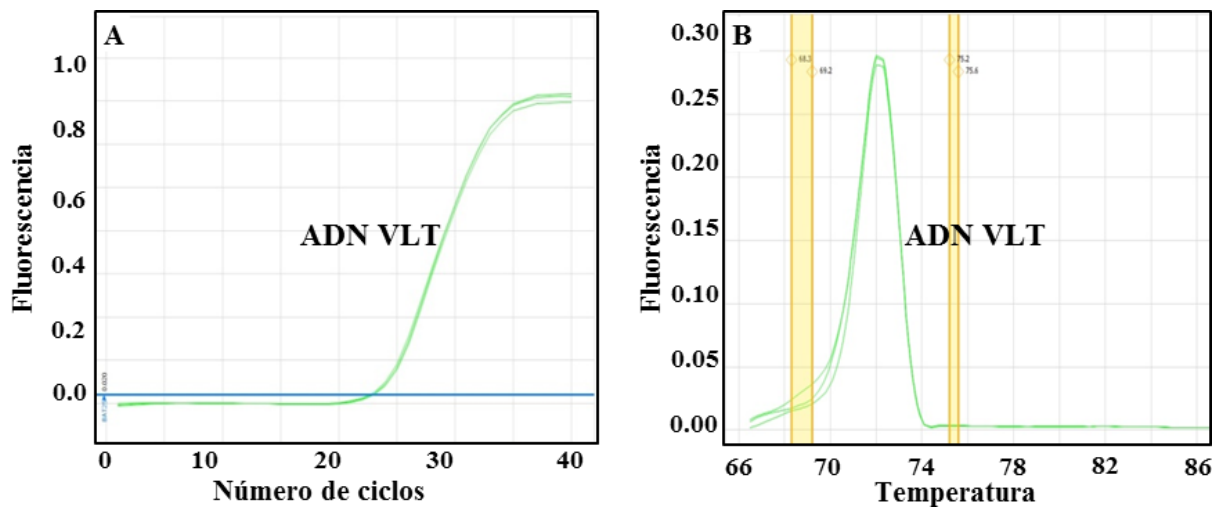


Figura 30. Amplificación de BAT25

A- Amplificación de 3 diferentes muestras de ADN de la población VLT. B- Se corrobora la amplificación de solo un producto debido a la aparición de un único dominio de fusión.

3.2 Pruebas de robustez para BAT26 mediante PCR-HRM

Como se describió previamente, fueron analizadas diferentes concentraciones de ADN genómico desde el grupo VLT. En el rango de 80 a 10 ng/reacción se obtuvo exactitud en la interpretación de las curvas de HRM (Figura 31), pero la utilización de 80 ng/reacción produjo curvas de amplificación saturadas.

Para todas las pruebas y análisis subsiguientes de BAT26 se utilizó ADN genómico en una concentración de 25 ng/reacción.

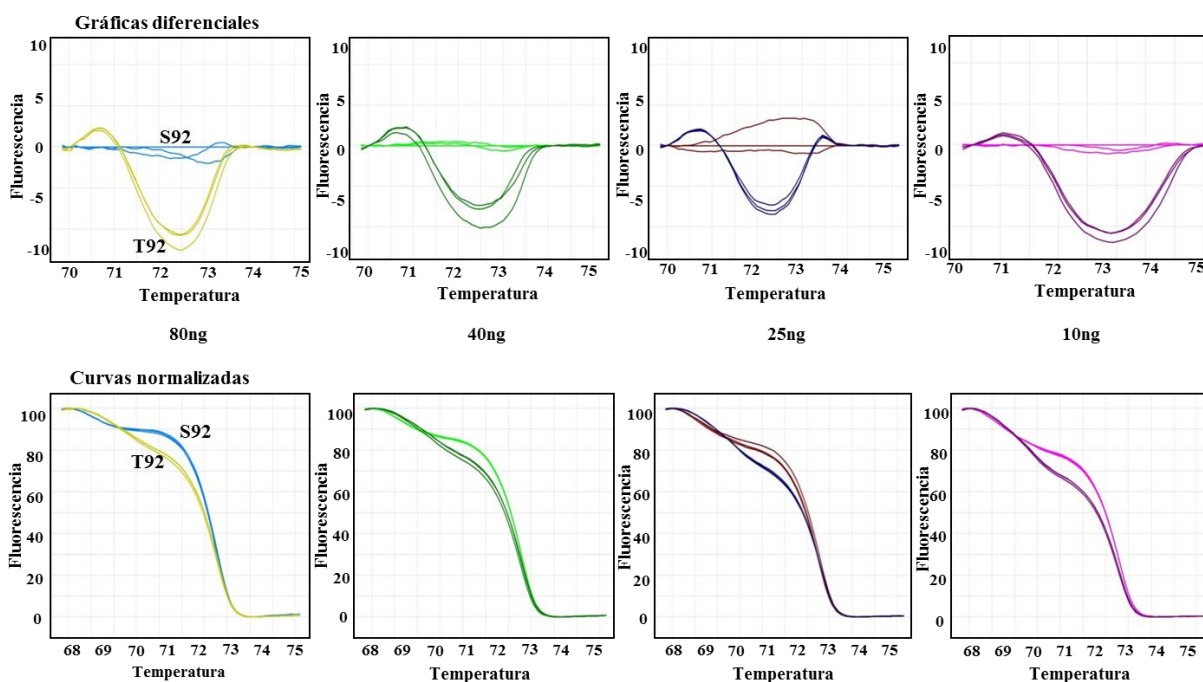


Figura 31. Variación de la cantidad de ADN genómico de partida para BAT26

Curvas de HRM normalizadas (panel inferior) y gráficas diferenciales (panel superior) para BAT26 utilizando 80, 40, 25 y 10 ng/reacción de ADN de un tumor con MSI(+) (T92) vs. ADN de sangre periférica (S92) de un mismo paciente, ambas muestras por triplicado.

3.3 Pruebas de reproducibilidad para BAT26 mediante PCR-HRM

Se demostró la reproducibilidad del estudio mediante pruebas intra e interensayo (Figuras 32 y 33 respectivamente) con las condiciones citadas en Pacientes y métodos.

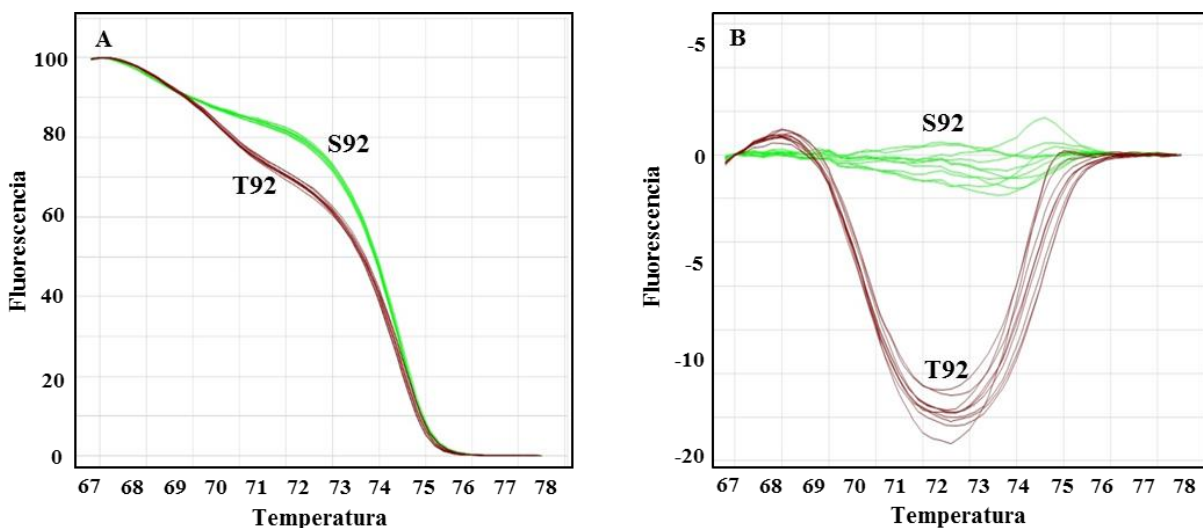


Figura 32. Prueba de reproducibilidad intraensayo para BAT26

A- Curvas normalizadas de HRM generadas desde ADN de un tumor (T92) con MSI(+) vs. ADN de sangre periférica (S92) de un mismo paciente, ambas muestras replicadas 10 veces. B- Gráfico diferencial de la reacción descrita.

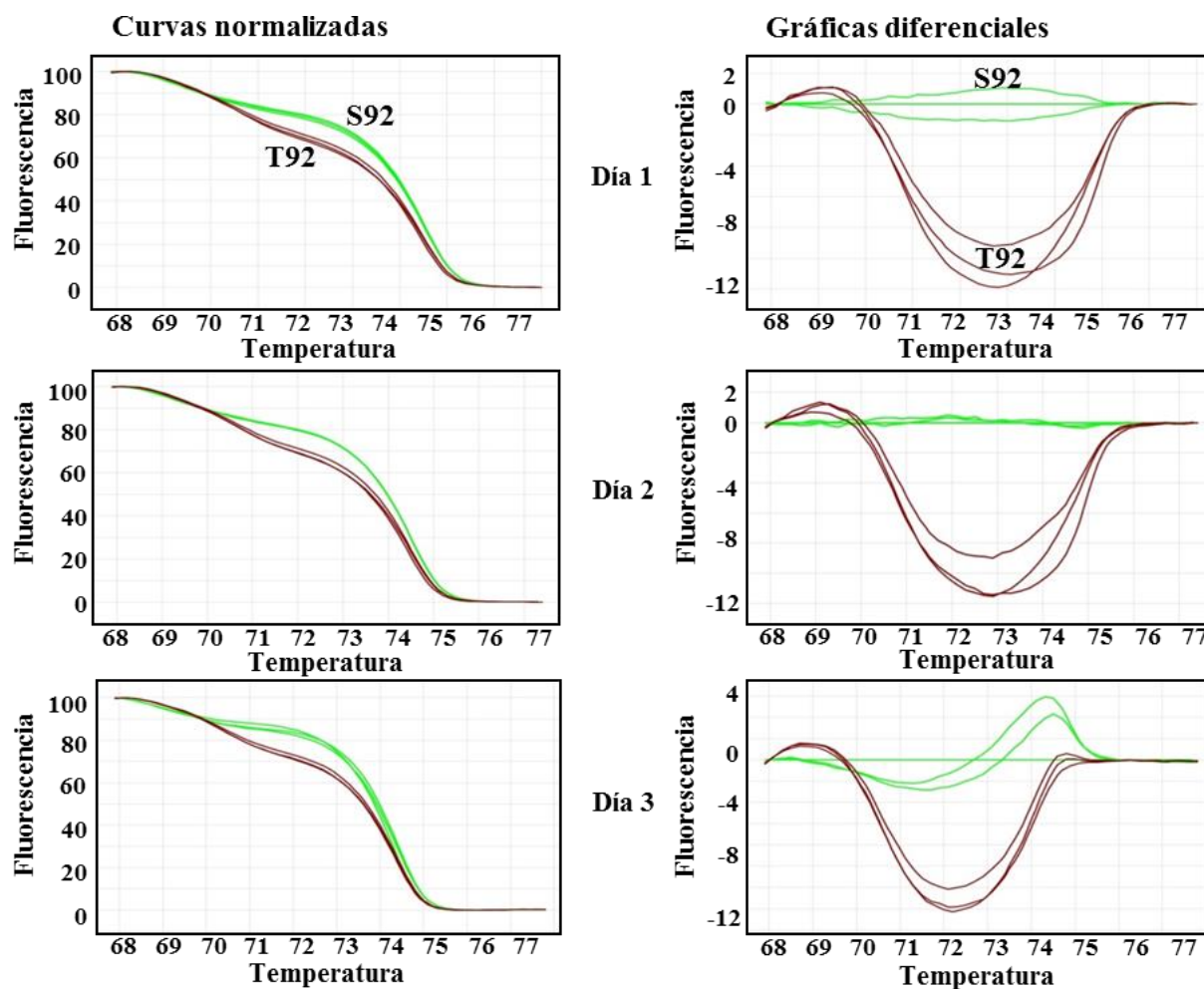


Figura 33. Prueba de reproducibilidad interensayo para BAT26

Curvas de HRM normalizadas (izquierda) y gráficas diferenciales (derecha) para BAT26 en diferentes días, utilizando ADN de tumor (T92) con MSI(+) vs. ADN de sangre periférica (S92) de un mismo paciente, ambas muestras corridas por triplicado.

3.4 Rango de normalidad para BAT26

Para conocer si BAT26 es cuasimonomórfico en la población en estudio, se analizó el grupo de VLT mediante EC. Desde los resultados se estableció un rango de normalidad de 114-116 pb para BAT26, lo cual confirma su cuasimonomorfosidad en nuestra población (Figura 34).

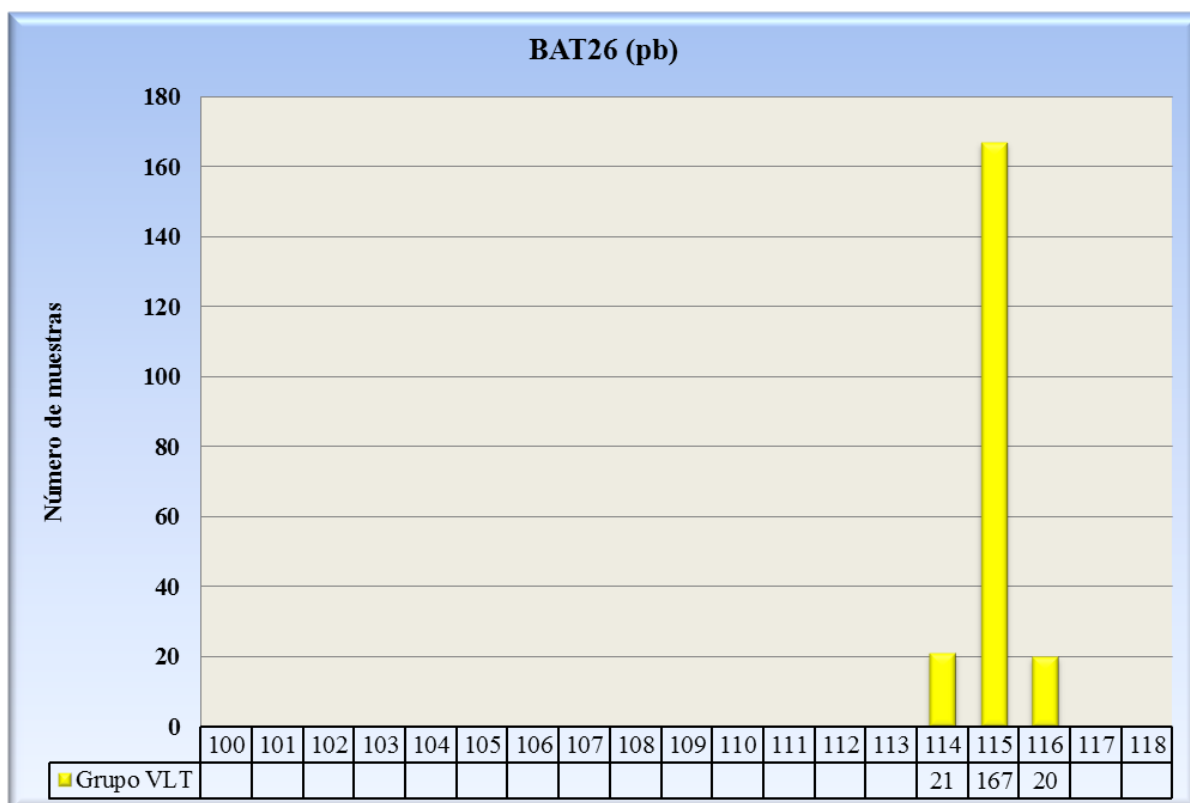


Figura 34. Distribución alélica de BAT26 en el grupo VLT

Se puede apreciar la distribución de BAT26 en pares de bases, mediante el análisis de 416 alelos del grupo VLT utilizando EC. De los resultados se puede deducir un rango cuasimonomórfico de 114-116 pares de bases para BAT26.

3.5 Estudio de BAT26 en CCR

Se examinó la MSI de BAT26 en ADN genómico de 110 CCR/SP mediante PCR-HRM y EC. Los resultados mostraron que 13 de ellos poseían la inestabilidad en este microsatélite. Los tumores que presentaron dicha alteración mostraron curvas de HRM diferentes cuando se las comparaba contra la SP del mismo paciente. Los resultados obtenidos de la EC justificaron los apreciados en la PCR-HRM, ya que se pudieron ver las diferencias de pb entre los amplicones obtenidos para BAT26 desde ADN de tejido tumoral y la SP (Figura 35).

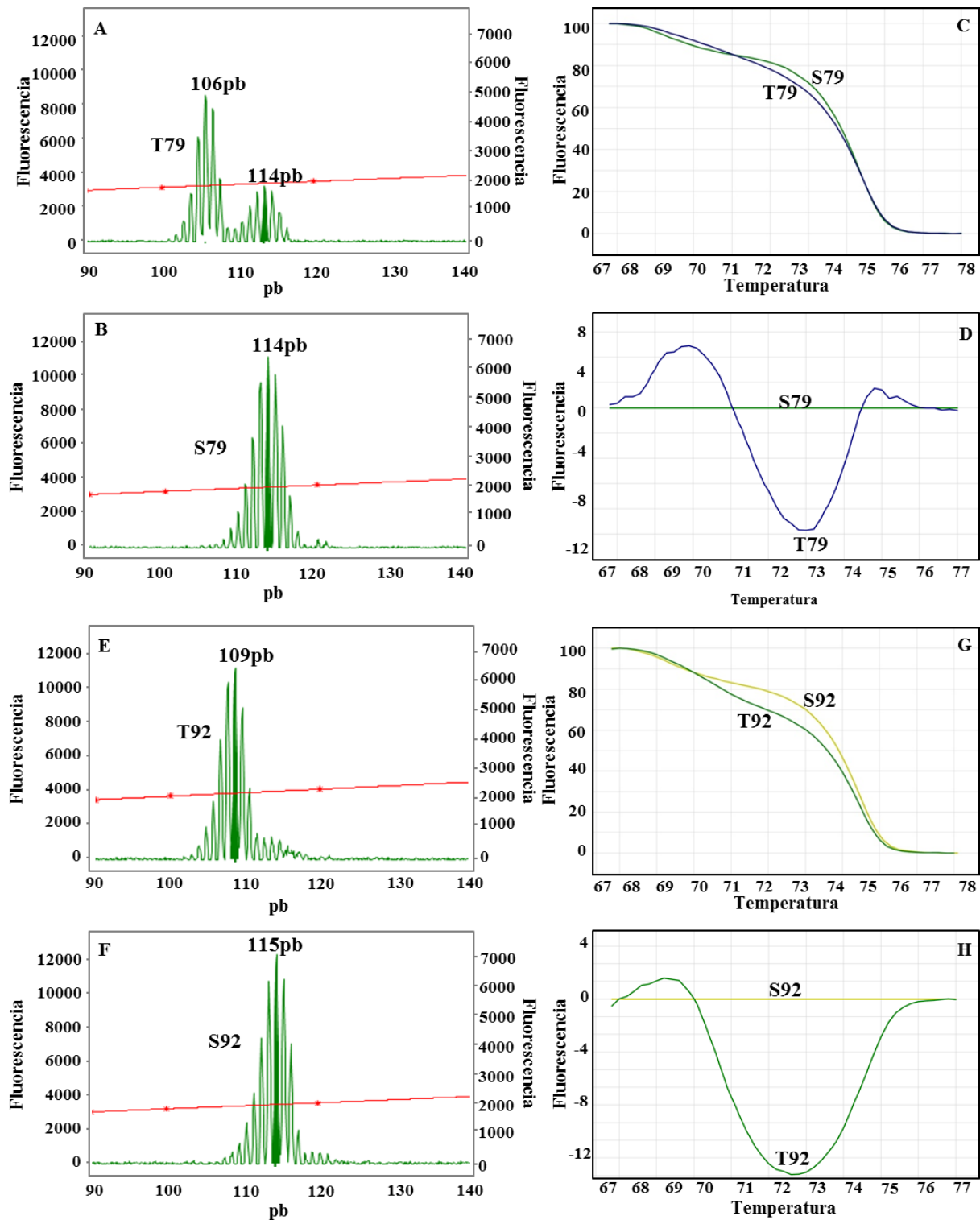


Figura 35. Comparación de resultados entre EC y HRM para BAT26

A y B- Mediante EC se visualiza un pico de 114pb correspondiente al ADN de tejido normal que se procesó junto con la porción tumoral (pico alterado a 106pb) en la extracción de los ácidos nucleicos, y además el pico “normal” (114pb) generado desde análisis de la SP (S79). C y D- Se observa la diferencia en las curvas de HRM normalizada y gráfica diferencial generadas a partir de ADN genómico sangre periférica (S79) vs. ADN del tumor (T79) del mismo paciente.

E y F- EC. Corrimiento de -6 pb entre el amplicón de BAT26 generado desde ADN de tejido tumoral (tumor T92) vs. el generado desde ADN de sangre periférica (S92) del mismo paciente, denotando la inestabilidad tumoral en BAT26. G y H- Se puede observar el mismo escenario descrito en E y F reflejado mediante las curvas de HRM normalizadas y gráfica diferencial respectivamente.

Las diferencias entre la longitud del amplicón del tejido tumoral vs. SP del mismo paciente fueron siempre negativas, como se observó también en el estudio de CAT25 y BAT25. Esta característica también se puede apreciar si se compara la extensión de los amplicones generados desde los tumores MSI(+) vs. los generados por la SP del grupo VLT tomados como rango normal (Figura 36).

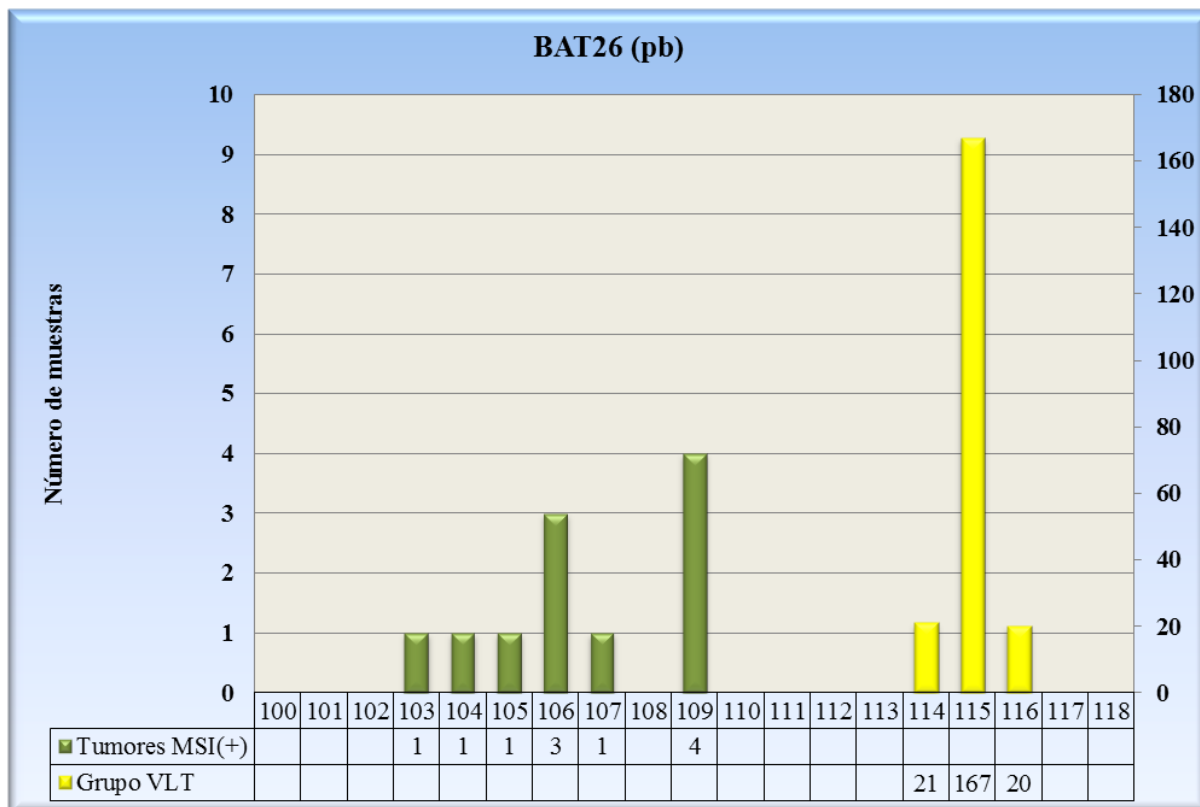


Figura 36. Distribución alélica de BAT26 en Tumores MSI (+) y grupo VLT

Visualización del largo de los amplicones de BAT26 generados desde ADN de tumores MSI(+) y de sangre periférica del grupo de voluntarios libres de tumor (VLT). Todos los tumores poseen menor largo en pares de bases que el rango normal establecido por el grupo VLT.

3.6 Sensibilidad y Especificidad Analítica de PCR-HRM para BAT26

La sensibilidad y especificidad analítica para este marcador fueron del 100% y 99% respectivamente. La especificidad no es la ideal, porque hubo un tumor que mediante PCR-HRM mostraba inestabilidad para este marcador, pero no presentaba dicha alteración al ser analizada con EC (Ver Tabla 2, página 65).

3.7 Valores Predictivos para BAT26

El valor VPP para este marcador fue de 85% (PCR-HRM) y 92% (EC), en tanto que VPN fue de 100% (para ambas técnicas) para predecir la MSI(+). Se observaron dos

resultados falsos positivos (tumores n° 87 y 107) desde la PCR-HRM y uno de ellos también mediante el análisis con EC (tumor n°107).

4. Resultados de los tres marcadores

Con el análisis global de los tres marcadores por las técnicas de PCR-HRM y EC se infirió la condición de MSI de los tumores estudiados. Del total de 110 casos, hubo 11 que poseían MSI(+) en sus tumores. Los resultados obtenidos por ambas técnicas en estos casos positivos se pueden visualizar en la Tabla 2.

Tabla 2. Tumores con MSI(+). Resultados de EC y PCR-HRM

	Muestra	CAT25 (pb)	BAT25 (pb)	BAT26 (pb)
	S35	66	120	116
	T35	62 y 66	120	109 y 116
Diferencia en EC		-4	0	-7
PCR-HRM		Alterado	No Alterado	Alterado
	S48	65	120	114
	T48	58 y 66	115 y 120	105 y 114
Diferencia en EC		-8	-5	-9
PCR-HRM		Alterado	Alterado	Alterado
	S55	66	120	116
	T55	59 y 66	115 y 119	109 y 116
Diferencia en EC		-7	-4	-7
PCR-HRM		Alterado	Alterado	Alterado
	S64	66	120	116
	T64	61 y 66	120	106 y 116
Diferencia en EC		-5	0	-10
PCR-HRM		Alterado	No alterado	Alterado
	S79	66	119	114
	T79	63	116 y 119	106 y 114

Diferencia en EC		-3	-3	-8
PCR-HRM		Alterado	Alterado	Alterado
	S92	66	119	115
	T92	64	114	109
Diferencia en EC		-2	-5	-6
PCR-HRM		Alterado	Alterado	Alterado
	S102	66	119	115
	T102	58 y 66	109 y 118	104 y 114
Diferencia en EC		-8	-10	-11
PCR-HRM		Alterado	Alterado	Alterado
	S108	66	120	115
	T108	57 y 66	113 y 120	103 y 115
Diferencia en EC		-9	-7	-12
PCR-HRM		Alterado	Alterado	Alterado
	S109	66	119	115
	T109	65	113 y 119	106 y 114
Diferencia en EC		-1	-6	-9
PCR-HRM		Alterado	Alterado	Alterado
	S115	66	121	115
	T115	62	111 y 120	109
Diferencia en EC		-4	-10	-6
PCR-HRM		Alterado	Alterado	Alterado
	S116	65	119	115
	T116	58 y 65	112	107 y 115
Diferencia en EC		-7	-7	-8
PCR-HRM		Alterado	Alterado	Alterado

MSI(+) : inestabilidad de microsatélites positiva. EC: Electroforesis capilar. PCR-HRM: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y curvas de fusión de alta resolución. "T": tumor. "S": sangre periférica.

5. Inmunohistoquímica

El análisis de IHQ fue llevado a cabo en nueve de los once tumores con MSI(+), (Figuras 37-41); los dos restantes (tumores 35 y 48) no pudieron ser analizados debido a inconvenientes técnicos. En los nueve tumores estuvo ausente la enzima PMS2 y en ocho de ellos tampoco se observó expresión de MLH1; en tanto que MSH2 y MSH6 estuvieron expresadas en todos los tumores estudiados por esta técnica (Tabla 3). Para algunos casos se pudieron analizar tanto la biopsia como el tejido tumoral luego de la resección de la parte afectada del colon (Pieza completa del CCR).

Tabla 3. Inmunohistoquímica en CCR MSI(+)

Nº de CCR	Muestra	MSH2	MSH6	MLH1	PMS2
35	-	n/d	n/d	n/d	n/d
48	-	n/d	n/d	n/d	n/d
55	Pieza completa	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
64	Pieza completa	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
79	Pieza completa	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
79	biopsia	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
92	Pieza completa	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
102	Pieza completa	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
102	biopsia	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
108	Pieza completa	n/d	FOCAL	NEGATIVO	NEGATIVO
108	biopsia	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
109	Pieza completa	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
109	biopsia	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
115	Pieza completa	POSITIVO	FOCAL	NEGATIVO	NEGATIVO
116	Pieza completa	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
116	biopsia	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

n/d: no determinado;

Todos los casos analizados por IHQ se correlacionaron correctamente con los resultados hallados en el estudio de MSI. Esto significa que, en todos los tejidos que se lograron analizar mediante los anticuerpos específicos se observó una incorrecta expresión en al menos una enzima reparadora del ADN, lo cual sustenta la inestabilidad observada en los microsatélites estudiados.

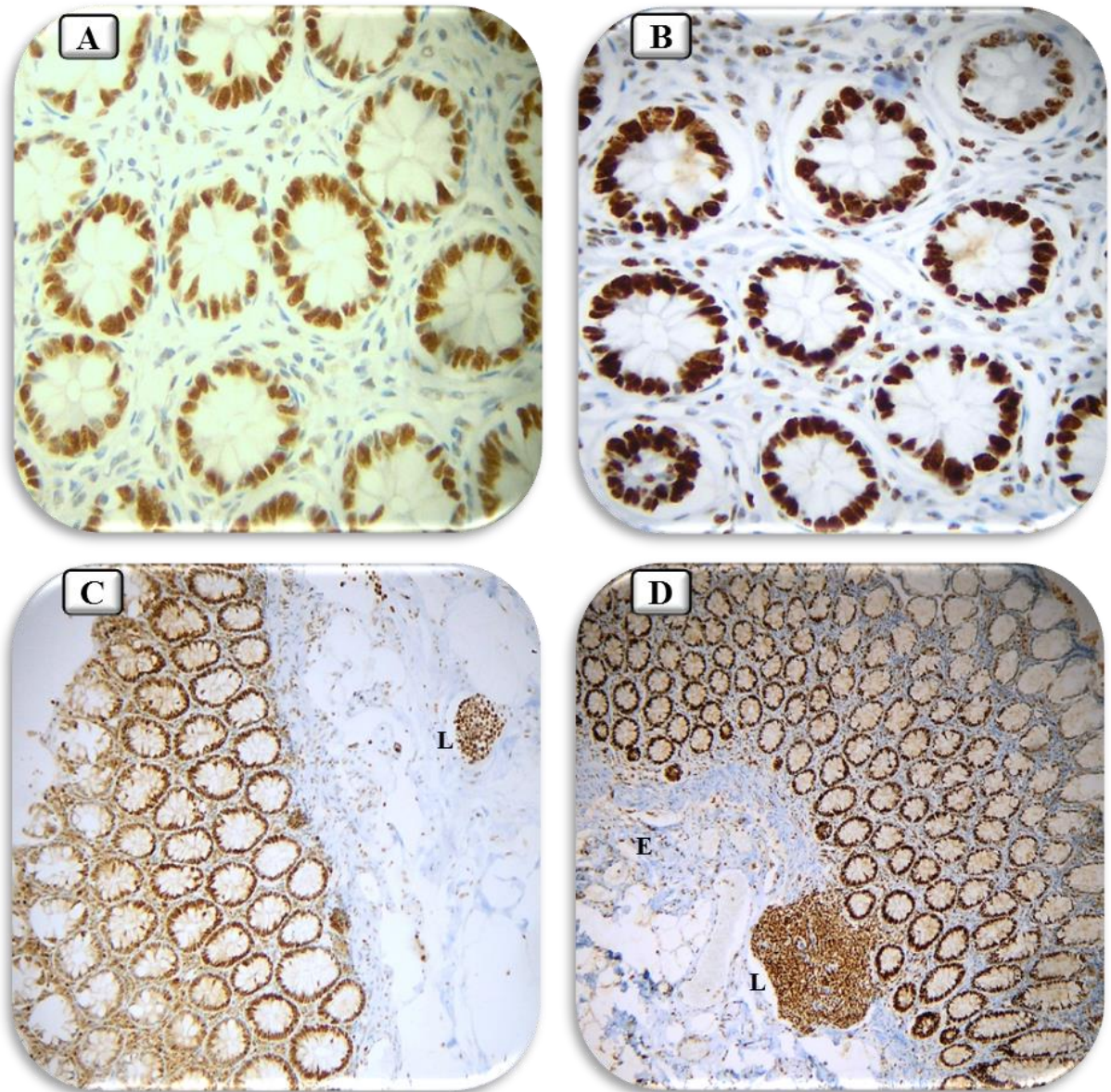


Figura 37. Búsqueda de enzimas del MMR por IHQ. Controles

A- Control positivo MLH1 (40X): mucosa colónica normal positiva. B- Control positivo MSH2 (40X): mucosa colónica normal positiva. C- Control positivo MSH6 (10X): mucosa colónica normal y tejido linfóide (L) asociado, positivos. D- Control Positivo PMS2 (10X): mucosa colónica normal, tejido linfóide asociado (L) y algunas células del estroma (E) con marcación positiva.

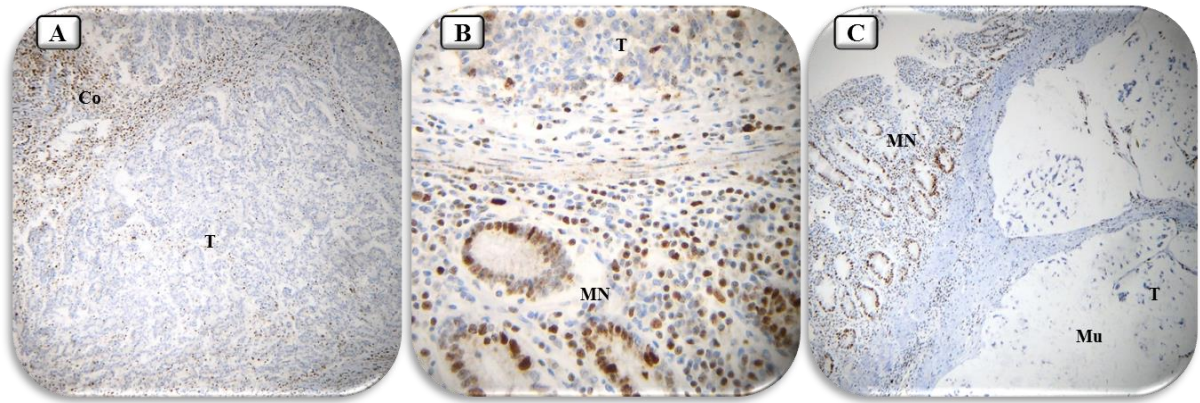


Figura 38. Marcación por IHQ para MLH1

A-Arriba: tejido conectivo (Co) positivo para MLH1, Abajo: tumor(T) negativo para MLH1. Visión a 10X. B-Arriba (40X): tumor (T) negativo para MLH1, Abajo: mucosa colónica normal (MN) positiva para MLH1. Visión a 40X.C- Arriba izquierda: mucosa colónica normal positiva para MLH1, Abajo derecha: tumor (T) negativo para MLH1, rodeado de mucina (Mu). Visión a 10X

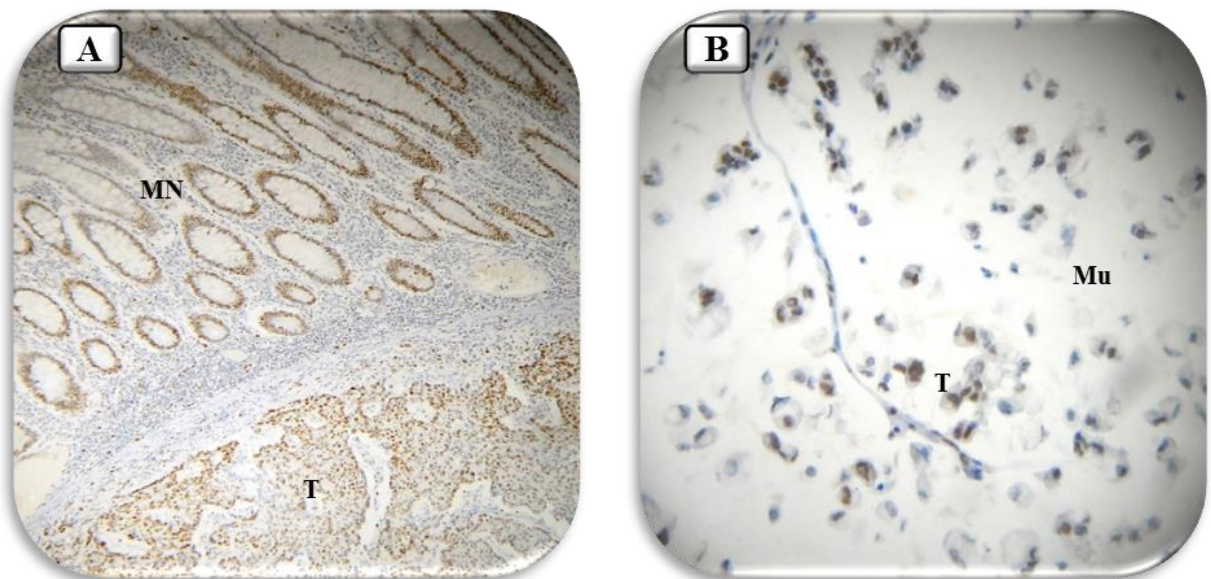


Figura 39. Marcación por IHQ para MSH2

A- Arriba: mucosa colónica normal (MN), Abajo: Tumor (T) positivo para MSH2. Visión a 10X. B- Tumor (T) positivo para MSH2, rodeado de mucina (Mu). Visión a 40X.

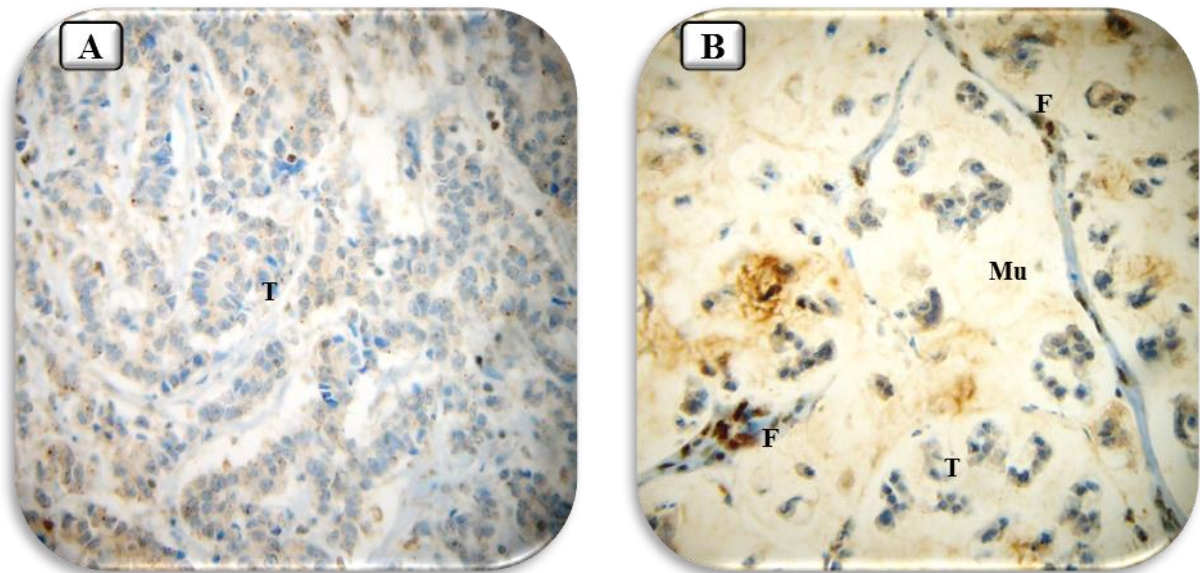


Figura 40. Marcación por IHQ para PMS2

A- Tumor (T) con marcación negativa para PMS2. Visión a 40X. B- : Se observan grandes lagos de mucina (Mu) con colgajos de células tumorales (T) negativas para PMS2 y tractos fibroconectivos (F) positivos como control interno. Visión a 40X.

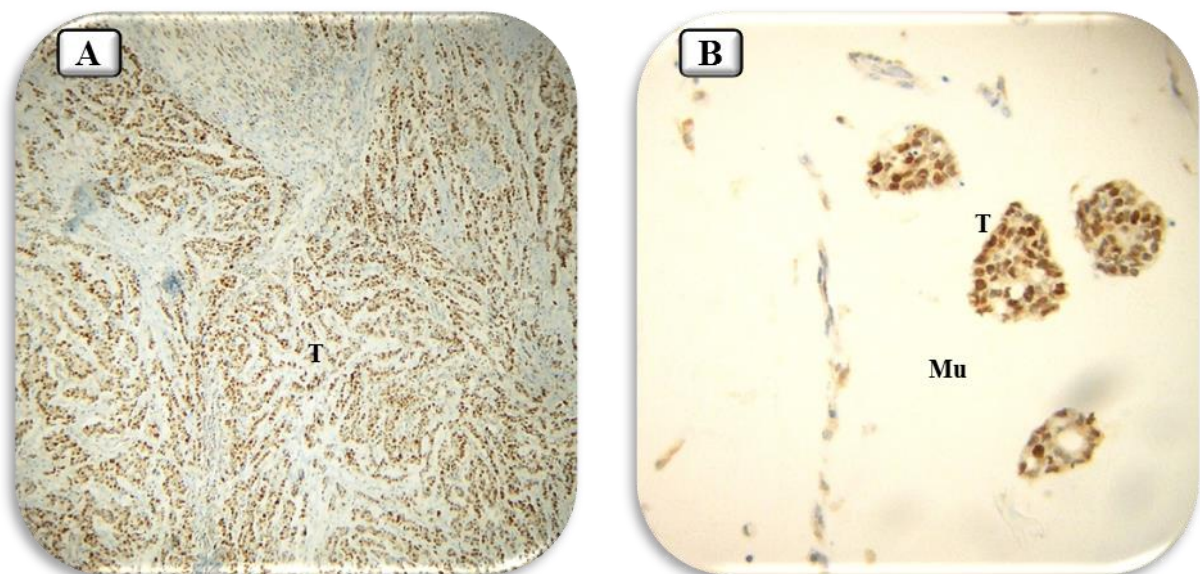


Figura 41. Marcación por IHQ para MSH6

A- Se observa tumor (T) con marcación positiva para MSH6. Visión a 10X. B- Se observa tumor (T) en colgajos positivos para MSH6 rodeados de mucina (Mu). Visión a 40X.

6. Análisis de datos clínicos

6.1 Datos clínicos de pacientes y tumores

Como se consignó, se estudiaron 110 pacientes con diagnóstico de CCR. En la Tabla 4, se pueden apreciar los datos de los mismos y las características anatómicas e histológicas de los tumores en estudio.

Tabla 4. Datos de los pacientes enrolados y sus tumores

Pacientes estudiados con diagnóstico de CCR (n)	110
Mujeres	43
Hombres	67
Promedio de edad (años)	66 (rango:30-89)
Ubicación anatómica del tumor	
Colon derecho	39
Colon transverso	4
Colon izquierdo	36
Rectosigmoideo	11
Recto	20
Histología	
Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	101
Adenocarcinoma pobremente diferenciado	5
Adenoma tubulovelloso con displasia de alto grado	4
Estadio	
I	19
II	33
III	34
IV	19
Infiltrado linfocitario	Si: 19; No: 91
Tumor mucinoso	Si: 27; No: 83
Metástasis	Si:27; No: 83
Higado:21; Pulmón:4; Peritoneo:3; Vejiga:2; Óseo, Epiplón, Suprarrenal: 1	

(hubo casos de múltiples metástasis)	
Antecedentes previos de CCR	Si:4; No:101; s/d: 5
Antecedentes familiares de CCR	Si:20; No:76; s/d: 14
Antecedentes familiares de cáncer (no CCR)	Si:47; No:49; s/d:14
Síntomas	Si:90; No:7; s/d:13
Dolor abdominal	Si:33(35%); No:60; s/d: 17
Dispepsia	Si:2(2%); No: 92; s/d:14
Cambio de habito	Si:30(31%); No:66; s/d:14
Diarrea	Si:21(22%); No:73; s/d:16
Constipación	Si:15(16%); No:77; s/d:18
Melena	Si:3(3%); No:91; s/d:16
Proctorragia	Si:43(45%); No:52; s/d:15
Anemia	Si:36(37%); No:61; s/d:13
Tamaño del tumor (cm)	
Promedio	4,5
Rango	0,2 - 6
Moda	6
s/d (n)	3
CEA prequirúrgico (ng/ml)	
(Rango normal: Fumador: hasta 9,5 ; No Fumador: hasta 1,6)	
Promedio	54
Rango	(0,7 – 885)
Moda	1,5
s/d (n)	27
Ambiente (n)	Si: 64; No: 43; s/d: 3
Tabaco	56
Obesidad	12
Alcohol	5

CEA: Antígeno carcinoembrionario

Con los datos extraídos desde las historias clínicas de los pacientes se correlacionaron los resultados del análisis de MSI con: género, edad, sexo, localización tumoral, tamaño tumoral, ambiente e histología.

Los datos clínicos nos proporcionaron correlaciones con certezas estadísticamente significativas entre tumores MSI (+) y el género femenino ($p=0,003$) (Figura 42), la localización en colon derecho ($p=0,0001$) (Figura 43), e histología mucinosa ($p=0,003$) (Figura 44).

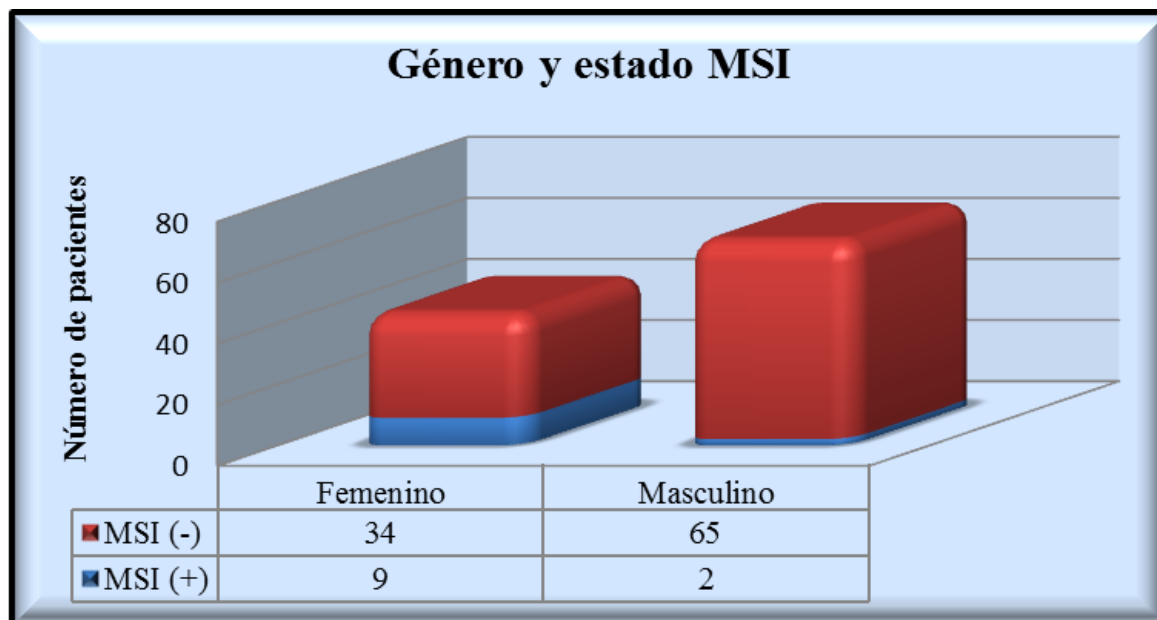


Figura 42. Correlación entre género y tumores MSI(+)

El género femenino es el que tuvo correlación estadísticamente significativa con tumores MSI(+), con $p=0,003$ y RR: 7,01 95% (IC 1,34 -26)

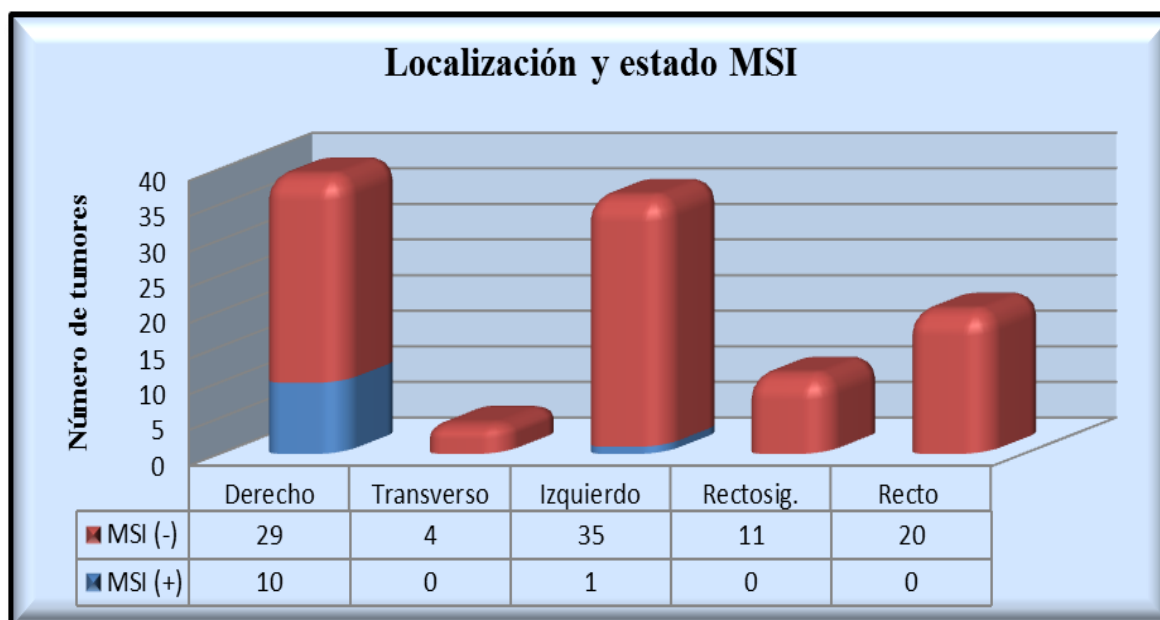


Figura 43. Correlación entre localización tumoral y tumores MSI(+)

El colon derecho fue el lugar anatómico que tuvo correlación estadísticamente significativa con tumores MSI(+), con $p=0,0001$ y RR: 18 95% (IC 1,68 -95). Rectosig: Rectosigmoides.

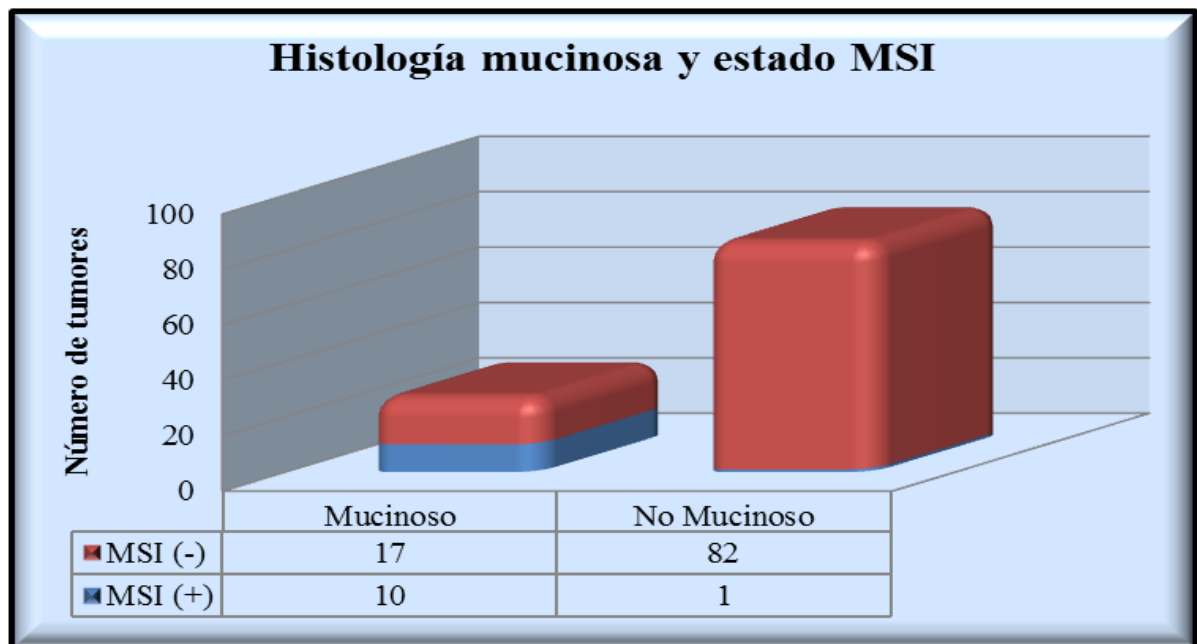


Figura 44. Correlación entre histología mucinosa y tumores MSI(+)

La presencia de mucina en los tumores se correlacionó en forma estadísticamente significativa con tumores MSI (+), con $p=0,003$ y RR: 8,62 95% (IC 2,21-27).

Las variables sin correlación entre los grupos con tumores MSI(+) y MSI(-) fueron: edad de presentación del CCR, denominación histológica, tamaño tumoral (diámetro), “ambiente” (tabaco, obesidad, alcohol) y antígeno carcinoembrionario prequirúrgico. La variable “metástasis” no alcanzó una diferencia significativa pero mostró una tendencia ($p=0,06$) ya que los pacientes con tumores MSI(+) no desarrollaron metástasis (Tabla 5).

Tabla 5. Variables no significativas entre casos de pacientes con tumores MSI(+) vs. MSI (-)

	MSI(+)	MSI(-)	
Promedio de edad (años)	70 (rango 55-80)	66 (rango 30-89)	p = 0,28
Denominación histológica			p = 0,40
<i>AMD(n)</i>	10	91	
<i>APD(n)</i>	1	4	
<i>ATVDA(n)</i>	0	4	
Metástasis	0/11	27/99	p = 0,06
Tamaño tumoral (media del diámetro,cm)	4,84	4,47	p = 0,50
Ambiente			p = 0,24
<i>Tabaco</i>	5	51	
<i>Obesidad</i>	3	9	
<i>Alcohol</i>	0	5	
<i>Más de un factor</i>	1	7	
<i>Ningún factor ambiental*</i>	4	39	
CEA prequirúrgico (media, ng/ml)	3,17	58,68	p = 0,26

*Se refiere a ninguno de los tres factores estudiados. CEA: Antígeno carcinoembrionario

7. Correlación de los casos MSI(+) con los criterios de Bethesda

De los 10 pacientes que poseían MSI(+) en sus tumores y datos para valorar la inclusión a los criterios, hubo 7 (70%) casos en que los criterios de Bethesda no se cumplieron, en tanto que en el grupo de MSI(-) hubo 22 (23%) que cumplían dichos criterios (Tabla 6). Esto denota una sensibilidad y especificidad analítica de los criterios para buscar casos MSI(+) del 59% y 81% respectivamente, en nuestro estudio.

En el grupo con MSI(+) la edad promedio de las personas que cumplían los criterios fue menor (58 años) que las que no lo hacían (74 años) (p= 0,007).

Tabla 6. Pacientes y Criterios de Bethesda modificados

	MSI (+) n:11‡	MSI (-) n:95 *
Cumple criterios	3 (30%)	22 (23%)
No cumple criterios	7 (70%)	73 (77%)

‡ Un paciente con tumor MSI(+) no poseía suficientes datos para clasificarlo (Caso 109). *Cuatro pacientes con tumor MSI (-), no tuvieron suficientes datos para clasificarlos.

7.1 Desglose de pacientes con tumores MSI(+) y criterios de Bethesda modificados

7.1.1 Pacientes que cumplen criterios

Caso 35: La edad de presentación del CCR estudiado fue a los 69 años, pero poseía un antecedente de CCR previo sin fecha especificada en la historia clínica. Su madre había padecido un cáncer de estómago a los 60 años. Los datos histológicos clasificaron a su CCR como, adenocarcinoma moderadamente diferenciado mucosecretante, con infiltrado linfocitario en estadio III

Caso 92: La edad de presentación del CCR fue a los 61 años, pero poseía antecedentes de cáncer de útero a los 57 años. Antecedentes familiares de cáncer: tías paternas con tumor cerebral, primos con tumor cerebral y hermana con cáncer de mama (sin datos de edad de presentación o número total). Los datos histológicos clasificaron a su CCR como, adenocarcinoma moderadamente diferenciado, estadio III.

Caso 102: La edad de presentación del CCR estudiado fue a los 55 años, pero poseía un antecedente diagnóstico de CCR a los 49 años. Además tuvo cáncer de piel a los 52 años con recidiva. El antecedente familiar de cáncer proviene de la madre (cáncer de mama, sin datos sobre la edad al diagnóstico). Los datos histológicos clasificaron a su CCR como, adenocarcinoma pobremente diferenciado mucosecretante, estadio III.

7.1.2 Casos MSI(+) excluidos del cumplimiento de los criterios de Bethesda

Los 7 casos que poseían tumores de CCR con MSI(+) pero que no quedaron incluidos en estos criterios poseían tumores con características histológicas mucinosas y 3 de ellos

presentaban además infiltrado linfocitario. Estos pacientes fueron diagnosticados con un CCR luego de los 60 años y el criterio número 3 de Bethesda no los permite incluir para realizar el estudio ya que sobrepasan el límite de edad especificado en ese criterio. A continuación se desglosan los casos de este grupo:

Caso 48: La edad de presentación del CCR estudiado fue a los 70 años, no poseía antecedentes de CCR previos. Su padre había padecido un tumor de riñón a los 62 años. Los datos histológicos clasificaron a su CCR como, adenocarcinoma moderadamente diferenciado mucosecretante, estadio III.

Caso 55: La edad de presentación del CCR estudiado fue a los 78 años, no poseía antecedentes de CCR previos, ni historia familiar de cáncer. Los datos histológicos clasificaron a su CCR como, adenocarcinoma moderadamente diferenciado mucosecretante, estadio III.

Caso 64: La edad de presentación del CCR estudiado fue a los 80 años, no poseía antecedentes de CCR previos, ni historia familiar de cáncer. Los datos histológicos clasificaron a su CCR como, adenocarcinoma moderadamente diferenciado mucosecretante, estadio II.

Caso 79: La edad de presentación del CCR estudiado fue a los 70 años, no poseía antecedentes de CCR previos, con historia familiar de cáncer de mama (familiar no especificado). Cirugía de mama, útero y ovario a los 62 años, sin datos sobre la causa de la misma. Los datos histológicos clasificaron a su CCR como, adenocarcinoma moderadamente diferenciado mucosecretante con infiltrado linfocitario, estadio I.

Caso 108: La edad de presentación del CCR estudiado fue a los 68 años, no poseía antecedentes de CCR previos, ni historia familiar de cáncer. Los datos histológicos clasificaron a su CCR como, adenocarcinoma moderadamente diferenciado mucosecretante, estadio II.

Caso 115: La edad de presentación del CCR estudiado fue a los 75 años, no poseía antecedentes de CCR previos, ni historia familiar de cáncer. Los datos histológicos clasificaron a su CCR como, adenocarcinoma moderadamente diferenciado mucosecretante con infiltrado linfocitario, estadio III.

Caso 116: La edad de presentación del CCR estudiado fue a los 79 años, no poseía antecedentes de CCR previos. Posee antecedente de CCR en la familia, pero sin más especificaciones en su historia clínica. Los datos histológicos clasificaron a su CCR como, adenocarcinoma moderadamente diferenciado mucosecretante con infiltrado linfocitario, estadio I.

8. Impacto de tumores MSI(+) en sobrevida y tratamiento

8.1 Sobrevida global y libre de enfermedad

La sobrevida global (Figura 45) y libre de enfermedad (Figura 46) se estudió a 5 años comparando los grupos de pacientes con tumores MSI(+) y MSI(-). En la SG, se puede observar una diferencia significativa ($p=0,02$) a favor de los que poseían tumores MSI(+), y un HR= 7 (95% IC 3-16) para el grupo con tumores MSI(-). En tanto que la SLE no mostró diferencias entre los grupos ($p=0,39$).

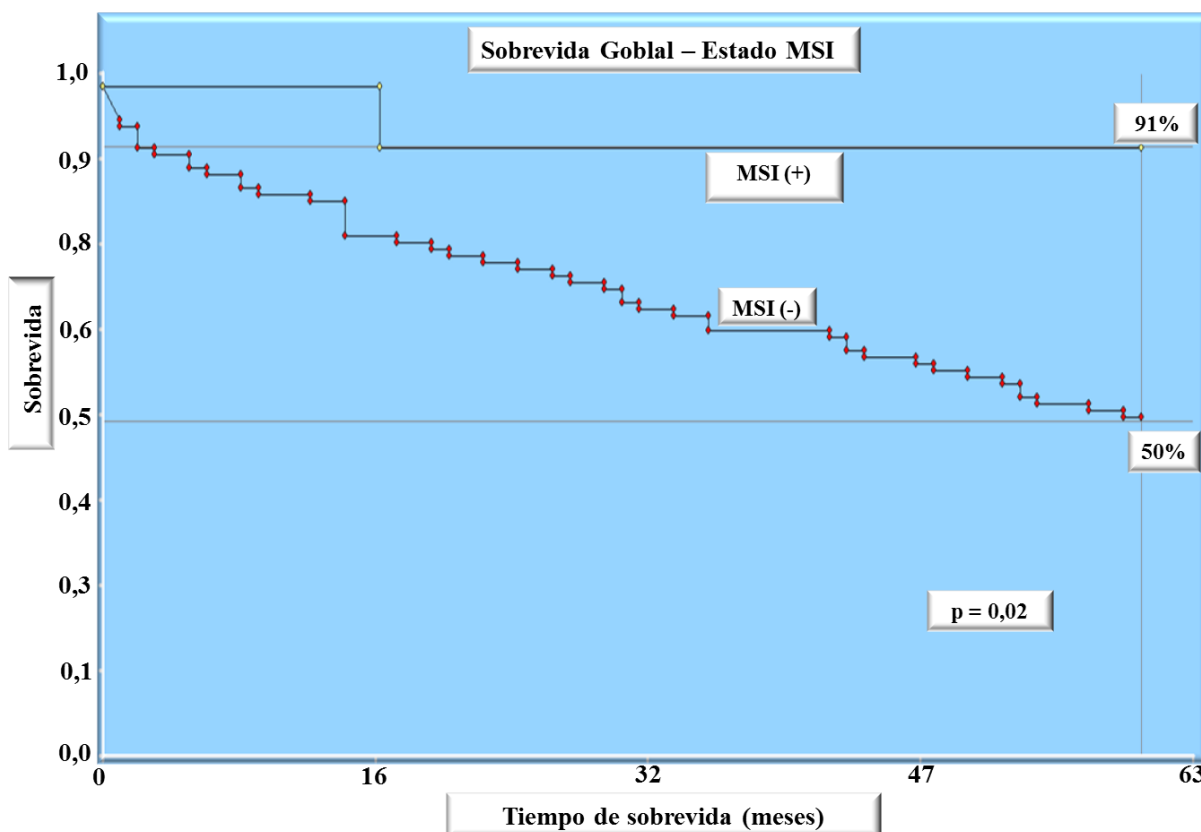


Figura 45. Curvas de sobrevida global

Las curvas se generaron a partir de la sobrevida global a 5 años desde 11 pacientes con tumores MSI(+) y 99 con tumores MSI(-). Programa utilizado: Infostat, versión 2014.

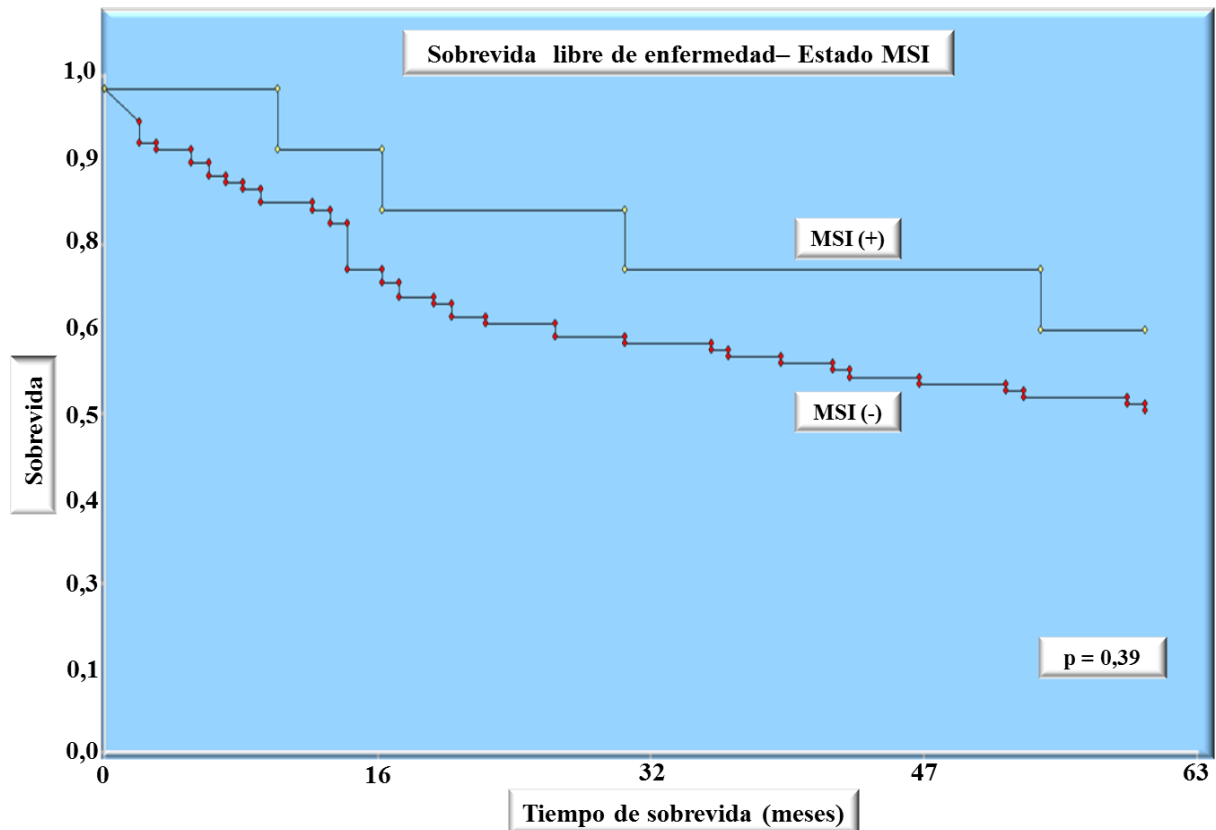


Figura 46. Curvas de sobrevida libre de enfermedad

Las curvas se generaron a partir de la sobrevida global a 5 años desde 11 pacientes con tumores MSI(+) y 99 con tumores MSI(-). (Programa Infostat, versión 2014)

8.2 Tratamiento adyuvante

Cuando se analizaron todos los pacientes sin tratamiento adyuvante (clasificados en cualquier estadio), se vió que el grupo de pacientes con tumores MSI(+) poseía una tendencia hacia una mejor SG a 5 años sin llegar a ser significativo ($p=0,08$) (Figura 47).

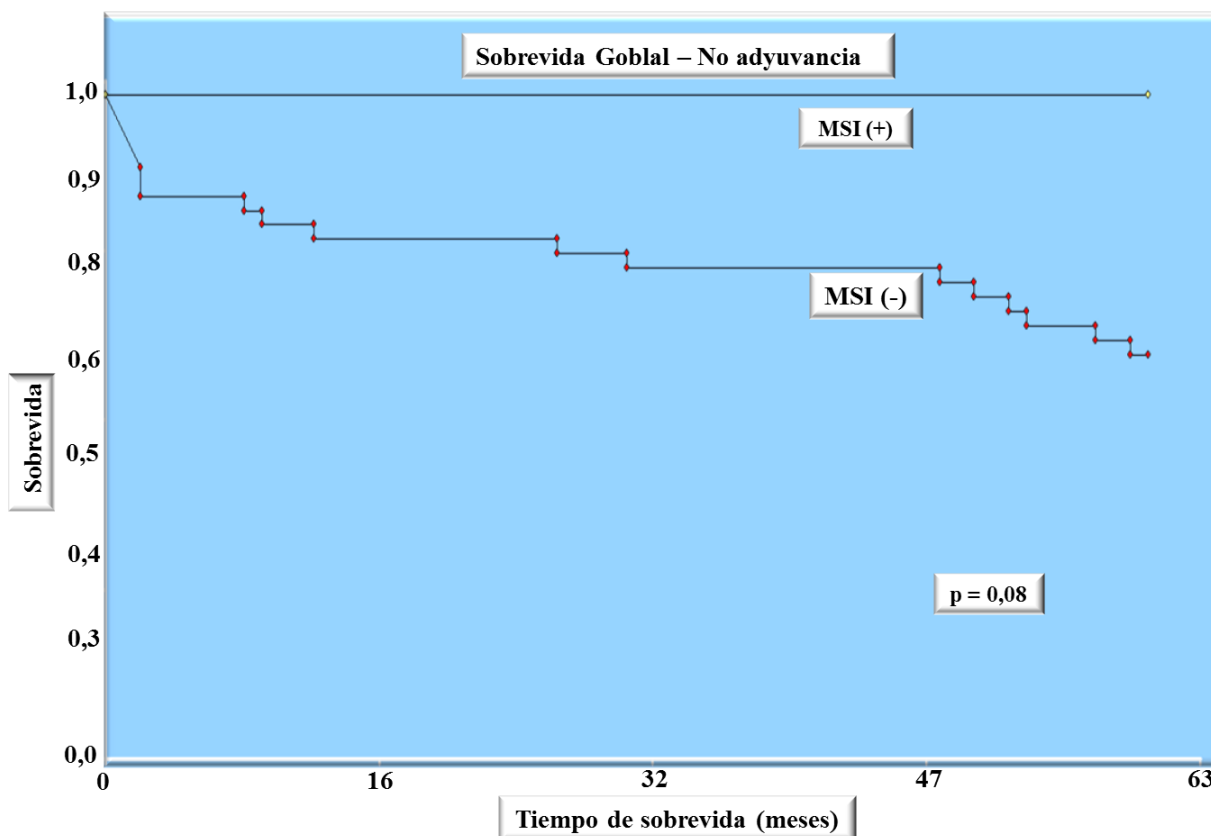


Figura 47. Sin tratamiento adyuvante y MSI. Sobrevivida Global

La gráfica fue extrapolada desde los datos de 6 pacientes con tumores MSI(+) y 47 pacientes con tumores MSI(-) calculando la sobrevivida de los mismos a 5 años. (Programa Infostat, versión 2014)

En la siguiente gráfica (Figura 48) se puede observar la SLE a 5 años de los pacientes no tratados con adyuvancia. No hubo diferencias significativas, $p=0,7$

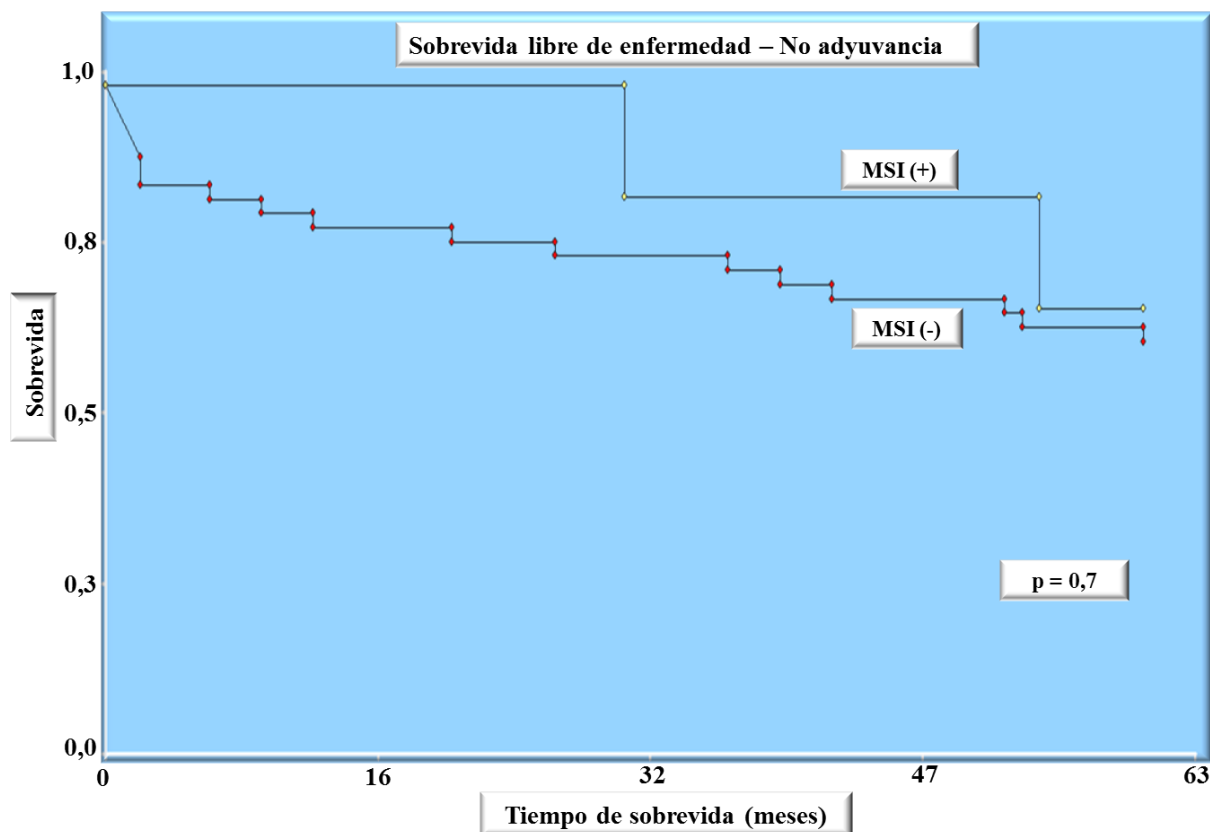


Figura 48. Sin tratamiento adyuvante y MSI. Supervivencia libre de Enfermedad

La gráfica fue extrapolada desde los datos de 6 pacientes con tumores MSI(+) y 47 pacientes con tumores MSI(-) calculando la supervivencia de los mismos a 5 años. (Programa Infostat, versión 2014)

8.3 Tratamiento adyuvante y estadio

En nuestro estudio no hubo pacientes con tumores MSI(+) en estadios I o II tratados con adyuvancia (no hubo pacientes MSI(+) con CCR en estadio IV). Además, debemos aclarar que 5 de los 6 pacientes en estadio III con MSI(+) fueron tratados con adyuvancia.

Al analizar los pacientes en estadio II no tratados con quimioterapia adyuvante, y considerando el estado MSI se obtuvieron las siguientes gráficas de SG y SLE a 5 años (Figuras 49 y 50). Los porcentajes de SG fueron 100 y 70% para los grupos con tumores MSI(+) y MSI(-) respectivamente, pero esta diferencia no llegó a ser significativa.

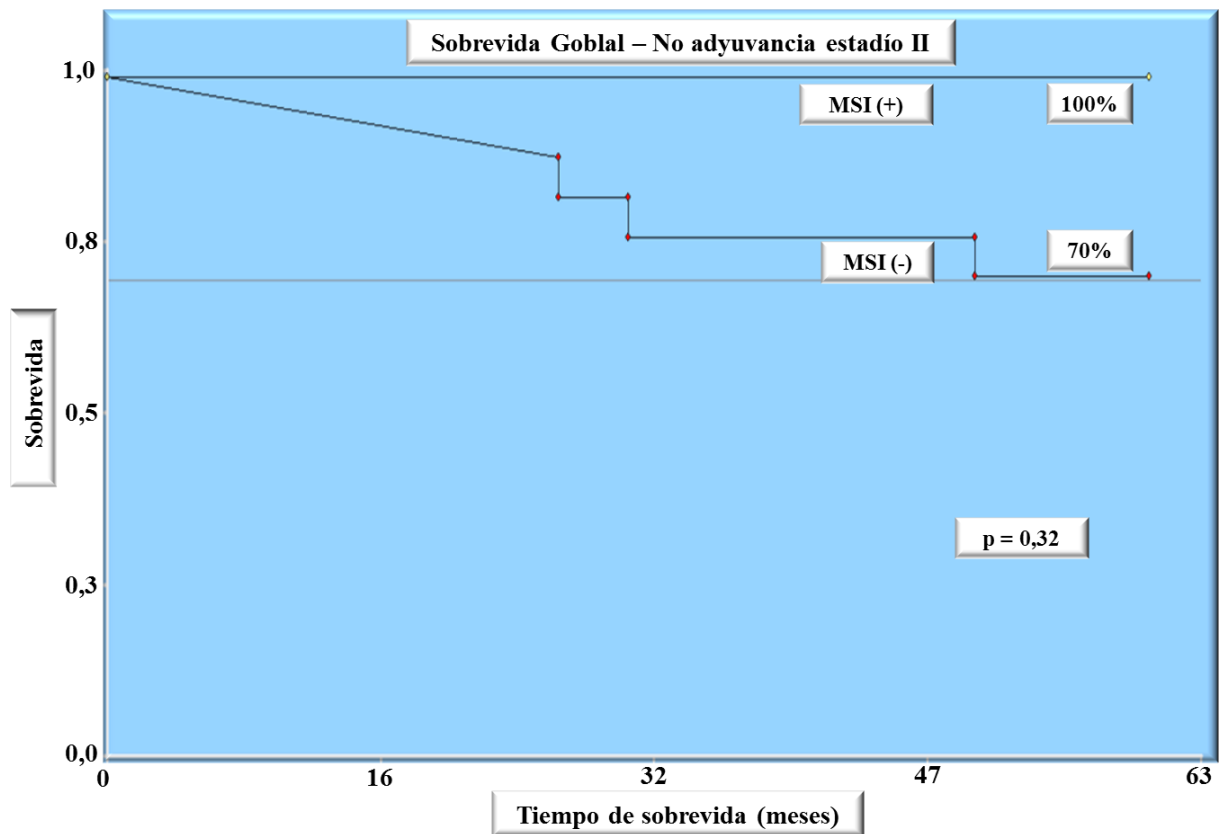


Figura 49. Sin tratamiento adyuvante y MSI en estadio II. Supervivencia Global

La gráfica fue extrapolada desde los datos de 3 pacientes con tumores MSI(+) y 17 pacientes con tumores MSI(-) calculando la supervivencia de los mismos a 5 años. (Programa Infostat, versión 2014)

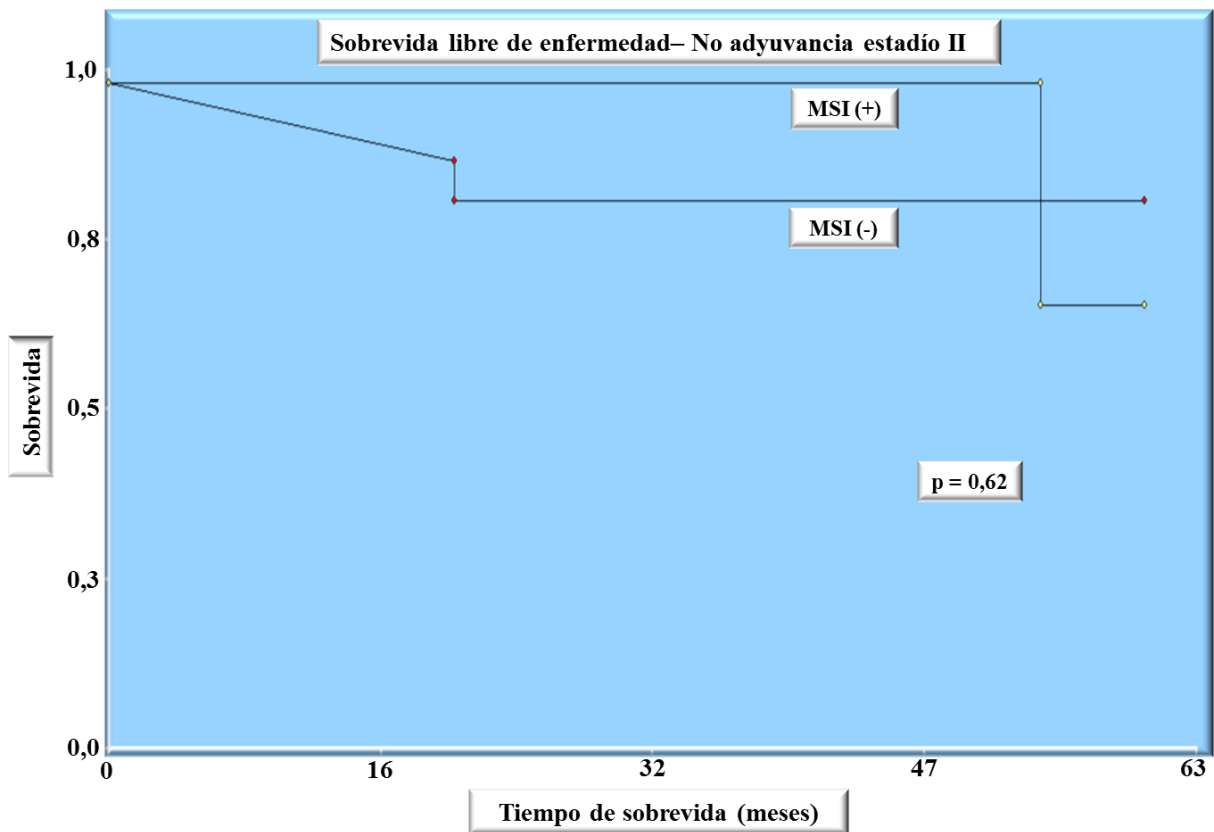


Figura 50. Sin tratamiento adyuvante y MSI en estadio II. Supervivencia libre de enfermedad

La gráfica se obtuvo desde los datos de 3 pacientes con tumores MSI(+) y 17 pacientes con tumores MSI(-) calculando la supervivencia de los mismos a 5 años. (Programa Infostat, versión 2014)

La SG y SLE de los pacientes en estadio III tratados con quimioterapia adyuvante se pueden visualizar en las Figuras 51 y 52 respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

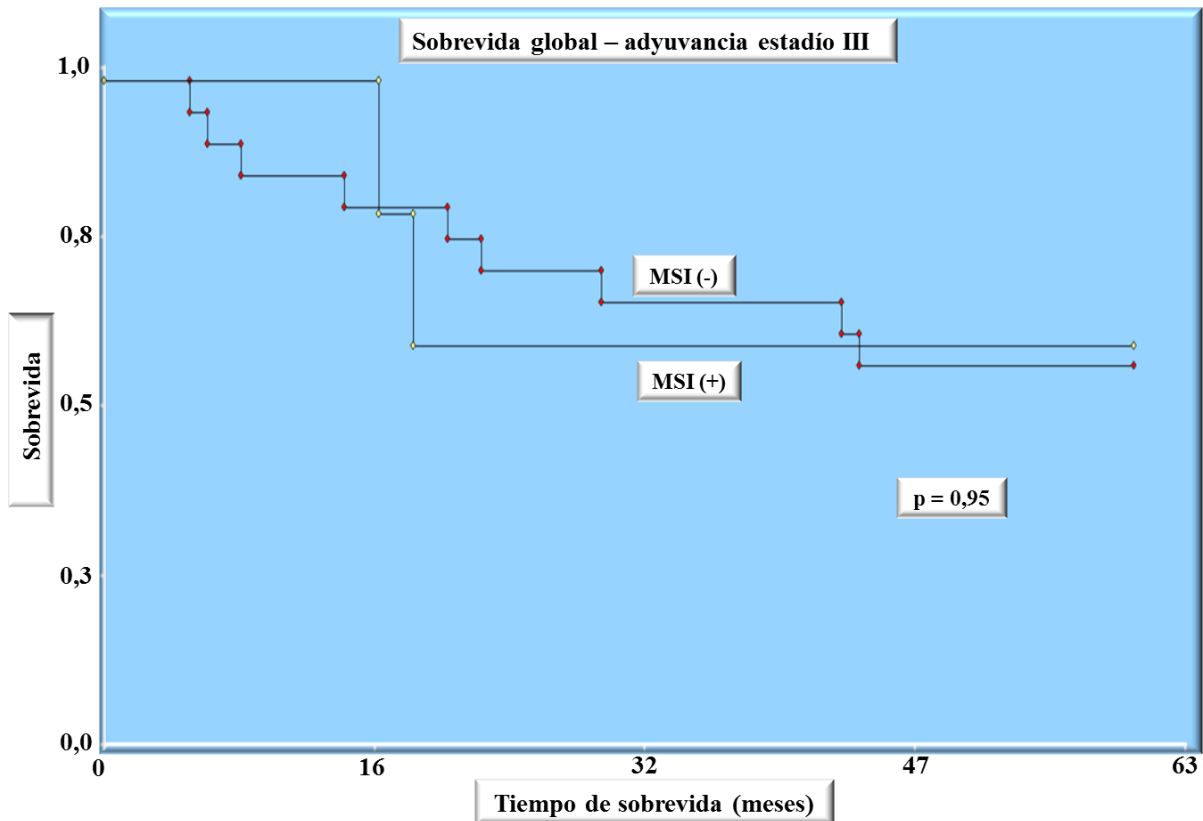


Figura 51. Tratamiento adyuvante y MSI en estadio III. Supervivencia Global

La gráfica fue extrapolada desde los datos de 5 pacientes con tumores MSI(+) y 21 pacientes con tumores MSI(-) calculando la supervivencia de los mismos a 5 años. (Programa Infostat, versión 2014)

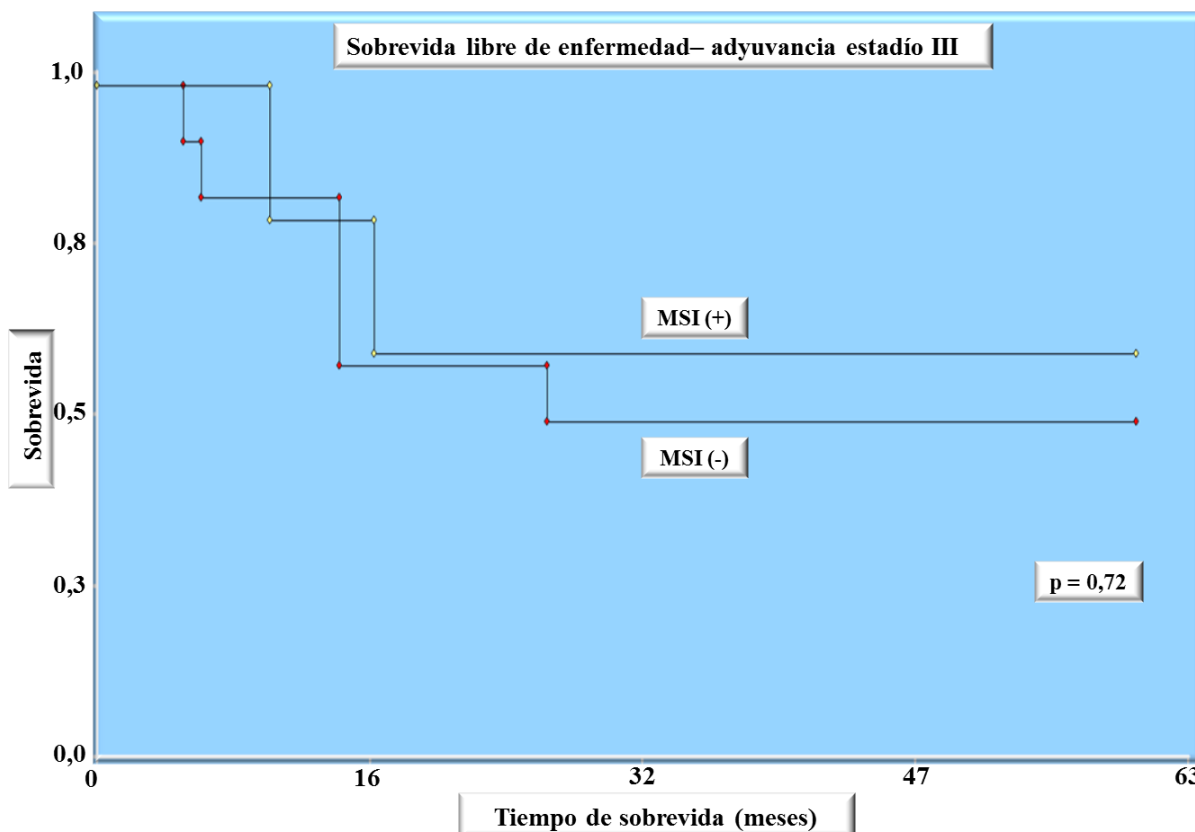


Figura 52. Tratamiento adyuvante y MSI en estadio III. Supervivencia libre de enfermedad

La gráfica fue extrapolada desde los datos de 5 pacientes con tumores MSI(+) y 21 pacientes con tumores MSI(-) calculando la supervivencia de los mismos a 5 años (p=0,72). (Programa Infostat, versión 2014)

8.4 Tratamiento neoadyuvante

De los 110 pacientes estudiados, solo 3 recibieron neoadyuvancia y todos tuvieron CCR con MSI(-). Debido a ello no se pueden extrapolar conclusiones acerca del estado MSI para este tipo de tratamiento en nuestro estudio.

DISCUSIÓN

En este estudio, establecimos la frecuencia de la inestabilidad de microsatélites en tumores de pacientes pertenecientes a nuestro ámbito (Córdoba y provincias aledañas), diagnosticados con CCR. Además, demostramos el comportamiento cuasimonómrfico poblacional de tres marcadores microsatélites, incorporando en el panel a CAT25. Este marcador mostró excelente eficacia en el estudio de MSI, con resultados inéditos para Argentina. En cuanto al tratamiento adyuvante, debería considerarse no suministrarlo a pacientes con tumores MSI(+) estadio II, ya que dicha condición tumoral está asociada a una sobrevida global beneficiada, aunque nuestros hallazgos para apoyar esta decisión no logren ser significativos, debido seguramente a un escaso número de pacientes que reúnen los criterios para el análisis. Respecto a pacientes con tumores MSI(+) en estadio III, la aplicación de adyuvancia en nuestra serie de casos no contribuye a una mejor SG o SLE. Pero no sabemos qué sucede con estos parámetros en personas con tumores MSI(+) en estadio III que no reciben adyuvancia ya que casi todos nuestros pacientes en estas condiciones tuvieron indicación de dicha medicación.

El tratamiento neoadyuvante no pudo ser evaluado ya que solo hubo pacientes con CCR MSI(-) que recibieron este tipo de terapia.

Por otro lado podemos afirmar que la PCR-HRM es una técnica apta para ser aplicada en el análisis de MSI con algunas ventajas sobre la EC.

Si bien nuestro estudio no tuvo el objetivo de identificar personas con SLy, sus resultados sientan las bases en nuestro medio para trabajar con más profundidad en el tema además de contribuir con herramientas que antes no estaban disponibles para el manejo clínico de pacientes que padecen esta enfermedad.

1. Estudio de CAT25, BAT25, BAT26 en CCR utilizando PCR-HRM y electroforesis capilar

La utilización de la técnica de PCR-HRM como cribado en el análisis de MSI esta incentivada por estudios genéticos previos con buenos resultados. La técnica posee una gran versatilidad que permite su aplicación en estudios de mutaciones que predisponen a enfermedades (118, 119), escaneo de genes (95, 120) y desordenes o enfermedades relacionados a metilación en genes (97, 121), además de su amplia aplicación en infectología (122). Los primeros estudios de microsatélites mediante PCR-HRM utilizando fluoróforos intercalantes de ADN, fueron publicados en 2008 y sus objetivos eran verificar identidad de

especies en plantas (Orégano, Olivo y Vid) (123, 124). Recién en el año 2010 se publicó el primer trabajo con muestras clínicas humanas en donde se estudiaron los microsatélites BAT25 y BAT26 en CCR utilizando el intercalante SYTO 9®. Para certificar la validez de los resultados los autores recurrieron a la EC como técnica patrón (115)

En tanto que la elección de los 3 marcadores utilizados en este estudio corresponde a: 1- las necesidades planteadas por las guías revisadas de Bethesda que promueven la utilización de mononucleótidos con tendencia hacia la cuasimonomorfosidad alélica poblacional en reemplazo de los marcadores dinucleótidos (43) y 2- tratar de disminuir el número de marcadores en el panel a estudiar obteniendo los mismos resultados que utilizando mayor cantidad de microsatélites (66, 69, 115). Como ejemplo se puede citar a Pedroni et al. (125), quienes usan el panel de Bethesda y remarcan que con solo la utilización de BAT25 y BAT26 se puede detectar con más eficiencia la pérdida de expresión de las proteínas MLH1 y MSH2 que el panel completo (93% vs 54%, respectivamente) y a su vez se obtiene mejor especificidad e igual sensibilidad a la hora de predecir una mutación germinal en los genes MLH1 y MSH2 (BAT25 y BAT26 especificidad 100%, sensibilidad 100% vs panel completo especificidad 70,7%, sensibilidad 100%) (125). En tanto que en el estudio publicado por Xicola et al. (126) comparan la utilización del panel de Bethesda contra un panel de 5 marcadores mononucleótidos (BAT25, BAT26, NR21, NR22 y NR24) y concluyen que el panel de mononucleótidos posee mejor sensibilidad (95,8%) y valor predictivo positivo (88,5%) que el panel de Bethesda (76.5 % y 65%, respectivamente) para la detección de tumores con deficiencia en el sistema MMR. Dichos autores mencionan además, que con solo la utilización de 2 marcadores mononucleótidos, BAT26 y NR24, se obtienen los mismos resultados que usando todo el panel de mononucleótidos (126)

El grupo de Hatch et al. (127) concluye que con solo la utilización de los marcadores mononucleótidos de su trabajo (BAT25, BAT26 y BAT40) fue suficiente para detectar todos los tumores defectuosos en el MMR, independientemente de los dinucleótidos utilizados.

Basados en estas premisas avaladas ampliamente por la bibliografía, el uso de CAT25, BAT25 y BAT26 nos permitió trabajar en forma confiable con las muestras en estudio, independizándonos del panel completo de Bethesda.

Nuestra utilización simplificada de la nomenclatura de MSI, donde MSI(+) es equivalente a MSI-H y MSI(-) es equivalente a MSI-L o MSS, se sustenta en trabajos previos (115, 128) y guías de consenso que asumen que los tumores con MSI-L y MSS no difieren clínica o patológicamente, y que a los fines prácticos deberían estudiarse como una misma unidad (43).

Las reacciones de PCR-HRM para detectar la inestabilidad en BAT25 y BAT26 que aplicamos en nuestro trabajo, estaban descritas y utilizan las mismas secuencias de iniciadores que las propuestas en el panel de Bethesda (115). Para poder utilizarlas, debimos poner a punto dichas técnicas teniendo en cuenta la diferencia de reactivos de la PCR y la aparatología usada. Además la validación de las mismas fue realizada de acuerdo a guías específicas para la implementación de técnicas genéticas, como ya se ha descrito (118).

En cambio, la técnica para detectar la inestabilidad en CAT25 estaba desarrollada para el análisis de este marcador mediante EC (66), pero no hay publicado hasta el momento una PCR-HRM con este objetivo. Nuestros primeros intentos de amplificar este microsatélite fueron realizados con las secuencias iniciadoras ya publicadas por sus descubridores, las cuales generan un amplicón de aproximadamente 147 pb (66), con resultados que no podían ser interpretados en una PCR-HRM debido a la generación de numerosos productos de amplificación y los altos CT que poseían dichos amplicones. Morandi et al. (129), describen el mismo problema al emplear los iniciadores antes mencionados para su análisis en EC. Por consiguiente, dichos autores decidieron incluir a CAT25 en su trabajo pero amplificándolo con otra secuencia de cebadores, aduciendo que el problema de los múltiples amplicones podía deberse a que la secuencia de ADN de uno de los cebadores pertenecía una secuencia repetitiva Alu lo cual favorecía la generación de estos productos no deseados. Esta situación nos llevó a la búsqueda de nuestros propios iniciadores para amplificar a CAT25, tratando de evitar las secuencias Alu que rodean al microsatélite y a su vez generando amplicones más pequeños, acordes a una PCR-HRM. Al disminuir el número de nucleótidos, los cambios mínimos de bases en una secuencia de ADN se logran detectar con mayor nitidez en una curva de fusión (130). Seguido de esto, comenzamos nuestros análisis con los nuevos cebadores NewCAT25 y Small CAT25, los que generan productos aproximados de 119 y 65 pb, respectivamente. Con el uso de NewCAT25, se logró mejorar la amplificación en relación a los CT obtenidos (< 30), pero el doble dominio de fusión generado en las curvas (Figura 13) no es lo recomendado para la técnica, ya que es indicativo de más de un producto de amplificación o un producto con más de un dominio de fusión, como ha sido reportado para otras secuencias blanco (92). La visualización del producto generado con NewCAT25 en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, mostraba una única banda de amplificación (datos no mostrados), pero este tipo de gel no posee la resolución adecuada para dilucidar la presencia de un doble producto de pesos muy cercanos.

Con el uso de SmallCAT25, se generó un amplicón más pequeño que cumplió con los requerimientos de una PCR-HRM, ya que presentaba CT válidos (aproximadamente 26) y mostraba un único dominio de fusión (Figura 14). La validación de la técnica concluyó con la

aplicación de los lineamientos para la implementación de técnicas genéticas citados en Pacientes y métodos. Debido a estos hallazgos, todos nuestros estudios en CAT25 utilizando muestras clínicas fueron llevados a cabo con los iniciadores SmallCAT25.

El estudio de MSI mediante EC de las muestras de CCR/SP de los pacientes enrolados, permitió terminar de validar la técnica de PCR-HRM para los tres marcadores en el ámbito clínico, debido a que la EC es la técnica de elección para el estudio de MSI y se tomó como patrón. Mediante la comparación de los resultados por ambas técnicas se pudo deducir la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para cada marcador.

En relación a la incidencia de la inestabilidad de los microsatélites estudiados, de los 110 tumores analizados, hubo 11 que presentaron MSI(+), esto representa un 10% del total, y es acorde con lo publicado en la literatura donde se encuentra un rango de 8 a 20% (131), siendo 15% la cifra más citada (132, 133).

Se debe destacar la buena correlación entre los resultados de ambas técnicas para los 3 marcadores estudiados y el funcionamiento óptimo de CAT25 cuando se incluye en un estudio de MSI, ya que cuando este marcador presentó inestabilidad (por cualquiera de las dos técnicas) en una muestra tumoral, el tumor fue siempre catalogado con MSI(+), y cuando un tumor no poseía inestabilidad en CAT25, el tumor fue siempre MSI(-), esto significa que sus VPP y VPN fueron del 100%. Esta efectividad concuerda con los hallazgos de los trabajos que utilizaron a CAT25 como un nuevo marcador de MSI y que sugieren su utilización en reemplazo del panel completo de Bethesda (65, 66), o como se publicó recientemente, siendo su uso equivalente a un panel comercial usado ampliamente (134). Para certificar estos posibles reemplazos se deben seguir realizando estudios que incluyan a CAT25, como ha venido sucediendo desde los primeros trabajos que sentaron las bases de su análisis en MSI (48, 68, 136).

Los estudios del grado de monomorfismo para estos 3 marcadores microsatélites se han realizado en otras poblaciones (66), pero no existen publicaciones de este tipo de análisis en Argentina. Al ser marcadores genéticos pueden variar dependiendo de la etnia, por ello se decidió realizar el estudio en ADN de SP del grupo VLT para analizar esta característica. Los resultados obtenidos mediante EC, demuestran que en una población como la nuestra, la cual presenta una mezcla étnica alta (114), también poseen la característica de cuasimonomórficos, con los rangos de “normalidad” más acotados en CAT25 (64-66pb) y BAT26 (114-116pb) que en BAT25 (116-121pb). Estos hallazgos permiten el estudio en nuestra población del ADN de un CCR dado, independizándose de la comparación con el análisis del ADN de células sanas derivadas del mismo paciente, como ya se publicado para otras poblaciones (69, 126, 136). La forma de interpretar los resultados utilizando EC en este procedimiento

(utilizando solo ADN tumoral) es la siguiente: cuando la longitud, en pb, de un dado microsatélite no se encuentra dentro del rango de normalidad de ese marcador, el tumor se considera con inestabilidad para dicho microsatélite, pero si el largo del amplicón está dentro del rango normal, ese tumor no posee inestabilidad en el marcador estudiado. La importancia de este procedimiento simplificado recae en los casos donde sólo se tiene una muestra tumoral sin SP disponible del paciente en estudio (por ejemplo el caso de un probando fallecido) y obviamente sin un microscopio con captura de láser que permite seleccionar desde un tejido parafinado células sanas y tumorales para el estudio. Además los costos de reacción disminuyen cuando sólo se procesa una muestra (solo tumor) en vez de dos (tumor y células sanas) por paciente. Una condición que se debe cumplir para poder realizar este procedimiento simplificado es la utilización de más de un marcador microsatélite mononucleótido con característica cuasimonomórfica, ya que algunos tumores pueden presentar productos de amplificación que estén incluidos dentro del rango establecido como “normal”. Las guías revisadas de Bethesda (43) citan un estudio que incluye 5 marcadores de este tipo (BAT25, BAT26, NR21, NR22 y NR24), en donde los autores encuentran que con este panel pueden establecer el estado MSI de un CCR con 100% de sensibilidad y especificidad sin depender del estudio del ADN germinal (117). El limitante de este trabajo es el número acotado de VLT analizados por etnia (128 individuos caucásicos y 56 individuos de ascendencia africana). Los autores de esta publicación sugieren más estudios con este panel abarcando otros tipos de etnias.

En nuestro trabajo, y sólo en el análisis de CAT25, la longitud de un amplicón de un tumor con MSI(+) estuvo incluido en el rango normal cuasimonomórfico (Figura 22), pero en nuestro caso no hubo problemas de interpretación (ya sea mediante EC o PCR-HRM) ya que contábamos con el ADN germinal para hacer el análisis comparativo. Hubo amplicones de tumores MSI(+) que estuvieron al borde del rango normal en CAT25 (2 casos con 63pb, Figura 22) y BAT25 (1 caso con 115pb, Figura 29). En tanto que BAT26 no mostró este comportamiento y presentó la mayor distancia entre la longitud de un amplicón perteneciente a un tumor MSI(+) y su rango normal (5pb, Figura 36).

De acuerdo a lo hallado, se podría asumir que si se trabaja sólo con muestra tumoral y este panel (CAT25, BAT25 y BAT26), se deben analizar los tres marcadores mediante EC. El uso de la PCR-HRM posee aquí su limitación ya que siempre debe compararse una curva de fusión “normal” vs. la generada por el ADN tumoral.

Técnicamente se podría decir que la PCR-HRM necesita de un ADN de partida ajustado a cierta concentración (en nuestro caso se trabajó con 25 ng/ul) para lograr CT parejos entre las muestras y que las curvas de fusión puedan ser comparables, también es

aconsejable el mismo método de extracción de ácidos nucleicos y la misma marca o composición de reactivos (no se pueden usar 2 mezclas de reacción para PCR-HRM por más que posean el mismo fluoróforo intercalante) para que las sales en los tubos de reacción sean lo más homogéneas posibles en su composición y concentración, ya que las curvas de fusión se ven afectadas por este componente, que puede distorsionar los resultados.

Los tres termocicladores utilizados para el estudio de CAT25 lograron resultados interpretables e idénticos en este marcador, pero teniendo en cuenta que las características técnicas varían, la mayor capacidad de resolución se pudo apreciar cuando se trabajó con el Z480. Esto tal vez se deba a las 25 adquisiciones de lectura por °C que posee (frente a las 10 adquisiciones de lectura por °C que ofrecen ECO y RG) y un programa específico para HRM con más variantes para el análisis de los resultados. Los tiempos de amplificación son comparables en los tres aparatos siendo el ECO el más rápido (49 minutos), en tanto que en la etapa de HRM difieren bastante, provocando que el RG posea el tiempo total de reacción más elevado debido a que en su etapa de HRM toma lecturas en el modo “paso a paso” (38 minutos) y no en modo continuo como sucede en ECO (6 minutos) y Z480 (20 minutos) (Tabla 7, Anexo 3).

Esto significa que si bien los resultados son comparables en los tres termocicladores, el mejor equilibrio entre calidad y rapidez técnica se logra con el Z480, al menos para la detección de CAT25 con las condiciones de reacción mencionadas anteriormente.

2. Inmunohistoquímica en CCR con MSI(+)

Según los estudios realizados mediante IHQ para ver presencia o ausencia de las enzimas reparadoras del ADN, podríamos decir que sus resultados son coincidentes con los hallados por el análisis de MSI en las muestras tumorales con MSI(+) de nuestra serie de casos. La falta de una correcta expresión de la enzima MLH1 en 8/9 de los tumores puede deberse principalmente a tres causas: una mutación germinal que afecte su expresión en el gen que la codifica (proteína nula, trunca o sin actividad enzimática), lo que identificaría casos de SLy. La otra posible razón sería la hipermetilación en el promotor del gen que la codifica (en ambos alelos), lo cual se relaciona a casos esporádicos. Y la tercera causa sería combinada, ya que habría presencia de una mutación germinal en uno de los alelos y la hipermetilación anularía la expresión del otro. En la bibliografía está descrita una cuarta causa que propone a la hipermetilación de MLH1 transmitida en forma hereditaria, esto se presentaría en familias

con fenotipo de SLy pero sin mutaciones germinales (137). Esta última causa necesita de más estudios que la avalen.

La incorrecta expresión de la enzima PMS2 en 9/9 de los tumores estudiados, demuestra la dependencia de la enzima “obligatoria” MLH1 para formar un heterodímero estable (MutL α) que funcione correctamente en el MMR, ya que si esto no sucede, se producirá una degradación proteolítica de ambos componentes del dímero (98). También, la ausencia de este heterodímero puede deberse a la influencia de la sobreexpresión de microRNA-155 que puede actuar como regulador negativo en la expresión de estas enzimas induciendo un fenotipo mutador y presencia de MSI(+) tumoral (138).

Sólo en un tumor de los analizados, no se encontró a PMS2 pero sí a MLH1, como ya se ha publicado (127). Este caso, puede tener su origen debido a una mutación en el gen que codifica a PMS2, que no permita su correcta expresión. Otra causa que puede sustentar estos resultados, aunque menos frecuente, es una mutación germinal en MLH1 que no afecta antigénicamente a la proteína y sería detectada por el panel de anticuerpos usado, pero funcionalmente no sería una enzima activa (127). Así, esta alteración puede culminar en la degradación de PMS2 por una causa indirecta a una mutación en dicha enzima (98, 101).

La presencia de las enzimas MSH2 y MSH6 en los tejidos estudiados es un resultado razonable si se tiene en cuenta lo observado con MLH1 y PMS2 en los tumores con MSI(+) ya que con la falta de una correcta actividad en estas últimas se justifica la inestabilidad en los marcadores microsatélites estudiados.

Se debe destacar, que el estudio de IHQ demostró la presencia “Focal” de la enzima MSH6 en dos casos (Caso 108 y 115, Tabla 3). Esta situación resalta la dependencia del “operador” al momento de interpretar la IHQ.

Por otro lado, según lo reportado en la bibliografía, cada Centro posee un primer paso en el algoritmo de cribado en Sly, comenzando con IHQ o MSI de acuerdo a sus posibilidades, necesidades y experiencia (139). Lo que debe quedar en claro es que el estudio de MSI y la IHQ son técnicas complementarias, ambas con virtudes y falencias ya enumeradas en la Introducción. Lo ideal sería que la institución que tenga la posibilidad de ofrecer ambas técnicas, debería optar por dicha opción para cubrir todas las posibilidades, sobre todo en casos con alta sospecha de origen hereditario. Un trabajo reciente publicó un análisis de los diferentes algoritmos para poder clasificar los CCR deficientes en el MMR en dos subgrupos: esporádicos y pertenecientes al SLy (133). En sus resultados se puede observar que la utilización concomitante de los análisis de MSI, IHQ y mutación V600E en BRAF, seguido de secuenciamiento del gen o genes del MMR (si fuera necesario), posee los mejores resultados para realizar la clasificación citada de los CCR.

3. Correlación de los datos epidemiológicos y clínicos con resultados del estudio de MSI

A pesar de que el CCR es una de las principales causas de muerte por cáncer en nuestro país, la estandarización y consiguiente implementación de un régimen de pesquisa a nivel nacional no está establecido y la iniciativa de su difusión es escasa. Al igual que muchos otros tipos de cáncer, el CCR se produce en más del 90% de los casos en personas mayores de 50 años, razón por la cual el envejecimiento que se observa en la población (por aumento en la expectativa de vida) representa un factor primordial a tener en cuenta para analizar las estrategias de control de la enfermedad en los próximos años (140). En nuestro país se estima que para el año 2030, habrá un total de 6.400.000 personas \geq 65 años, lo que representa un crecimiento del 49% con respecto a 2010 (2).

En nuestro estudio, ninguno de los casos de CCR se detectó mediante un esquema de pesquisa ya sea “oficial” o “personal”. Debido a la amplia disponibilidad de técnicas de cribado disponibles, se debería hacer énfasis en su utilización y difusión a nivel poblacional, con la reducción lógica de la incidencia y mortalidad del CCR, como ya ha sido reportado en países desarrollados (141) que vienen aplicando medidas de salud acorde con lo que exige esta patología.

En cuanto a los síntomas, los más frecuentemente encontrados en nuestra serie de casos fueron: sangrado (Proctorragia y melena) 48%, anemia 37%, dolor abdominal 35% y cambio de hábito 31%. Estos valores se corresponden con lo publicado. En efecto, una revisión sistemática sobre síntomas y atención primaria en CCR del año 2011, englobó 81.464 casos y sus hallazgos sugieren que el sangrado y la anemia poseen valor a la hora del diagnóstico, independientemente si hay presencia o no de otros síntomas, en tanto que los demás síntomas estudiados tenían menor riesgo asociado cuando se los analizaba como variable individual (142). Sin embargo, un meta-análisis demostró que sólo la pérdida de peso tenía algún valor diagnóstico con alta especificidad y que otros síntomas como diarrea, constipación, cambio de hábitos intestinales y dolor abdominal mostraron una pobre función en el diagnóstico (143).

Se podría decir que los síntomas más comunes son orientativos y deben tenerse en cuenta, pero no existen síntomas que anuncien con gran efectividad la presencia de un CCR, y además pueden originarse por causas diferentes al CCR.

Las variables o características que en nuestra serie de casos, estuvieron relacionadas con significación estadística a pacientes con tumores que poseían MSI(+) fueron: localización

en colon derecho, histología tumoral mucinosa y género femenino, en tanto que la presentación de metástasis, solo llegó a mostrar una tendencia con significación estadística a pesar de que ningún caso de CCR MSI(+) presentó diseminación tumoral a otros órganos. Estos hallazgos concuerdan con lo publicado para tumores con MSI(+) (31, 47, 144). Las variables que no poseían correlación estadísticamente significativa fueron: el promedio de la edad de presentación de los casos, la denominación histológica, el tamaño tumoral, el valor de CEA prequirúrgico y el “ambiente” (tabaco, alcohol, obesidad).

El promedio de edad en nuestra serie de casos con CCR MSI(+)(promedio 70 años, rango: 55 - 80) nos induce a pensar que el factor desencadenante del tumor es en su mayoría de origen esporádico. Se debe tener en cuenta que en este grupo hubo casos con presentación de tumores anteriores a los CCR estudiados, esto disminuye la edad de presentación en estos casos particulares por debajo del rango de edad calculado.

La bibliografía muestra que los CCR con MSI(+) poseen generalmente una presentación histológica pobremente diferenciada (31, 51), pero en nuestro estudio no podemos confirmar que esta característica se destaque en este grupo, ya que solo uno de los 11 CCR con MSI(+) fue clasificado como adenoma pobremente diferenciado. Aunque también podemos ver que solo hubo 4/99 (4%) tumores pertenecientes al grupo MSI(-) clasificados como adenomas pobremente diferenciados y este bajo porcentaje no concuerda con lo publicado en la bibliografía en donde se pueden observar porcentajes más altos de tumores pobremente diferenciados en dicho grupo (16%-62%) (70, 129). Esto podría demostrar la clasificación operador dependiente que posee dicha evaluación histológica.

4. Evaluación de los criterios de Bethesda

En el grupo de pacientes con tumores MSI(+) y que cumplían los criterios de Bethesda la variable edad fue estadísticamente significativa cuando se comparaba con aquellos que no cumplían los criterios. La edad promedio en el primer grupo fue menor (58 vs. 74 años). Debido a ello, los tres pacientes de este grupo (casos: 35, 92 y 102) podrían ser catalogados como pertenecientes a SLy, pero esto debe ser confirmado por el secuenciamiento de los genes del MMR.

Para el caso 35 se deberían estudiar todos los genes del MMR ya que no tuvimos posibilidad de realizar el estudio de IHQ en su tumor debido a los problemas citados. En tanto que el caso 92 no tenía presencia de MLH1 o PMS2 en el tejido, por lo que el estudio de

mutaciones debería estar centrado en estos genes. Por último, el caso 102 mostraba ausencia de PMS2 y presencia de todas las otras enzimas reparadoras en el tejido. Lo que se debería hacer es nuevamente, énfasis en la búsqueda de alteraciones en la secuencia de ADN de PMS2 pero también del gen MLH1, ya que como ya se discutió, la posibilidad de encontrar una mutación en PMS2 responsable de SLy es baja y MLH1 puede estar expresándose bien antigénicamente pero tener una actividad enzimática disminuida o nula.

Los pacientes que poseían su tumor con MSI(+) pero que no cumplían los criterios, orientados además por la avanzada edad de presentación de sus tumores, podría decirse que pertenecen a casos esporádicos, pero para demostrar esta suposición se deberían realizar estudios de metilación en el promotor del gen MLH1 y la presencia de la mutación V600E en BRAF como ha sido sugerido (75, 145).

Los criterios de Bethesda nos permitieron identificar pacientes con tumores MSI(+) con una sensibilidad y especificidad analítica del 59 y 81% respectivamente, pero nuestra limitación es no poder expresar las sensibilidades y especificidades de estos criterios para lo que realmente fueron creados, que es, ayudar a la identificación de pacientes con SLy.

Cuando estos criterios fueron creados en el año 2004, la variable “edad” en los casos de tumores con histología alterada fue discutida y no hubo consenso entre los participantes acerca de si esto era un limitante válido (43). En nuestra serie de casos, si se hubieran aceptados los pacientes mayores de 60 años con tumores presentando histología mucinosa, los criterios hubieran tenido 100% de sensibilidad y una especificidad del 84% para detectar casos de tumores MSI(+), valores muy alentadores para un cribado. La idea de detectar pacientes con tumores MSI(+) posee implicancia relacionada a casos de SLy, pero también es de importancia el tratamiento personalizado (valoración para adyuvancia e inmunoterapia) que se le puede suministrar a los pacientes con tumores presentando esta característica.

Si hablamos estrictamente de selección de pacientes relacionados a SLy, podemos decir que todos los criterios poseen limitaciones, ya que, muchas familias identificadas con el SLy no cumplen con los criterios de Ámsterdam o Bethesda. Hampel H. et.al analizaron 1566 pacientes y encontraron que si los estudios se limitaban a tumores de pacientes que cumplían los criterios de Bethesda se podían perder hasta un 28% de los casos de SLy (146). También puede suceder en algunas familias que a pesar de cumplir con estos criterios, no presentan mutaciones germinales en algún gen del sistema MMR. Dichos criterios de selección, si bien son los más utilizados [son más sensibles que los de Amsterdam II (147)], se los ha descrito como demasiado complejos y con falencias en sensibilidad y especificidad (59). Lamentablemente, al presente, la forma más efectiva para la identificación de pacientes con SLy es a través de casos probando, que se presentan con CCR o cáncer de endometrio.

Identificar individuos con SLy es extremadamente importante debido a que ellos y/o sus familiares pueden beneficiarse de un consejo genético y un plan de seguimiento intensivo que reduzca la morbi-mortalidad en estos casos. Los programas de seguimiento en estas familias han logrado reducir un 62% la incidencia del CCR y disminuir un 65-70% la mortalidad (60). Sin embargo desde las conclusiones del grupo de expertos de Mallorca, se afirma que los problemas de identificación de pacientes en SLy todavía continúan, independientemente de las guías que se utilicen para la selección de pacientes a estudiar y que la patología estaría subdiagnosticada (59). El grupo además, entiende que para mejorar la identificación, la población general debería estar informada de la existencia de esta patología, promocionando con ello proveer una adecuada historia familiar de cáncer, en la visita al médico. En efecto, puede suceder que el médico no registre dicha historia familiar (148), o si lo realiza, la información obtenida es subóptima y no generará una valoración apropiada del médico, como ha sido reportado (149).

En el año 2009 un *workshop* llevado a cabo en Jerusalén recomendó el testeo de MSI o Inmunohistoquímica (IHQ) (en busca de presencia o ausencia de las proteínas del sistema MMR en el tejido afectado) de rutina en todos los CCR diagnosticados en pacientes <70 años (150). Esta decisión fue avalada por el grupo de expertos de Mallorca en el 2013, que además recomendó el uso de cualquiera de las técnicas (MSI o IHQ) en todos los casos de cáncer de endometrio presentes en pacientes <70 años (59). En el año 2014 el NCCN publicó sus guías actuales para este tipo de casos, las cuales recomiendan el testeo “universal” en CCR o realizar el cribado en pacientes menores de 70 años, y a ≥ 70 años sólo realizar los estudios a quienes cumplieran con los criterios de Bethesda (151). Estos procedimientos fueron demostrados a ser costo-efectivo en dos estudios llevados a cabo en EE.UU. (152, 153). Lo que se debería analizar es si este planteo resulta costo-efectivo en nuestro medio.

Por último, podemos agregar que si bien nuestro trabajo no contemplaba el secuenciamiento desde su inicio, igualmente, en el año 2013 realizamos una consulta a MacroGen (Korea) que presta el servicio de secuenciamiento del ADN. El costo de secuenciado exón por exón para los 4 genes de interés (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS1) era de 8.000 dólares por 5 muestras y 5.000 dólares si enviábamos 10 muestras. En diciembre del 2014 el costo para realizar un secuenciado de nueva generación (NGS, del inglés *next-generation sequencing*) utilizando un panel de genes relacionados a Cáncer era de 590 dólares por muestra utilizando el servicio de la empresa citada (Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel, el mismo incluye el secuenciamiento de los exones de 409 genes, entre ellos: MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2, BRAF, KRAS, TP53, etc.). En 2015, la empresa ofrecía un secuenciamiento de exoma completo por 800 dólares. Esto muestra la tendencia

hacia un secuenciamiento masivo del ADN a un menor costo. El problema se presenta al momento de analizar dicha información particularmente cuando se quiere determinar la significancia clínica de los resultados obtenidos que pueden identificar una o más mutaciones en genes con baja o moderada penetrancia y/o variantes genéticas de patogenicidad incierta (154). Estos problemas no son inherentes a cáncer solamente sino que se pueden presentar en el estudio de cualquier patología que precise del secuenciamiento masivo del ADN como herramienta para correlacionarla genéticamente. El trabajo de compilar y analizar la gran cantidad de datos obtenidos para reclasificar variantes genéticas y cuantificar la magnitud de los riesgos patológicos de las mismas, necesitan actualmente, un trabajo multidisciplinario que incluye profesionales Bioinformáticos, Médicos, Genetistas, Bioquímicos, Biólogos moleculares y Estadistas.

En trabajos recientes, se puede observar un aumento en el número de publicaciones con referato que incluyen las palabras claves “*next-generation sequencing*” y “*Lynch syndrome*” (En 2012, 2 publicaciones, en 2013, 3 publicaciones, en 2014, 9 publicaciones, en 2015, 26 publicaciones). Por dar un ejemplo de este tipo de estudios podemos citar un trabajo del 2015 que estudió mediante NGS a 22 genes involucrados en la vía del MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, MSH3, PMS1, MLH3, EXO1, RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, PCNA, LIG1, RPA1, RPA2, RPA3, POLD1, POLD2, POLD3 y POLD4, cubriendo un total de 1.161 Megabases de ADN) en 14 pacientes diagnosticados con SLy y 12 pacientes que presentaban cáncer de endometrio esporádico. Utilizando varios programas de computación para el análisis de datos, los autores lograron identificar 5 variantes en exones que incluían inserciones y deleciones, 42 variantes de simple nucleótidos y una variante intrónica de significancia. Tres de estas variantes fueron clase 5 (patogénica) o clase 4 (probable patogénica), 5 variantes fueron clase 3 (relevancia clínica incierta) y 40 fueron clasificadas como variantes de significancia clínica desconocida. Además con sus resultados identificaron dos pacientes que habían tenido cáncer de endometrio “esporádico” como pertenecientes a SLy debido al encuentro de mutaciones en MLH1 y MSH6 que ya habían sido involucradas con el síndrome. Ambos casos tuvieron una presentación de su cáncer a edades más avanzadas de lo que se espera (57 y 60 años), uno de ellos no poseía historia familiar de cáncer y en el otro caso sólo una hermana había presentado CCR y cáncer de endometrio (155).

En la actualidad, no se puede predecir cuánto tiempo transcurrirá hasta tener certeza en la interpretación de las nuevas variantes en el ADN de los posibles casos de SLy, pero no podemos obviar que la tecnología de secuenciación del ADN se vuelve cada día más rápida, masiva y a costos, que si bien aún no están al alcance de un laboratorio de biología molecular

diagnóstico de rutina, muestran tendencia hacia un precio que disminuye con el tiempo. Todo esto promueve que cada día se utilice más la NGS con grandes desafíos por venir para el equipo multidisciplinario que deberá trabajar en los resultados en forma eficiente y ética.

5. Análisis de sobrevida y tratamiento

La evaluación de la sobrevida global a 5 años, demuestra que el grupo de pacientes que poseían CCR con MSI(+) tuvo una mejor SG comparada con el grupo que poseía tumores con MSI(-) ($p=0,02$), pero no se lograron establecer diferencias significativas entre los grupos en el análisis de la SLE. El hallazgo de un mejor pronóstico es coincidente con lo publicado por otros autores que aducen esta característica a pacientes que poseen tumores MSI(+) (35,51,52). La creación de múltiples y nuevos péptidos específicos de tumor debido a la deficiencia en el MMR, promueve la generación de una zona de gran respuesta inmune con linfocitos que reaccionan contra lo “extraño”. Esto sugiere ser la causa principal de la mejor SG en los pacientes que poseen un tumor con MSI(+) y además podría sustentar la frecuencia baja de metástasis halladas en este grupo de personas (50, 156), como también sucedió en nuestra serie de casos. Se han identificado más de 30 genes de nuestro genoma que contienen repeticiones mayores a 7 bases (157) y éstos genes son más vulnerables a poseer mutaciones que aquellos que no contienen secuencias repetitivas (156). Dentro de los posibles genes afectados en el corrimiento de lectura debido a la alteración de los microsatélites que contienen en su región codificante, se encuentran los involucrados en la apoptosis (APAP-1, BAX, BCL-10, Caspase-5, FAS, RIZ), los genes del MMR (MLH3, MSH3 y MSH6), así como genes codificantes de los factores de crecimiento y sus receptores (ACTRII, GRB-14, IGFIIR, TGF β RII y WISP3) (157, 158). Las alteraciones en sus microsatélites pueden resultar en proteínas alteradas con codificación única para cada tumor (159). Estos neopéptidos generados en el tumor no se encuentran en otras partes del cuerpo y por lo tanto es improbable que se genere tolerancia inmunológica central contra los mismos, por lo que son un blanco potencial para el sistema inmune mediado por linfocitos T CD8+, resultando en muerte de aquellas células que los expresen y que además sean capaces de presentarlos al sistema inmune. Un estudio llevado a cabo por Schwitalle et al. (49) ha explorado la relevancia biológica de estos neopéptidos *in vivo* en pacientes con SLy (con CCR diagnosticado) y en personas portadoras de una mutación ligada a SLy pero sin cánceres diagnosticados hasta ese momento. Ellos aislaron linfocitos infiltrantes de tumor desde pacientes con SLy y CCR

MSI(+), los cuales reaccionaban *in vitro* contra las células de dicho tumor u otras células con MSI(+) pertenecientes a líneas celulares, pero no había respuesta hacia líneas celulares de CCR MSI(-), sugiriendo que estos linfocitos reaccionaban específicamente contra los neopéptidos generados por tumores MSI(+). Además, examinaron la reactividad de estos linfocitos hacia 24 neopéptidos artificiales derivados desde 14 genes que contienen secuencias microsátélites en sus regiones codificantes, teniendo en cuenta los siguientes criterios: alta frecuencia de inestabilidad del microsátélite involucrado en tumores MSI(+) (160), relevancia funcional de la correspondiente proteína nativa y datos de inmunogenicidad *in vitro* (159,161). Se lograron identificar linfocitos citotóxicos que reaccionaban significativamente contra estos neopéptidos con respuestas destacadas contra los neopéptidos generados a partir de secuencias de los genes TGF β R2, Caspasa 5 y AIM-2 (49). Estos experimentos indicarían que individuos con tumores MSI(+) poseen tumores inmunogénicos y que sus células inmunes son capaces de dirigir el ataque hacia el tumor. Por otro lado, detectaron reactividad hacia estos neopéptidos en linfocitos de SP de portadores sanos de mutaciones relacionadas a SLy sugiriendo que ocurre ya sea, una respuesta protectora en individuos que no desarrollaron cáncer (reforzando de esta forma la idea de una inmunovigilancia activa específica de neopéptidos en estas personas) o estos pacientes presentan un adenoma aún no detectado y la respuesta inmune hacia el mismo ya se activó.

Ahora bien, si los neopéptidos son inmunogénicos: ¿Por qué el sistema inmune no logra eliminar el tumor? Se pueden realizar varias suposiciones, pero entre las que se destacan, se podría decir que estos péptidos necesitan que exista una correcta presentación antigénica por parte de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) en la superficie de las células tumorales. Existen diversos mecanismos que pueden resultar en la pérdida de expresión de las moléculas MHC-I y los más comunes involucran la pérdida o mutación de β 2 microglobulina (162), defectos en las moléculas relacionadas al procesamiento antigénico (163) y/o alteraciones en las proteínas que permiten el correcto ensamblaje de péptidos (TAP1/TAP2, tapasina) (164). Luego de transcurrido un tiempo, si los niveles de MHC-I no son suficientes para realizar una correcta presentación antigénica debido a las posibles alteraciones ya enunciadas, las células NK jugarían un papel importante en tratar de frenar el avance tumoral. Todos estos estudios avalan en parte el desarrollo más lento del tumor en personas con CCR MSI(+), llevando a una mejor SG a dichos pacientes.

Por otro lado, la utilización del análisis de la MSI como un factor pronóstico y predictivo en el tratamiento adyuvante en CCR posee el siguiente precedente: cuando los genes del sistema MMR fueron identificados en bacterias, las mutaciones que lo inactivaban generaban un fenotipo mutador que favorecía la tolerancia a agentes que causan daño al ADN

(165). En líneas celulares de mamíferos se encontró un fenotipo celular similar (166, 167). La corrección hacia la normalidad de la actividad del sistema MMR en las líneas celulares restauró la respuesta citotóxica contra agentes alquilantes (102), 6-tio-guanina (168), 5-Fluorouracilo (FU) (169), compuestos de platino y otros agentes (170, 171). Todo ello indicaba que los tumores con MSI podían ser resistentes a algunos tratamientos quimioterapéuticos. Sin embargo, el primer estudio de sensibilidad en el tratamiento del CCR con MSI reportó lo contrario, esto quiere decir que tumores con presencia de MSI eran más sensibles a la quimioterapia adyuvante que los tumores sin MSI (172). En este estudio, la asignación de los pacientes a los grupos en tratamiento poseía un sesgo, ya que en vez de asignar a los pacientes en forma aleatoria, los oncólogos involucrados en dicha investigación, seleccionaron a los pacientes que recibirían el tratamiento basándose en aquellos que poseían menor cantidad de comorbilidades y el mejor estado funcional. Solamente 23 pacientes con MSI recibieron quimioterapia y la media de edad de estos fue 13 años menor que aquella obtenida para quienes no fueron tratados. Como conclusión se pudo observar que la sobrevida fue significativamente mejor en el grupo que poseía MSI, dejando así la impresión de que tales pacientes eran candidatos ideales para la quimioterapia implementada(31). Por el contrario, luego de este estudio se publicaron varios trabajos que avalan que el tratamiento con la quimioterapia adyuvante no mejora la sobrevida en pacientes con tumores que poseen MSI-H comparado con aquellos que no recibieron dicha medicación como terapia adyuvante (128, 173, 174). Además, distintas publicaciones indican que la utilización de 5-FU o Capecitabina/Leucovorina es inefectiva en CCR con MSI en estadio II (112, 131, 175) lo cual es consistente con los datos preclínicos que muestran que la deficiencia en el sistema MMR está asociada con resistencia al 5-FU en células de CCR (102, 176, 177).

Los valores pronósticos/predictivos de la deficiencia en MMR fueron investigados en 457 pacientes con CCR en estadios II y III desde 5 estudios aleatorizados que evaluaron la administración de 5-FU más LV o Levamisol como terapia adyuvante vs. sólo cirugía. Los autores hallaron que los pacientes que poseían deficiencia en MMR tenían una mejor sobrevida y no se beneficiaban de la terapia con 5-FU, independientemente del estadio, cuando se los comparaba con aquellos que no poseían deficiencia en MMR. Cuando anexaron los datos de los pacientes de diferentes trabajos anteriores, englobaron un total de 1027 pacientes y luego del análisis de esta nueva información, ellos observaron que se mantenían las conclusiones y además visualizaron que en el estadio II de CCR con deficiencia en MMR el tratamiento adyuvante estuvo asociado con una disminución de la sobrevida global (HR: 2,95; 95% IC, 1,02-8,54; P =0,04) (178).

A partir del estudio ACCENT (*Adjuvant Colon Cancer Endpoints*) (7.803 pacientes con CCR en estadio II y III), se vió que entre los pacientes con CCR en estadio II quienes recibieron solo cirugía y eran deficientes en el MMR estaban asociados a un mayor tiempo de recurrencia (HR: 0,27; 95% IC, 0,10-0,75; P = 0,01) y mejor sobrevida (HR: 0,27; 95% IC, 0,10-0,74; P = 0,01) comparado con aquellos que no poseían alterados el MMR. Pero esto no sucedía en el estadio III (HR: 0,59; 95% IC, 0,28-1,23; P = 0,162). En pacientes con CCR estadio II tratados con 5-FU, el tiempo de recurrencia y la sobrevida global, no diferían entre los casos que poseían deficiencia del MMR y los que no la poseían (Tiempo de recurrencia, HR: 0,81, 95% IC, 0,55-1,19; P = 0,29; SG, HR: 0,87; 95% IC, 0,61-1,26; P = 0,47). A diferencia del grupo anterior, en CCR estadio III deficientes en MMR, los pacientes tratados con 5-FU tuvieron una mejor sobrevida comparado con los que no poseían deficiencias en MMR (Tiempo de recurrencia, HR: 0,80, 95% IC, 0,66-0,97; P = 0,025; SG, HR: 0,79; 95% IC, 0,65-0,97; P = 0,023) (113).

En línea con lo expuesto anteriormente y extrapolando nuestros hallazgos, podemos decir que cuando analizamos el tratamiento adyuvante en los pacientes de nuestra serie de casos, vimos que había una tendencia hacia una mejor SG cuando no se suministraba dicho tratamiento en los pacientes con tumores MSI(+) vs. aquellos que presentaban tumores MSI(-) (p=0,08). En tanto que la SLE no tuvo diferencias entre ambos grupos. Nuevamente, estos resultados pueden sustentarse en que las personas que poseen tumores con MSI(+) muestran un mejor pronóstico general.

Al momento de analizar los resultados del tratamiento adyuvante por estadio, debemos tener en cuenta que el estadio I no tiene indicación de este tipo de tratamiento y que no tuvimos pacientes con tumores MSI(+) en estadio IV. En cuanto al estadio II, solo hubo pacientes no tratados con adyuvancia en el grupo con tumores MSI(+) y a pesar de que éstos tuvieron un 100% de SG, esta variable no logró ser estadísticamente significativa cuando se lo comparó con el grupo con tumores MSI(-) (SG de 70%) con el mismo estadio y sin tratamiento adyuvante (Figura 49). El análisis de SLE en estos 2 grupos no mostró diferencias significativas.

En nuestra serie de casos, la mayoría de los pacientes con tumores MSI(+) y estadio III, recibieron tratamiento adyuvante (5/6) y cuando se analizó SG y SLE, se pudo observar que no había diferencias significativas cuando se las comparó con pacientes que poseían tumores MSI(-) con el mismo tratamiento adyuvante e igual estadio (n=21).

Nuestra limitación a la hora de realizar el análisis de tratamiento por estadio fue poseer un número bajo para los grupos analizados, y al no ser un estudio aleatorizado, tampoco pudimos observar por ejemplo qué hubiera pasado con la SG y SLE en pacientes con tumores

MSI(+) en estadio II que recibieron tratamiento adyuvante o aquellos pacientes con tumores MSI(+) en estadio III que no recibieron tratamiento adyuvante.

A pesar de que el número de pacientes con CCR MSI(+) fue bajo para sacar conclusiones con sustento estadístico sobre los diferentes tratamientos en los diferentes estadios, podríamos afirmar con nuestros resultados, sumados a la bibliografía reciente, que la determinación del estado MSI(+) en pacientes con CCR puede proveer una valorable información pronóstica y predictiva, ayudando al equipo médico en las decisiones que se toman sobre la conducta a implementarse en el trato con los pacientes.

CONCLUSIONES

1. Observamos una excelente correlación entre los resultados encontrados para los tres microsatélites estudiados utilizando la EC y la PCR-HRM, avalando la aplicación de esta última a los análisis de MSI con muestras clínicas.

2. La frecuencia del 10% de CCR MSI(+) en nuestra serie de casos, es concordante con lo publicado en la literatura, reforzando la idea de una disminución en el número de microsatélites a estudiar, haciendo énfasis en una minuciosa elección de los mismos al momento del análisis.

3. La incorporación de CAT25 al panel (BAT25 y BAT26) produjo resultados concordantes a los obtenidos en poblaciones con otras etnias, e inéditos para Argentina, mostrando la mejor efectividad de los tres marcadores en nuestro estudio para identificar un tumor MSI(+), ya que sus VPP y VPN fueron del 100%.

4. El estudio de monomorfosidad de los tres microsatélites, demostró una cuasimonomorfosidad alélica de los mismos en nuestra población. Este resultado permite simplificar el estudio de MSI con estos marcadores utilizando sólo muestra tumoral, independizándose de ADN de células normales. Sin embargo, utilizando PCR-HRM no se puede optar por el análisis simplificado ya que siempre se debe comparar una muestra “normal” vs. la tumoral.

5. Nuestros resultados avalan el uso de este nuevo panel (CAT25, BAT25 y BAT26) para el estudio de MSI en CCR de nuestra población.

6. El estudio de IHQ mostró la ausencia de las enzimas MLH1 y PMS2, y la presencia de MSH2 y MSH6. La falta de una correcta expresión en el tumor de las enzimas citadas, ratifica la carencia de corrección en los errores de replicación del ADN demostrada por el acortamiento en el largo de los microsatélites en los CCR con MSI(+).

7. Las variables y características, que en nuestra serie de casos estuvieron correlacionadas a pacientes con tumores que poseían MSI(+) fueron: localización en colon derecho, histología tumoral mucinosa y género femenino, en tanto que la presentación de metástasis, solo llegó a mostrar una tendencia con significación estadística a pesar de que ningún caso con MSI(+) presentó diseminación tumoral a otros órganos.

8. El análisis de los síntomas al momento del diagnóstico en nuestra serie de casos, muestra sintomatología compatible con lo publicado, siendo la presencia de sangre en heces el más prevalente.

9. En el grupo de pacientes con tumores MSI(+) y que cumplían los criterios de Bethesda la variable edad fue significativa estadísticamente cuando se comparaba con aquellos que no cumplían los criterios. Aquellos que cumplen con los criterios (tres casos) sugieren ser casos hereditarios, pero esto se debe demostrar con el secuenciado del ADN. En tanto que los casos que no cumplen los criterios, sugerirían que se tratan de formas esporádicas de la enfermedad, lo cual también debe ser demostrado por estudios complementarios.

10. Si bien, al presente los criterios de Bethesda se siguen utilizando y según la literatura son los más efectivos, los mismos son muy cuestionados y nuestros resultados se adhieren a esta postura. Por ello, se debería tener en cuenta la sugerencia del grupo de expertos de Mallorca a la hora de realizar los estudios de cribado en CCR y cáncer de endometrio.

11. La presentación de una mejor sobrevida global en el grupo de pacientes con CCR MSI(+) con respecto a aquellos con su tumor MSI(-), sigue ratificando un mejor pronóstico para estos casos. Los estudios futuros sobre neopéptidos y su alta tasa de respuesta inmunológica podrían terminar de confirmar la causa de esta ventaja en pacientes con CCR MSI(+), incluyendo además la explicación del bajo o nulo número de metástasis en ellos. En tanto que la SLE no tuvo diferencias significativas entre los grupos MSI(+) y (-).

12. El pronóstico favorable de pacientes con CCR MSI(+) en estadio II y la falta de beneficio en la implementación de la terapia adyuvante con 5-FU, indica que estos pacientes no deberían recibir terapia adyuvante. Mientras que los pacientes con CCR MSI(+) en estadio III medicados con 5-FU, no muestran diferencias significativas en la SG y SLE con el grupo MSI(-), lo que tal vez también indique que estos pacientes (tumor MSI(+) estadio III) tampoco se beneficien con dicha terapia, pero no podemos afirmarlo ya que no tuvimos casos de este tipo sin tratamiento adyuvante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bosman F, Yan P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol.* 2014;65(4):257–66.
2. Gualdrini U, Iummato L. Cancer colorrectal en Argentina. *Supl Inst Nac del Cancer, Minist salud, Argentina.* 2011;
3. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(11):916–32.
4. Navarro A, Muñoz SE, Lantieri MJ, Del Pilar Diaz M, Cristaldo PE, De Fabro SP, et al. Meat cooking habits and risk of colorectal cancer in Córdoba, Argentina. *Nutrition.* 2004;20(10):873–7.
5. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(10):769–80.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759–67.
7. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87(2):159–70.
8. Olsson L, Lindblom A. Family history of colorectal cancer in a Sweden county. *Fam Cancer.* 2003;2(2):87–93.
9. Salovaara BR, Loukola A, Kristo P, Ka H, Mecklin J, Aaltonen LA, et al. Population-Based Molecular Detection of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer By. *J Clin Oncol.* 2000;18(11):2193–200.
10. St John DJ, McDermott FT, Hopper JL-, Debney EA, Johnson WR, Hughes ES. Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 1993;118(10):785–90.
11. Risch N. The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:733–41.
12. Dong C, Hemminki K. Modification of cancer risks in offspring by sibling and parental cancers from 2,112,616 nuclear families. *Int J cancer.* 2001;92(1):144–50.
13. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. A systematic population based assessment of cancer risk in first degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(21):1600–8.
14. Lichtenstein P, Holm N, Verkasalo P, Iliadou A, Kaprio J, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. *N Engl J Med.* 2000;343(2):78–85.
15. Shaheen NJ, Silverman LM, Keku T, Lawrence LB, Rohlfes EM, Martin CF, et al. Association between hemochromatosis (HFE) gene mutation carrier status and the risk of colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(2):154–9.
16. Laken S, Petersen G, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, et al. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet.* 1997;15:57–61.
17. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. 2015;386.
18. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? *Rev Española Enfermedades Dig.* 2011;103(1):29–35.
19. Grady WM, Markowitz SD. The Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer and Its Potential Application to Colorectal Cancer Screening. *Dig Dis Sci.* 2015;60(3):762–72.
20. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16365–85.
21. Grilley M, Holmes J, Yashar B, Modrich P. Mechanisms of DNA-mismatch correction. *Mutat Res.* 1990;236(March):253–67.

22. Marra G, Schär P. Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J.* 1999;338:1–13.
23. Bellizzi A, Frankel WL. Colorectal Cancer Due to Deficiency in DNA Mismatch Repair Function A Review. *Adv Anat Pathol.* 2009;16(6):405–17.
24. Culligan KM, Meyer-Gauen G, Lyons-Weiler J, Hays JB. Evolutionary origin, diversification and specialization of eukaryotic MutS homolog mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(2):463–71.
25. Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, et al. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(24):13629–34.
26. Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, Lettieri T, Hughes M, D'Arrigo A, et al. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science (80-).* 1995;268(5219):1912–4.
27. Strand M, Earley MC, Crouse GF, Petes TD. Mutations in the MSH3 gene preferentially lead to deletions within tracts of simple repetitive DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(22):10418–21.
28. Kunkel TA, Erie DA. Dna Mismatch Repair. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:681–710.
29. Jascur T, Boland CR. Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer.* 2006;119(9):2030–5.
30. Thomas DC, Umar A, Kunkel T a. Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer cells. *Fundam Mol Mech Mutagen.* 1996;350(1):201–5.
31. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073–87.
32. Hamilton W, Sharp D. Diagnosis of colorectal cancer in primary care: The evidence base for guidelines. *Fam Pract.* 2004;21(1):99–106.
33. Eguino Villegas A, Fernandez Crespo AI, Fernandez Sanchez B, Garcia Alvarez G, Pascual Fernandez C. Cáncer colorrectal: una guía práctica [Internet]. 2002. Available from:https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerAno/Documents/guia_cancer_colorrectal.pdf
34. Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):10065–9.
35. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (80-).* 1993;260(May):816–9.
36. Ionov Y, Peinado M a, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993;363(6429):558–61.
37. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science (80-).* 1993;260(5109):812–6.
38. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.* 1993;53(24):5853–5.
39. Umar A, Boyer JC, Thomas DC, Nguyen DC, Risinger JI, Boyd J, et al. Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14367–70.
40. Muta H, Noguchi M, Perucho M, Ushio K, Sugihara K, Ochiai A, et al. Clinical implications of microsatellite instability in colorectal cancers. *Cancer.* 1996;77(2):265–70.
41. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(16):6463–71.
42. 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;(5):5248–57.
43. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, Chapelle a. DL, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Feb 17;96(4):261–8.
 44. Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev.* 2016;51:19–26.
 45. Sepulveda A, Hamilton S, Allegra C, Grody W, Cushman-Vokoun A, Funkhouser W, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from The American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2017;35(13):1453–96.
 46. Kloor M, Staffa L, Ahadova A, Von Knebel Doeberitz M. Clinical significance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Langenbeck's Arch Surg.* 2014;399(1):23–31.
 47. Lynch PM, Lynch HT, Harris RE. Hereditary proximal colonic cancer. *Dis Colon Rectum.* 1977;20(8):661–8.
 48. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology.* 1993;104(5):1535–49.
 49. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, et al. Immune Response Against Frameshift-Induced Neopeptides in HNPCC Patients and Healthy HNPCC Mutation Carriers. *Gastroenterology.* 2008;134(4):988–97.
 50. Buckowitz A, Knaebel H-P, Benner A, Bläker H, Gebert J, Kienle P, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer.* 2005;92(9):1746–53.
 51. Popat S, Hubner RA, Houlston RS. Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. *J Clin Oncol.* 2005;23(3):609–18.
 52. Kumar S, Chang EY, Frankhouse J, Dorsey P, Lee R, Johnson N. Combination of Microsatellite Instability and Lymphocytic Infiltrate as a Prognostic Indicator in Colon Cancer. *Arch Surg.* 2009;144(6):511.
 53. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 1993;75(5):1027–38.
 54. Bronner E, Baker S, Morrison PT, Warren G, Smith L, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature.* 1994;368:258–61.
 55. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(10):919–32.
 56. Jasperson K, Tuohy T, Neklason D, Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. 2010;138(3):2044–58.
 57. Yan H, Papadopoulos N, Marra G, Perrera C, Jiricny J, Boland CR, et al. Conversion of diploidy to haploidy. *Nature.* 2000;403(6771):723–4.
 58. Jenkins M a., Dowty JG, Ait Ouakrim D, Mathews JD, Hopper JL, Drouet Y, et al. Short-Term Risk of Colorectal Cancer in Individuals With Lynch Syndrome: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol.* 2014;33:326–31.
 59. Vasen HFA, Blanco I, Aktan-collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut.* 2013;812–23.

60. De Vos Tot Nederveen Cappel WH, Järvinen HJ, Lynch PM, Engel C, Mecklin JP, Vasen HFA. Colorectal surveillance in Lynch syndrome families. *Fam Cancer*. 2013;12(2):261–5.
61. Watson P, Vasen HFA, Mecklin J, Bernstein I, Järvinen HJ, Myrhøj T, et al. The Risk of Extra-colonic, Extra-endometrial Cancer in the Lynch Syndrome. *Int J cancer*. 2008;123(2):444–9.
62. Koornstra JJ, Mourits MJ, Sijmons RH, Leliveld AM, Hollema H, Kleibeuker JH. Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome. *Lancet Oncol*. Elsevier Ltd; 2009;10(4):400–8.
63. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on HNPCC. *Anticancer Res*. 1994;4:1661–4.
64. Vasen HF, Watson P, Mecklin J-P, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999;116:1453–6.
65. Ebinger M, Sotlar K, Weber A, Bock CT, Bültmann BD, Kandolf R. Simplified detection of microsatellite instability in colorectal cancer without the need for corresponding germline DNA analysis. *J Clin Pathol*. 2006 Oct;59(10):1114–5.
66. Findeisen P, Kloor M, Merx S, Sutter C, Woerner SM, Dostmann N, et al. T 25 Repeat in the 3' Untranslated Region of the CASP2 Gene : A Sensitive and Specific Marker for Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 2005;65(18):8072–8.
67. Bianchi F, Galizia E, Catalani R, Belvederesi L, Ferretti C, Corradini F, et al. CAT25 Is a Mononucleotide Marker to Identify HNPCC Patients. *Prism*. 2009;11(3):248–52.
68. Lu J, Sheng J. Advances in the study of Lynch syndrome in China. *World J Gastroenterol*. 2015;21(22):6861–71.
69. Deschoolmeester V, Baay M, Wuyts W, Marck E Van, Damme N Van, Vermeulen P, et al. Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer Using an Alternative Multiplex Assay of Quasi-Monomorphic Mononucleotide Markers. *Cancer Res*. 2008;10(2):154–9.
70. Benmoussa A, Badre W, Pedroni M, Zamiaty S, Badre L. Clinical and molecular characterization of colorectal cancer in young Moroccan patients. *Turkish J Gastroenterol*. 2012;23(6):686–90.
71. Tikidzhieva A, Benner A, Michel S, Formentini A, Link K-H, Dippold W, et al. Microsatellite instability and Beta2-Microglobulin mutations as prognostic markers in colon cancer: results of the FOGT-4 trial. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; 2012 Mar 13;106(6):1239–45.
72. Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn*. American Society for Investigative Pathology and Association for Molecular Pathology; 2008 Jul;10(4):301–7.
73. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(12):6870–5.
74. Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, et al. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2107–16.
75. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen B a, et al. BRAF Mutation Is Frequently Present in Sporadic Colorectal Cancer with Methylated hMLH1 , But Not in Hereditary Nonpolyposis Colorectal. *Clin Cancer Res*. 2004;10(415):191–5.
76. Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Spring KJ, Wynter CVA, Walsh MD, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of

- the colorectum. *Gut*. 2004;53(8):1137–44.
77. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet*. 2004;41(9):664–8.
 78. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Vol. 51 Pt 1, *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbour; 1986. 263–273 p.
 79. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. 1989;44:388–96.
 80. Bassam B, Caetano-Anollés G. Protocols in Biotechnology Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Appl Biochem Biotechnol*. 1993;42(5):181–8.
 81. Laskey RA. Radioisotope detection using X-ray film. Oxford University Press; 1990. p. 87–107.
 82. Christensen M, Sunde L, Bolund L, Orntoft TF. Comparison of three methods of microsatellite detection. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59(3):167–77.
 83. Toh Y, Oki E, Oda S, Tomoda M, Tomisaki S, Ichiyoshi Y, et al. An integrated microsatellite length analysis using an automated fluorescent DNA sequencer. *Cancer Res*. 1996;56(12):2688–91.
 84. Shimizu M, Kosaka N, Shimada T, Nagahata T, Iwasaki H, Nagai H, et al. Universal fluorescent labeling (UFL) method for automated microsatellite analysis. *DNA Res*. 2002;9(5):173–8.
 85. Berg KD, Glaser CL, Thompson RE, Hamilton SR, Griffin CA, Eshleman JR. Detection of Microsatellite Instability by Fluorescence Multiplex Polymerase Chain Reaction. 2000;2(1):20–8.
 86. Murphy KM, Zhang S, Geiger T, Hafez MJ, Bacher J, Berg KD, et al. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *J Mol diagnostics*. 2006;8(3):305–11.
 87. Campanella NC, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Viana D, Palmero EI, Pereira R, et al. Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers. *Eur J Hum Genet*. 2014;22:875–80.
 88. Lay MJ, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem*. 1997;43(12):2262–7.
 89. Lyon E, Millson A, Lowery MC, Woods R, Wittwer CT. Quantification of HER2/neu gene amplification by competitive PCR using fluorescent melting curve analysis. *Clin Chem*. 2001;47(5):844–51.
 90. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem*. 1997;245(2):154–60.
 91. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem*. 2003;49(3):396–406.
 92. Wittwer CT, Reed G, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003;49(6):853–60.
 93. White H, Potts G. Mutation scanning by high resolution melt analysis . Evaluation of Rotor - Gene™ 6000 (Corbett Life Science), HR - 1™ and 384 well LightScanner™ (Idaho Technology). *Natl Genet Ref Lab (Wessex)*. 2006;(June).
 94. Wittwer CT. Making DNA melting useful. *Clin Chem*. 2010;56(9):1500–1.
 95. Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding K V. Amplicon

- DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: Cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem.* 2006;52(3):494–503.
96. Vossen RHAM, Aten E, Roos A, Den Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA) - More than just sequence variant screening. *Hum Mutat.* 2009;30:860–6.
 97. Snell C, Krypuy M, Wong EM, Loughrey MB, Dobrovic A. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Res.* 2008;10(1):R12.
 98. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn. American Society for Investigative Pathology and Association for Molecular Pathology;* 2008;10(4):293–300.
 99. Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, Fischer HP, Merkelbach-Bruse S, Ohlendorf M, et al. Tumours from MSH2 mutation carriers show loss of MSH2 expression but many tumours from MLH1 mutation carriers exhibit weak positive MLH1 staining. *J Pathol.* 2005;207(4):385–95.
 100. Salahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A. Microsatellite Instability and hMLH1 and hMSH2 Colorectal Cancer. 2001;81(4):535–41.
 101. Jong AE De, Puijenbroek M Van, Hendriks Y. Additional PMS2 Staining in Suspected Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Microsatellite Instability , Immunohistochemistry , and Additional PMS2 Staining in Suspected Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Am Assoc Cancer Res.* 2004;10:972–80.
 102. Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carethers JM, Kunkel T a, et al. Human Chromosome 3 Corrects Mismatch Repair Deficiency and Microsatellite Instability and Reduces N -Methyl- N ' -nitro- N -nitrosoguanidine Tolerance in Colon Tumor Cells with Homozygous hMLH1 Mutation. *Cancer Res.* 1994;54(16):4308–12.
 103. Pritchard CC, Smith C, Salipante SJ, Lee MK, Thornton AM, Nord AS, et al. ColoSeq provides comprehensive lynch and polyposis syndrome mutational analysis using massively parallel sequencing. *J Mol Diagnostics. Elsevier Inc.;* 2012;14(4):357–66.
 104. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(16):3408–19.
 105. Benson AB, Bekaii-saab T, Chan E, Chen Y, Choti M a, Cooper HS, et al. Metastatic Colon Cancer , Version 3 . 2013 Featured Updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Netw.* 2013;11(5):519–28.
 106. Schmoll HJ, Van cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol.* 2012;23(10):2479–516.
 107. Stoffel EM, Mangu P, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau Yee Wan M, et al. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes : American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the Familial Risk – Colorectal Cancer : European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol.* 2015;33(2):209–17.
 108. Roxburgh C, Wallace A, Guthrie G, Horgan PG, McMillan DC. Comparison of the prognostic value of tumour and patient related factors in patients undergoing potentially curative resection of gastric cancer. *Am J Surg.* 2012;204(3):294–9.
 109. Eynard HG, Soria EA, Cuestas E, Rovasio RA, Eynard AR. Assessment of Colorectal Cancer Prognosis Through Nuclear Morphometry. *J Surg Res. Elsevier Inc.;* 2009;154(2):345–8.
 110. Gryfe R, Kim H, Hsieh E, Aronson M, Holowaty E, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinincal outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J*

- Med. 2000;342(2):69–77.
111. Nash GM, Gimbel M, Cohen AM, Zeng Z-S, Ndubuisi MI, Nathanson DR, et al. KRAS mutation and microsatellite instability: two genetic markers of early tumor development that influence the prognosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(2):416–24.
 112. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur J Cancer*. 2009;45(3):365–73.
 113. Sargent DJ, Shi Q, Yothers G, Tejpar S, Bertagnolli M, Thibodeau SN, et al. Prognostic impact of deficient mismatch repair (dMMR) in 7,803 stage II/III colon cancer (CC) patients (pts): A pooled individual pt data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database. In 2014. p. *J Clin Oncol* 32:5s, (suppl; abstr 3507).
 114. Catelli M, Álvarez-Iglesias V, Gómez-Carballa A, Mosquera-Miguel A, Romanini C, Borosky A, et al. The impact of modern migrations on present-day multi-ethnic Argentina as recorded on the mitochondrial DNA genome. *BMC Genet. BioMed Central Ltd*; 2011;12(1):77.
 115. Janavicius R, Matiukaite D, Jakubauskas A, Griskevicius L. Microsatellite instability detection by high-resolution melting analysis. *Clin Chem*. 2010 Nov;56(11):1750–7.
 116. Owczarzy R, Tataurov A V., Wu Y, Manthey J a., McQuisten K a., Almaguer HG, et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(April):163–9.
 117. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 2002;123(6):1804–11.
 118. Norambuena PA, Copeland JA, Křenková P, Štambergová A, Macek M. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. *Clin Biochem*. 2009;42:1308–16.
 119. Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer*. 2008;14:1–14.
 120. Erali M, Wittwer CT, Wittmer CT. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*. 2010;50(4):250–61.
 121. Balic M, Pichler M, Strutz J, Heitzer E, Ausch C, Samonigg H, et al. High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis. *J Mol Diagn*. 2009;11(2):102–8.
 122. Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10(2):219–40.
 123. Mader E, Lukas B, Novak J. A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). *BMC Genet*. 2008 Jan;9:69.
 124. Mackay JF, Wright CD, Bonfiglioli RG. A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods*. 2008;4:8.
 125. Pedroni M, Roncari B, Maffei S, Losi L, Scarselli A, Gregorio C Di, et al. A mononucleotide markers panel to identify hMLH1 / hMSH2 germline mutations. *Cancer*. 2007;23:179–87.
 126. Xicola RM, Llor X, Pons E, Castells A, Alenda C, Piñol V, et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Feb;99(3):244–52.
 127. Hatch SB, Lightfoot HM, Garwacki CP, Moore DT, Calvo BF, Woosley JT, et al. Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. *Clin cancer Res*. 2005 Mar;11(6):2180–7.

128. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(3):247–57.
129. Morandi L, de Biase D, Visani M, Monzoni A, Tosi A, Brulatti M, et al. T([20]) repeat in the 3'-untranslated region of the MT1X gene: a marker with high sensitivity and specificity to detect microsatellite instability in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2012 May;27(5):647–56.
130. Dorak T. Real-time PCR. Real-time PCR. New York: Taylor & Francis Group; 2006. 155-169 p.
131. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(3):153–62.
132. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004;23(1–2):11–27.
133. Funkhouser WK, Lubin IM, Monzon F a, Zehnbaue r B a, Evans JP, Ogino S, et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn*. 2012;14(2):91–103.
134. Babaei H, Zeinalian M, Emami MH, Hashemzadeh M, Farahani N, Salehi R. Simplified microsatellite instability detection protocol provides equivalent sensitivity to robust detection strategies in Lynch syndrome patients. *Cancer Biol Med*. 2017;14(2):142–50.
135. Iachetta F, Domati F, Reggiani-bonetti L, Barresi V, Magnani G, Marcheselli L, et al. Prognostic relevance of microsatellite instability in pT3N0M0 colon cancer: a population-based study. *Intern Emerg Med*. Springer Milan; 2015;(july):0–5.
136. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One*. 2010;5(2).
137. Zhou H-H, Yan S-Y, Zhou X, Du X, Zhang T, Cai X, et al. MLH1 promoter germline-methylation in selected probands of Chinese hereditary non-polyposis colorectal cancer families. *World J Gastroenterol*. 2008;14(48):7329–34.
138. Valeri N, Gasparini P, Fabbri M, Braconi C, Veronese A, Lovat F. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *PNAS*. 2010;1–6.
139. Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovco va J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, et al. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(4):291–9.
140. Ferlay J, Bray F, Steliarova-Foucher E, Forman D. Cancer Incidence in Five Continents [Internet]. IARC CancerBase No. 9. Lyon. International Agency for Research on Cancer. 2014. Available from: <http://ci5.iarc.fr>
141. Murphy CC, Sandler RS, Sanoff HK, Yang YC, Lund JL, Baron JA. Decrease in incidence of colorectal cancer among individuals 50 years or older following recommendations for population-based screening. *Clin Gastroenterol Hepatol*. Elsevier Ltd; 2016;
142. Astin M, Griffin T, Neal RD, Rose P, Hamilton W. The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. *Br J Gen Pract*. 2011;(May):231–43.
143. Jellema P, van der Windt D a WM, Bruinvels DJ, Mallen CD, van Weyenberg SJB, Mulder CJ, et al. Value of symptoms and additional diagnostic tests for colorectal cancer in primary care: systematic review and meta-analysis. *Br Med J*. 2010;340:c1269.
144. Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Miselevich I, Resnick MB, et al. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(5):563–70.

145. Jang E, Chung DC. Hereditary Colon Cancer : Lynch Syndrome. *Rev Lit Arts Am.* 2010;4(2):151–60.
146. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(35):5783–8.
147. Vindigni SM, Kaz AM. Universal Screening of Colorectal Cancers for Lynch Syndrome: Challenges and Opportunities. *Dig Dis Sci.* Springer US; 2015;61(4):1–8.
148. Tranø G, Wasmuth HH, Sjursen W, Hofslie E, Vatten LJ. Awareness of heredity in colorectal cancer patients is insufficient among clinicians: A Norwegian population-based study. *Color Dis.* 2009;11(5):456–61.
149. Alberto VO, Harocopos CJ, Patel AA, Clark SK. Family and personal history in colorectal cancer patients: What are we missing? *Color Dis.* 2006;8(7):612–4.
150. Boland CR, Shike M. Report From the Jerusalem Workshop on Lynch Syndrome-Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(7):1–7.
151. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch Repair Deficiency Testing in Clinical Practice. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(5):591–604.
152. Mvundura M, Grosse SD, Hampel H, Palomaki GE. The cost-effectiveness of genetic testing strategies for Lynch syndrome among newly diagnosed patients with colorectal cancer. *Genet Med.* 2010;12(2):93–104.
153. Ladabaum U, Wang G, Terdiman J, Blanco A, Kuppermann M, Richard Boland C, et al. Strategies to identify the Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 2011;155(2):69–79.
154. Stoffel EM, Kastrinos F. Familial colorectal cancer, beyond lynch syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* Elsevier, Inc; 2014 Jul;12(7):1059–68.
155. Talseth-palmer BA, Bauer DC, Sjursen W, Evans TJ, McPhillips M, Proietto A, et al. Targeted next-generation sequencing of 22 mismatch repair genes identifies Lynch syndrome families. *Cancer Med.* 2016;5(5):929–41.
156. Drescher KM, Sharma P, Lynch HT. Current hypotheses on how microsatellite instability leads to enhanced survival of lynch syndrome patients. *Clin Dev Immunol.* 2010;2010:1–13.
157. Duval A, Hamelin R. Mutations at Coding Repeat Sequences in Mismatch Repair-deficient Human Cancers : Toward a New Concept of Target Genes for Instability. *Cancer Res.* 2002;62(9):2447–54.
158. Mori Y, Yin J, Rashid A, Leggett BA, Young J, Simms L, et al. Instability typing : Comprehensive Identification of Frameshift Mutations Caused by Coding Region Microsatellite Instability. *Cancer Res.* 2001;61:6046–9.
159. Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P, et al. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: A source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer.* 2001;93(1):6–11.
160. Woerner SM, Benner A, Sutter C, Schiller M, Yuan YP, Keller G, et al. Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene.* 2003;22(15):2226–35.
161. Ripberger E, Linnebacher M, Schwitalle Y, Gebert J, Von Knebel Doeberitz M. Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. *J Clin Immunol.* 2003;23(5):415–23.
162. Kloor M, Michel S, Buckowitz B, Rüschoff J, Büttner R, Holinski-Feder E, et al. Beta2-microglobulin mutations in microsatellite unstable colorectal tumors. *Int J Cancer.* 2007;121(2):454–8.
163. Ferris RL, Whiteside TL, Ferrone S. Immune escape associated with functional defects in antigen-processing machinery in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):3890–5.

164. Seliger B, Atkins D, Bock M, Ritz U, Ferrone S, Huber C, et al. Characterization of Human Lymphocyte Antigen Class I Antigen-processing Machinery Defects in Renal Cell Carcinoma Lesions with Special Emphasis on Transporter-associated with Antigen-processing Characterization of Human Lymphocyte Antigen Class I Antigen-. *Clin Cancer Res.* 2003;9(May):1721–7.
165. Fishel R. The Selection for Mismatch Repair Defects in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer : Revising the Mutator Hypothesis. *Cancer Res.* 2001;7369–74.
166. Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *PNAS.* 1994;91(July):6319–23.
167. Aquilina G, Hess P, Branch P, MacGeoch C, Casciano I, Karran P, et al. A mismatch recognition defect in colon carcinoma confers DNA microsatellite instability and a mutator phenotype. *PNAS.* 1994;91(19):8905–9.
168. Hawn MT, Umar A, Carethers JM, Marra G, Kunkel T a, Boland CR. Evidence for a Connection between the Mismatch Repair System and the G 2 Cell Cycle Checkpoint. *Cancer Res.* 1995;3721–5.
169. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, Nebel S, Bresalier R, Howell S, et al. Mismatch Repair Proficiency and In Vitro Response to 5- Fluorouracil. *Gastroenterology.* 1999;141(4):520–9.
170. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenm B, Nehmã A, et al. The Role of DNA Mismatch Repair in Platinum Drug Resistance. *Cancer Res.* 1996;(619):4881–6.
171. Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim K, Zheng H, Fink j lynn, et al. Resistance to Cytotoxic Drugs in DNA Mismatch maintained. *Clin Cancer Res.* 1997;3(October):1763–7.
172. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet.* 2000;355(9217):1745–50.
173. de Vos tot Nederveen Cappel WH, Meulenbeld HJ, Kleibeuker JH, Nagengast FM, Menko FH, Griffioen G, et al. Survival after adjuvant 5-FU treatment for stage III colon cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2004;109:468–71.
174. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and leukemia group B protocol 89803. *J Clin Oncol.* 2009;27(11):1814–21.
175. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret G-Y, Morere J-F, Uzzan B. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2009;45:1890–6.
176. Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2003;106(1):66–73.
177. Fischer F, Baerenfaller K, Jiricny J. 5-Fluorouracil Is Efficiently Removed From DNA by the Base Excision and Mismatch Repair Systems. *Gastroenterology.* 2007;133(6):1858–68.
178. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:3219–26.
179. Sehgal R, Sheahan K, O’Connell PR, Hanly AM, Martin ST, Winter DC. Lynch syndrome: an updated review. *Genes (Basel).* 2014;5:497–507.
180. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med.* 1913;12:546–55.
181. Mendel G. Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden*

- Vereines Brünn. 1866;IV:3–47.
182. Warthin AS. The Further Study of a Cancer Family. *J Cancer Res.* 1925;9:279–86.
 183. Hauser I, Weller C. A further report on the cancer family of warthin. *Am J Cancer.* 1936;27(3):434–49.
 184. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary Factors in Cancer Study of Two Large Midwestern Kindreds. *Arch Intern Med.* 1966;117(2):206–12.
 185. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family “G” revisited: 1895-1970. *Cancer.* 1971;27(6):1505–11.
 186. Boland CR, Troncale F j. Familial Colonic Cancer Without Antecedent Polyposis. *Ann Intern Med.* 1984;100(5):700–2.
 187. Tempero M, Jacobs M, Lynch HT, Graham C, Blotcky A. Serum and Hair Selenium Levels In Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Biol Trace Elem Res.* 1984;55:51–5.
 188. Gómez-centeno P, Rodriguez Lopez J, García-Costa A, Álvarez Lopez J, Cabo Gómez F, Veiga Codesido C, et al. Síndrome de Muir-Torre. *Actas Dermosifiliogr.* 2003;94(1):42–4.
 189. Dipro S, Al-Otaibi F, Alzahrani A, Ulhaq A, Al Shail E. Turcot syndrome: a synchronous clinical presentation of glioblastoma multiforme and adenocarcinoma of the colon. *Case Rep Oncol Med.* 2012;2012:1–6.
 190. Boland CR. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. *Fam Cancer.* 2005;4(3):211–8.
 191. Lynch HT, Lynch PM, Pester J, Fusaro R. The Cancer Family Syndrome Rare Cutaneous Phenotypic Linkage of Torre’s Syndrome. *Arch Intern Med.* 1981;141:607–11.
 192. Jass JR. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol.* 2006;12(31):4943–50.
 193. Welling DR. A Historical Argument for Changing the Name of a Major Syndrome. *Dis Colon Rectum.* 2015;58(10):1014–6.
 194. Douglas JA, Gruber SB, Meister KA, Bonner J, Watson P, Krush AJ, et al. History and molecular genetics of Lynch syndrome in family G: a century later. *JAMA.* 2005;294(17):2195–202.
 195. Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding K V. Expanded Instrument Comparison of Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping. *Clin Chem.* 2007;53(8):1541–4.
 196. Li M, Zhou L, Palais RA, Wittwer CT. Genotyping accuracy of high-resolution DNA melting instruments. *Clin Chem.* 2014;60(6):864–72.
 197. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol.* 1932;23(8):605–11.
 198. Astler VB, Collier FA. The Prognostic Significance of Direct Extension of Carcinoma of the Colon and Rectum. *Ann Surg.* 1954;139(6):846–51.
 199. Gospodarowicz MK, Miller D, Groome PA, Greene FL, Logan PA, Sobin LH. The Process for Continuous Improvement of the TNM Classification. *Cancer.* 2004;100(1):1–5.
 200. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York: Springer; 2010.

ANEXOS

ANEXO 1. Historia del Síndrome de Lynch y familia G

El SLy es una enfermedad hereditaria que involucra entre otros tumores al CCR. Los primeros hallazgos clínicos de este síndrome se deben a las observaciones hechas en 1913 por el médico patólogo Aldred Warthin (Figura 53), perteneciente en ese momento a la Universidad de Michigan (EE.UU.). Él había notado la depresión que sufría su modista alemana por la posibilidad de fallecer debido a un cáncer gástrico, colónico o uterino, como le había ocurrido a varios de sus familiares. De hecho aquella mujer murió a una edad muy temprana debido a un cáncer de endometrio (179). El Dr. Warthin estudió esta familia por 18 años y le asignó el nombre de “G” (180). En este reporte, constató que el abuelo de la familia (con cáncer en sitio desconocido) poseía ancestros con historial de cánceres, mientras que su esposa no contaba con antecedentes de cáncer en su familia. A continuación se describe



Figura 53. Fotografía del Doctor Aldred Scott Warthin.

Extraído de Douglas J y col. 2005.

con detalle dicha familia (Figura 54). Desde esta pareja de abuelos nacieron 10 hijos, 5 varones y 5 mujeres. Dos de las hijas fallecieron de cáncer de útero a los 40 y 55 años, mientras que 2 de los hijos murieron de cáncer de estómago a los 42 años y un tercero falleció de un cáncer en el “abdomen” a los 45 años. Estos 5 individuos se habían casado con parejas sin historia familiar de cáncer, pero todos presentaron descendencia que fue afectada por cáncer en algún momento de sus vidas. Así, la hija mayor (hijo N°1) que había fallecido a los 55 años tuvo 10 hijos: una hija de 42 años operada de útero debido a un cáncer, otra operada a los 22 años por la misma causa pero se suma en ella afección en ovarios. Los 8 hijos remanentes no habían sufrido ningún tipo de cáncer en ese momento, pero se debe tener en cuenta que solo uno de ellos era mayor de 40 años al momento del relevamiento. La segunda hija (hijo N° 2) que había fallecido a los 40 años, había tenido 4 hijos: 2 varones y 2 mujeres, los primeros murieron de cáncer de estómago e intestino, en tanto que las mujeres lo hicieron debido a cáncer de útero.

La tercera hija (hijo N° 3), al momento del estudio poseía 75 años y gozaba de buena salud al igual que sus tres hijos de 47, 50 y 55 años.

Los hijos N° 4 al N°7, no habían tenido problemas de cáncer de ningún tipo hasta ese momento.

El hijo N° 8, un varón, falleció a los 42 años de un cáncer de estómago. Su esposa no tenía historia familiar de cáncer. Ellos tuvieron 8 niños, de ellos, 2 hijas murieron de cáncer

de útero a los 40 y 44 años, mientras que los 6 remanentes no habían tenido complicaciones, pero ninguno superaba en ese momento los 40 años.

El hijo N°9, también un varón, murió de cáncer de estómago alrededor de los 41 años. El había sido padre de 6 hijos, los cuales había tenido con una mujer libre de historial familiar de cáncer. Una de sus hijas falleció de cáncer de útero, 3 niños murieron de tuberculosis a edades comprendidas entre 18 y 25 años. Los dos hijos sobrevivientes de esta pareja eran una mujer de 32 años y un varón de 29 años que se presentaban sin novedad.

El hijo N°10 murió a los 45 años debido a un cáncer de abdomen, probablemente un cáncer primario de estómago. De su matrimonio con una mujer sin historia familiar de cáncer, habían nacido 7 hijos (4 mujeres y 3 varones), de estos uno murió a los 42 años de cáncer de estómago e hígado, otro de cáncer de intestino a los 47 años, mientras que un tercero había sido operado a los 42 años por un cáncer de útero. Los cuatro restantes, al momento de la publicación estaban viviendo normalmente a las edades de 30, 30, 35 y 45 años.

De los 48 descendientes del abuelo con cáncer, 17 murieron o fueron operados de cáncer. El Dr. Warthin resalta el llamativo número de cánceres de útero (10 casos) y de estómago (7 casos) en la familia G. Además de describir en detalle esta familia deja asentado que los tipos de cáncer en ella, eran compatibles con una transmisión hereditaria Mendeliana autosómica dominante (181).

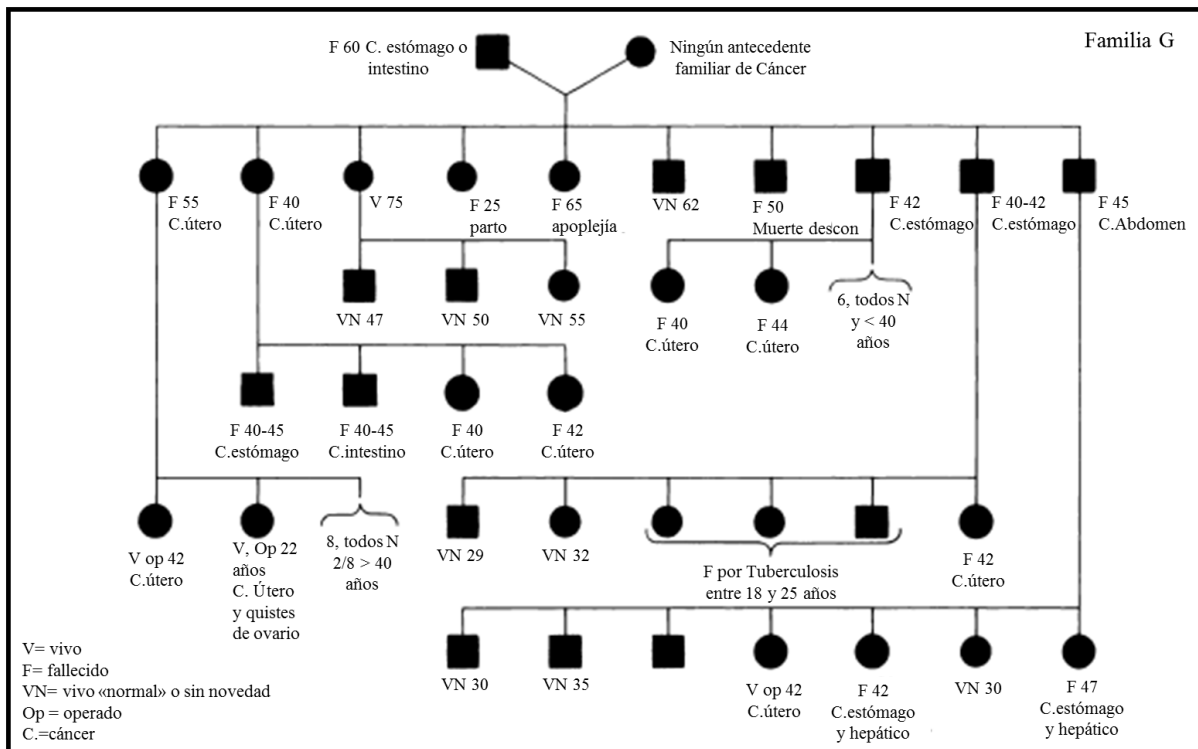


Figura 54. Árbol genealógico de la familia G

Publicado por el Dr. Warthin en 1913 [Extraído y modificado desde Warthin, 1913 (180)]

Warthin realizó una actualización de esta familia en el año 1925, donde comunicó que los cánceres que prevalecen por frecuencia son los que se presentan en tracto gastrointestinal, útero y ovario (182). Años más tarde, colegas de Warthin continuaron con la tarea de actualizar los datos de la Familia G (183).

En 1962 durante su residencia en medicina, Henry Lynch atendió a un paciente de Nebraska (EE.UU.) con una historia familiar similar a la de la modista de Warthin. Esta persona era un probando, y mientras se recuperaba de su *delirium tremens*, le dio a conocer a Lynch que él se alcoholizaba debido a que estaba convencido de que iba a morir de CCR, como “todos” en su familia. Lynch registró en detalle su historia familiar, la cual mostraba un número excesivo de casos de CCR a través de múltiples generaciones. Él lo relacionó con la poliposis adenomatosa familiar, un diagnóstico favorecido hasta ese momento para personas con familias propensas al CCR. Sin embargo, después de una intensiva revisión de historias clínicas de los familiares, no encontró evidencia de múltiples pólipos en colon, un sello distintivo de dicha enfermedad. Por lo que Lynch cuestionó su diagnóstico y se preguntó si ésto no sería un síndrome aún no descrito, con predisposición al CCR consistente con transmisión autosómica dominante, pero sin presencia de múltiples pólipos. Tiempo después, otros cánceres, particularmente el de endometrio fueron relacionados con esta familia, la cual Lynch llamó familia “N” (por Nebraska).

Marjorie Shaw de la Universidad de Michigan (EEUU) le hizo saber a Lynch que ella atendía a una familia con hallazgos similares a los que presentaba la familia N, esta nueva familia fue nombrada como la “M” (por Michigan). Los pedigrís de ambas familias fueron publicados en 1966 (184). Aunque este fue el trabajo que revivió el tema reportado por Warthin, despertando gran interés, los organismos de financiamiento eran reacios a aceptar la probabilidad de la existencia de un Síndrome Familiar de Cáncer (SFC) con una etiología genética, asumiendo que el ambiente era el responsable de generar éstos cánceres, ya que las familias en estudio lo compartían. El hecho de que ambas familias vivieran en regiones cercanas, se dedicaran a trabajos rurales, con exposición a pesticidas y otros potenciales carcinógenos utilizados en trabajos agrícolas, hacía consistente el concepto de la etiología ambiental.

El jefe de la cátedra de patología de la escuela de medicina de la Universidad de Michigan, invitó a Lynch a estudiar la Familia G. Esto llevó a un trabajo de revisión minucioso de las historias clínicas de dicha familia. Lynch y Anne Krush, una trabajadora social médica, viajaron luego a Alemania, de donde era originaria la Familia G; allí registraron más evidencia de predisposición a cánceres en dicha familia. El trabajo fue publicado en 1971 y reveló que hasta ese momento en la Familia G se contabilizaban más de

650 descendientes; 95 de ellos habían desarrollado neoplasmas malignos y 13 habían presentado múltiples neoplasias primarias. En sus conclusiones resaltan que los hallazgos del relevamiento familiar son compatibles con una enfermedad hereditaria autosómica dominante (185). Además, en este trabajo se comenzó a utilizar el término SFC para identificar la presentación de un grupo de cánceres en una misma familia (185).

En 1984, se comenzaron a utilizar dos denominaciones en reemplazo del término SFC, una tomó el nombre de uno de sus descubridores, “Síndrome de Lynch” (186), donde también se podía diferenciar al SLy tipo I si se trataba de presentación familiar exclusiva de CCR y al SLy tipo II donde se encontraban las presentaciones extracolónicas, como por ejemplo cáncer de útero. La denominación alternativa fue “cáncer colorrectal no polipósico hereditario”(187), pero esta última denominación no incluía a aquellos pacientes con localizaciones tumorales extracolónicas, por lo que un grupo de consenso europeo sugirió volver al nombre de SLy para los casos que se presentaran en aquellas familias con estudios genéticos que indicasen falta de actividad de alguna enzima del sistema MMR (43). Así, los síndromes como el de Muir-torre [el cual posee presentación de cáncer sebáceo de piel como adenoma, epiteloma o carcinoma, además de cánceres internos, siendo el más frecuente el de colon proximal (188)] y Turcot tipo 1 [caracterizado por presentar tumores primarios de CCR y sistema nervioso central, principalmente glioblastoma (189)], quedan englobados en el término SLy a causa de que su etiología es debido a fallas en el sistema MMR (190, 191).

Si bien hay consenso sobre la utilización del término SLy (190, 192), en la actualidad continúan apareciendo publicaciones que utilizan el término HNPCC. Un estudio reciente postula que en realidad el nombre del síndrome debería ser Warthin-Lynch en honor a sus principales descubridores, lo cual pareciera lo más razonable (193). Lynch, actualizó los registros de la familia G en el año 2005. A esa fecha, había 929 miembros de dicha familia pertenecientes a 7 generaciones, todos ellos descendientes de aquel abuelo que había nacido en Plattenhardt (Alemania) en 1796 y migró a los Estados Unidos de América en 1831(194).

ANEXO 2. Criterios de Amsterdam y Bethesda

Criterios de Amsterdam I y II

Criterios de Amsterdam I

Al menos tres familiares con histología verificada para CCR y todos los criterios deben cumplirse:

- 1- Uno es un familiar de primer grado de los otros 2;
- 2- Al menos 2 generaciones sucesivas afectadas;
- 3- Al menos 1 de los familiar con diagnóstico de CCR y <50 años.
- 4- Poliposis adenomatosa familiar debería excluirse.
- 5- Los tumores deberían verificarse de ser posible por un patólogo.

Criterios de Amsterdam II

A los criterios de Amsterdam I se suma: Al menos 3 familiares con un cáncer asociado a HNPCC [Colorrectal, endometrio, estómago, ovario, uréter/pelvis renal, cerebro, intestino delgado, tracto hepatobiliar y piel (tumor sebáceo)]

- 1- Al menos 1 de los cánceres relacionados al síndrome debería ser diagnosticado en pacientes <50 años.
- 2- Poliposis adenomatosa familiar debería excluirse en todos los casos de CCR.

Criterios de Bethesda revisados

Los tumores CCR deberían ser testeados para MSI en las siguientes situaciones:

- 1- CCR diagnosticado en un paciente <50 años.
- 2- Presencia de CCR sincrónico o metacrónico u otro cáncer asociado a HNPCC independientemente de la edad.
- 3- CCR con histología compatible con MSI-H * en un paciente <60 años.
- 4- CCR diagnosticado en uno o más familiares de primer grado o un tumor asociado a HNPCC, con uno de los cánceres diagnosticado en un paciente <50 años.
- 5- CCR diagnosticado en 2 o más familiares de primer o segundo grado o un tumor asociado a HNPCC independientemente de la edad.

* *Histología mucinosa, con células en anillo de sello, crecimiento medular, bajo grado de diferenciación celular, infiltración linfocitaria y/o reacción Crohn-like*

ANEXO 3. Interpretación de curvas de fusión de alta resolución

La identificación de variaciones en la secuencia del amplicón amplificado mediante inspección visual de las curvas de fusión, debería ser sencilla con el uso de un programa informático adecuado. Se comienza con el análisis de los datos sin procesar u originales (Figura 55). Para la normalización de esta información se seleccionan dos regiones lineales una antes y otra después de la transición principal de fluorescencia. Estas regiones definen dos líneas para cada curva, una por encima del 100% de fluorescencia y la más baja equivale al 0%. El porcentaje de fluorescencia dentro de la transición (entre las dos regiones) se calcula en cada temperatura como la distancia de los datos experimentales comparado a la distancia entre las líneas superior e inferior (130).

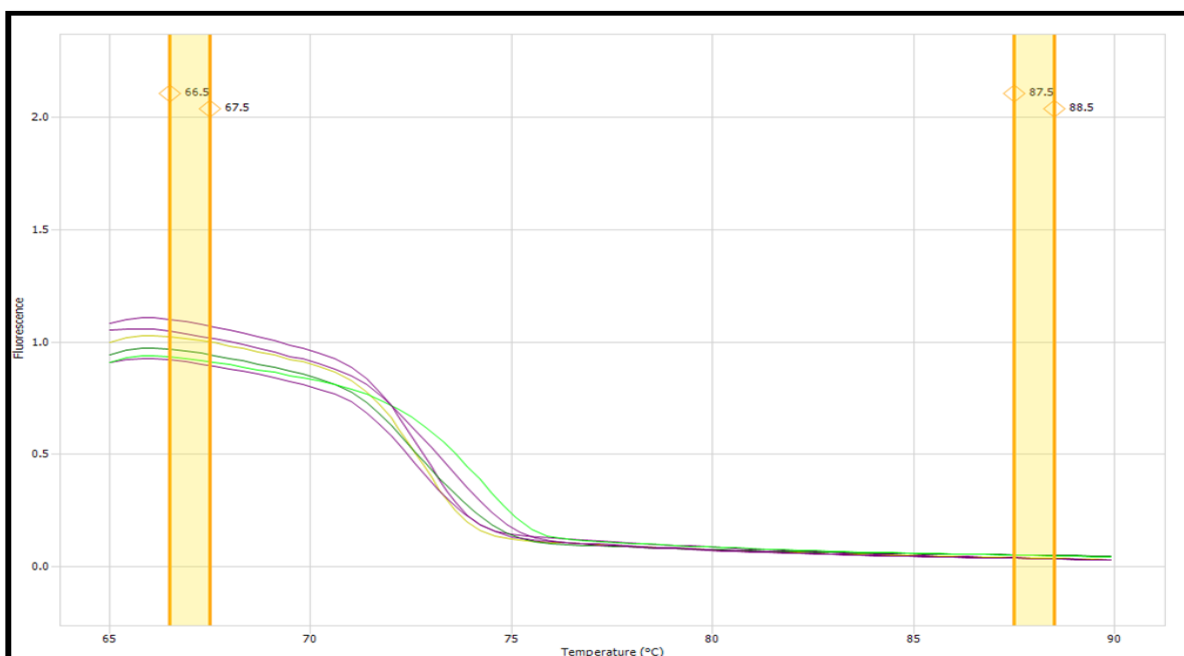


Figura 55. Curvas de Fusión- Datos sin procesamiento

La gráfica muestra diferentes curvas de fusión que aún no pueden ser comparadas por la falta de normalización

Se logra así, la normalización, la cual permite que todas las curvas puedan ser comparadas desde un mismo comienzo y final de nivel de fluorescencia (Figuras 56 y 57)

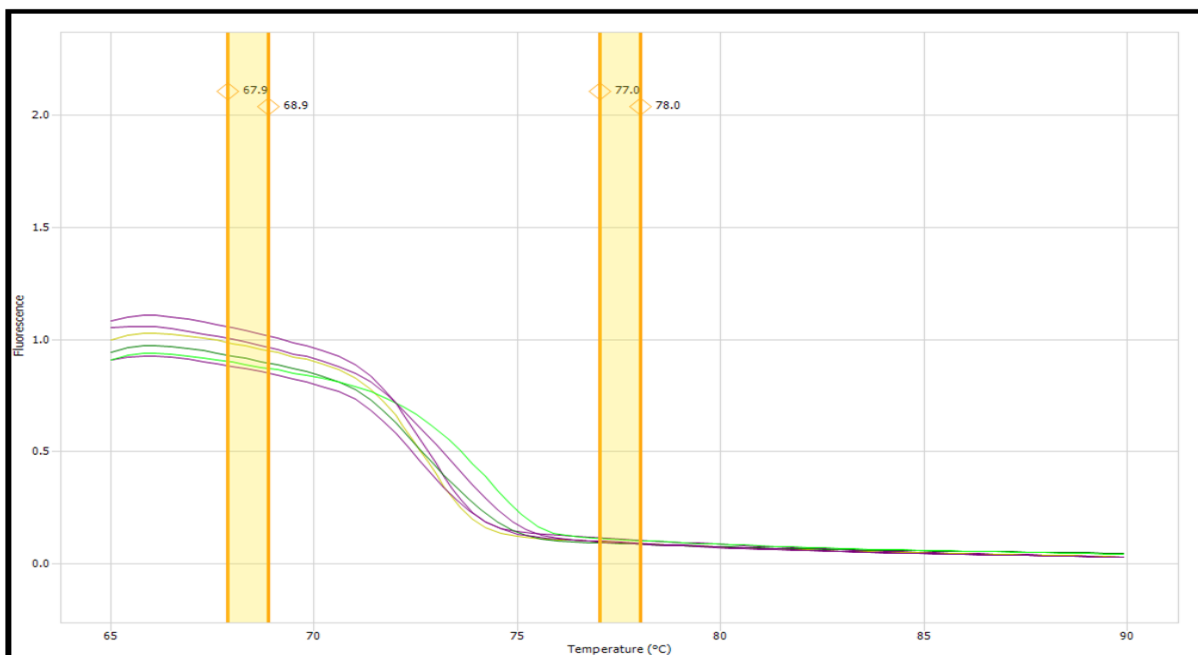


Figura 56. Curvas de Fusión- Datos Ajustados

Para lograr la normalización de los datos se ajustan los segmentos de las curvas a analizar proporcionando al programa el 100% y el 0% de fluorescencia que nos interesa ver, cuidando de no dejar los rangos de temperaturas elegidos en la fase de fusión.

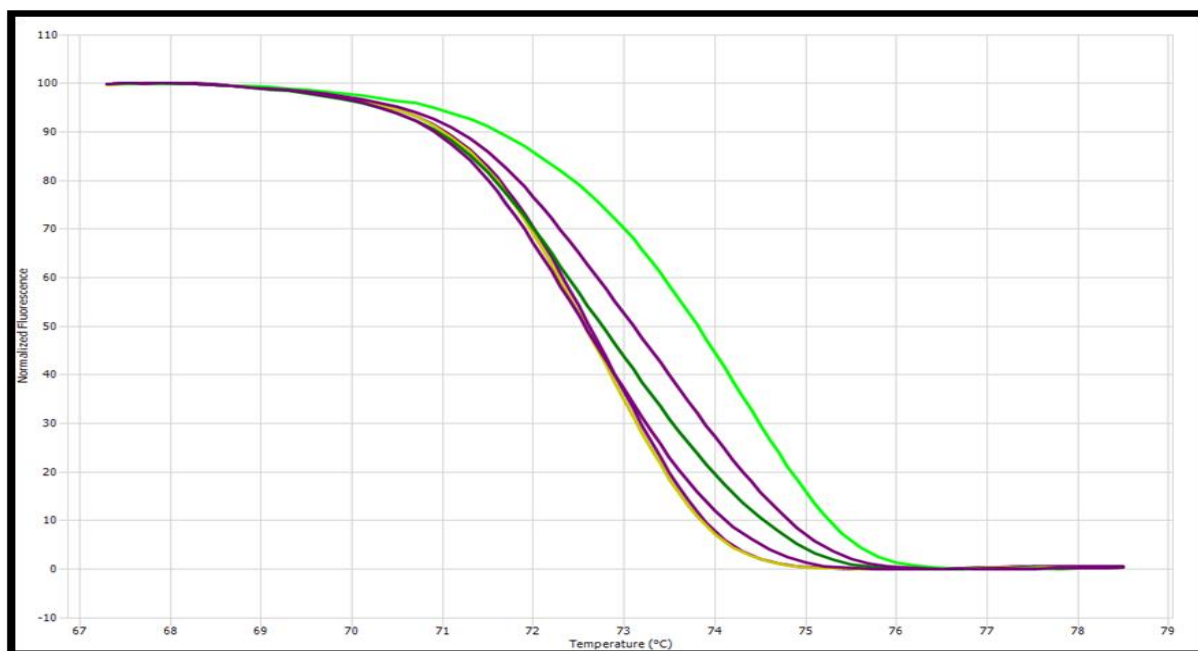


Figura 57. Curvas de Fusión- Datos Normalizados

Mediante la normalización las curvas de fusión pueden ser comparadas entre sí, permitiendo de esta manera ver la presencia de variantes desde un producto asignado como control o de referencia.

La diferencia entre las curvas suele visualizarse en forma más clara usando gráficos de diferencia de fluorescencia (gráfica diferencial), en donde se estudia la fluorescencia generada por una curva de referencia y se la compara con el resto de las curvas de fusión generadas por

las demás muestras en función de la temperatura, logrando una mejor separación de las curvas en la gráfica (Figura 58)

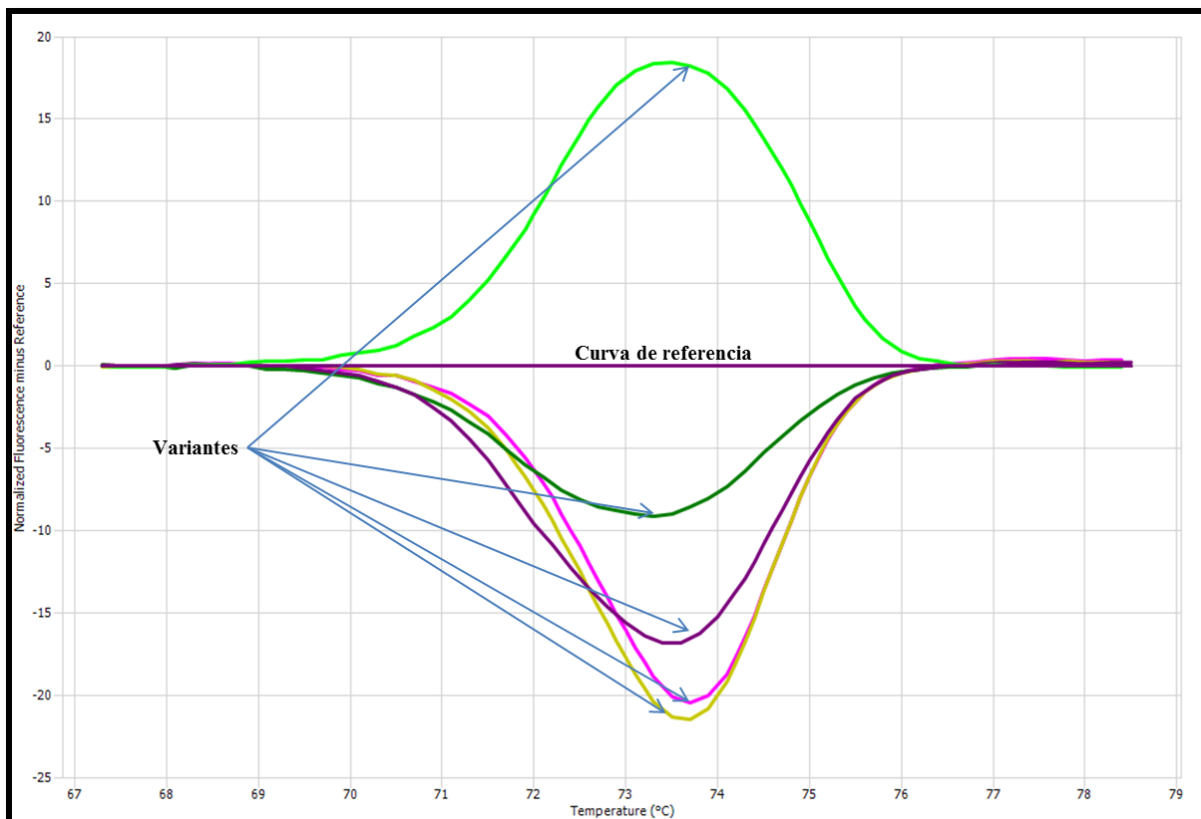


Figura 58. Curvas de Fusión- Gráfica diferencial

Luego de la normalización, las curvas de fusión también pueden ser comparadas entre si utilizando la gráfica diferencial que es otra forma de apreciar la presencia de variantes desde un producto asignado como control o de referencia.

Cuando se trabaja con mutaciones conocidas, los controles que deben analizarse con las muestras en la misma corrida permiten en muchos instrumentos realizar un auto-llamado de los resultados. Esto facilita la visualización de los resultados cuando se manejan corridas con muchas muestras, para no tener que observarlas individualmente.

Pero cuando no se conoce demasiado sobre la secuencia que engloban los iniciadores de la PCR, como es el caso del estudio de MSI, el control a utilizar es el ADN desde células “sanas” [células peritumorales normales o leucocitos de sangre periférica (SP)]. Esto permite comparar lo “normal” contra lo alterado (tumor) desde un mismo individuo y si hubiere una disminución o aumento en el número de bases respecto a la secuencia normal, esto se traduciría en curvas de fusión diferentes entre sí, denotando la inestabilidad en el marcador en estudio.

1. Equipamiento con capacidad para realizar curvas de fusión de alta resolución

La realización de un estudio de HRM necesita de aparatología específica con características ya descritas. Se pueden apreciar plataformas comerciales que analizan las muestras en tubos capilares, microplacas y tubos de PCR convencionales; además las formas de transferencias de calor pueden variar de un instrumento a otro, como calentamiento por aire o bloques metálicos que utilizan el efecto peltier. Estos últimos tienden a ser menos homogéneos en la distribución de temperaturas en los diferentes pocillos de corrida (95, 195) (Figura 59). Los modos de adquisición de la fluorescencia a medida que se va generando la curva de HRM también difieren, en consecuencia las lecturas de fluorescencia pueden tomarse en modos “paso a paso” o “continuas” en un rango de temperaturas asignado. Con el método continuo se toman lecturas constantes con la mayor rapidez posible, a medida que aumenta la temperatura. Si se utiliza el modo paso a paso el instrumento adquiere lecturas desde los tubos de reacción a temperaturas fijas, logrando recolectar mayor número de lecturas por grado centígrado asignado, esto enlentece el procedimiento y además pareciera generar mayor interferencia de fondo que el modo continuo (95).

Teniendo en cuenta estas variables, se han podido apreciar diferencias en la capacidad de resolución de las curvas de fusión dependiendo de la tecnología utilizada (95, 196).

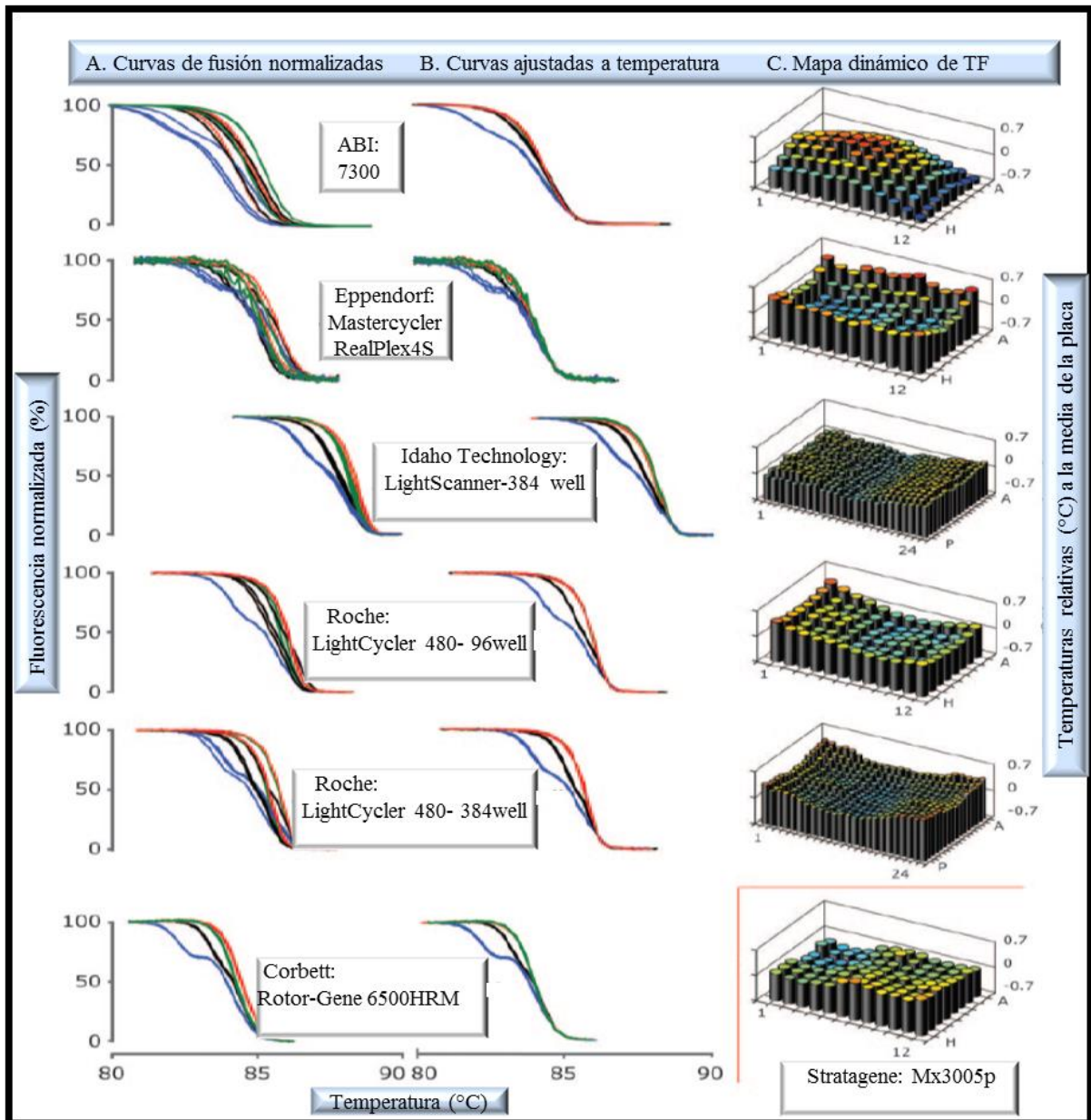


Figura 59. Curvas de HRM normalizadas, y perfiles térmicos desde bloques de diferentes instrumentos

El análisis está realizado sobre un amplicón de β -globina de 110 pares de bases. Las curvas para el homocigota normal se muestran en verde, las del homocigota mutante en rojo, el mutante simple heterocigota ($c.20A>T$) en negro y el doble heterocigota mutante [$c.(9C>T; 20A>T)$] en azul. A- Curvas de fusión normalizadas desde cada instrumento. B- Curvas de fusión de cambio de temperatura usada para análisis de heterocigotas. C- Perfil dinámico de fusión de todos los bloques de los instrumentos utilizados, referenciando las posiciones a la temperatura de fusión del implícito normal. Se puede ver claramente la falta de homogeneidad de temperaturas en las diferentes posiciones de la placa de amplificación. Los mejores resultados son obtenidos en el LightScanner. LC Green® Plus fue usado como la marca intercalante de ADN para todos los instrumentos, a excepción del Stratagene Mx30005p, el cual requiere el uso de SYBR Green I. TF: temperatura de fusión. Extraído y modificado de Herrmann y col., 2007 (195).

A medida que el largo del amplicón se incrementa en el diseño de un estudio, las diferencias entre la secuencia nativa en comparación con la alterada van disminuyendo y se vuelve más difícil poder apreciar alteraciones mínimas en la secuencia. En consecuencia, cualquier variación debida al instrumento utilizado para realizar el análisis de HRM

disminuirá la exactitud de la prueba, particularmente en productos de mayor extensión (130). Las variables que se deben destacar en la capacidad de un aparato para el análisis de una curva de fusión son el control y medición de la temperatura, además de una captación nítida de la fluorescencia. El control de la temperatura determina variaciones intra e intermuestras (para sistemas peltier). La resolución de las mediciones de temperatura y fluorescencia dependen del sensor y el ruido electrónico, la intensidad de la señal, el tiempo de integración y la capacidad de conversión de los datos analógicos a digitales (95).

En un estudio publicado en 2014, se pudo apreciar que la mejor adquisición de fluorescencia se daba en aparatología que analizaba una muestra a la vez (tubo/capilar) y no en aquella que utilizaba iluminación y adquisición de placa completa (196). En este trabajo se utilizaron 9 instrumentos con capacidad para realizar curvas de HRM, y las características de los mismos se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Listado y características de instrumentos de PCR en tiempo real con capacidad para realizar PCR-HRM

Instrumentos	Volumen (μ L)	Formato	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Modo de detección	Detector*	Adquisición de lectura	Datos / $^{\circ}$ C
HR-1	10	capilar	426-446	>490	1 muestra a la vez	FD	continua	66
LS32	10	capilar	435-455	475-515	1 muestra a la vez	FD	continua	67
LS96	10	placa	450-490	>510	placa completa	CCD	continua	10
Eco	10	placa	452-486	505-545	placa completa	CCD	continua	10
LC480	20	placa	435-465	490-510	placa completa	CCD	continua	25
PikoReal	10	placa	475-500	520-590	placa completa	CCD	paso a paso	25
Rotor-Gene	10 a 15	tubo	460-480	505-515	1 muestra a la vez	FMT	paso a paso	10
CFX96	20	placa	450-490	510-530	1 muestra a la vez	FD	paso a paso	10
StepOnePlus	20	placa	480 ^b	520 ^b	1 muestra a la vez	FD	paso a paso	26

*FD, fotodiodo; CCD, *charge-coupled device*; FMT, tubo fotomultiplicador. ^b El fabricante no pudo proveer el rango de la longitud de onda.

Extraído y modificado desde Mei li 2014 (196)

ANEXO 4. Estadificación, sistema TNM y estadios en CCR

El primer sistema de estadificación usado para clasificar los CCR fue el de Dukes, publicado en 1932 (197) y modificado por Astler y Coller (198). En la actualidad la estadificación para el CCR es realizada mediante la clasificación TNM, la cual fue desarrollada entre 1943 y 1952 por el Profesor Doctor Pierre Denoix en el Instituto Gustave-Roussy (Villejuif, Francia). En el sistema TNM: La T más una letra o un número (0 a 4) se utilizan para describir la profundidad con la cual el tumor primario se ha extendido dentro del revestimiento del intestino el cual está formado por varias capas de tejido (Figura 60). La N se refiere a la extensión de cáncer que se ha diseminado a los ganglios (o nódulos) linfáticos cercanos. La M se refiere a si el tumor primario ha hecho o no metástasis. Algunos estadios también se dividen en grupos más pequeños que permiten describir el tumor incluso con más detalle

La Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC, del inglés *International Union Against Cancer*)(199) definió los siguientes objetivos para el uso de la estadificación TNM:

- 1- Ayudar a los médicos en planificar el tratamiento.
- 2- Orientar en el pronóstico de la enfermedad.
- 3- Ayudar a evaluar los resultados del tratamiento.
- 4- Facilitar el intercambio de información entre diferentes centros de tratamiento.
- 5- Contribuir a la investigación continua de enfermedades malignas humanas.

En 1987 se unificaron las clasificaciones TNM divergentes propuestas hasta ese momento por el Comité Americano de Cáncer (AJCC, del inglés *American Joint Committee on Cancer*) y la UICC. Este sistema es revisado cada 6-8 años, teniendo en cuenta el aporte de nuevos datos clínicos, anatomopatológicos y biológicos que puedan influir en el manejo y pronóstico de la enfermedad. En el año 2010 se publicó la última edición (Séptima edición) de esta clasificación (200)

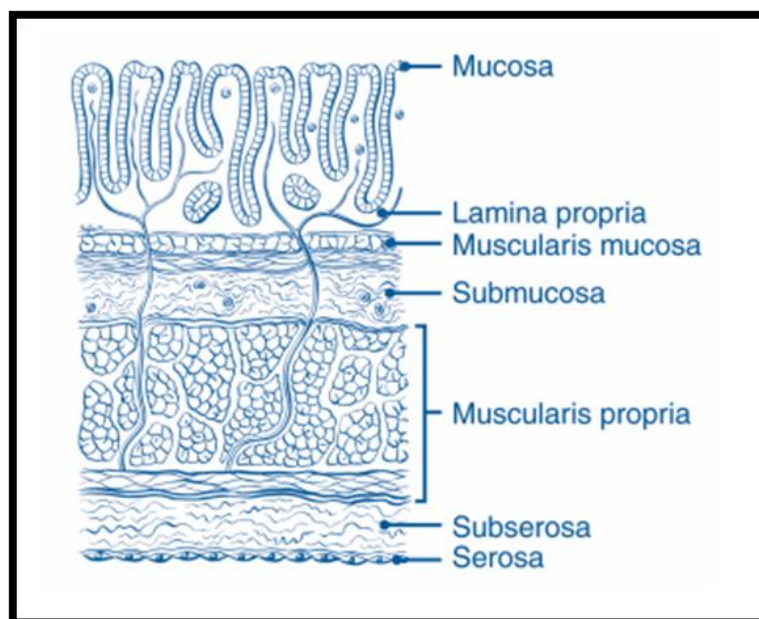


Figura 60. Corte histológico de la pared del intestino grueso

Tumor Primario (T)

TX: El tumor primario no puede ser valorado.

T0: No hay evidencia de tumor primario.

Tis: Carcinoma *in situ*: intraepitelial o invasión de la lámina propia¹

T1: tumor que invade la submucosa.

T2: tumor que invade la muscularis propia.

T3: tumor que invade muscularis propia hasta tejidos pericólicas.

T4a: tumor que penetra la superficie del peritoneo visceral.²

T4b: tumor que invade otros órganos o estructuras.^{2,3}

- 1- Tis incluye células tumorales confinadas dentro de la membrana basal glandular (intraepitelial) o lámina propia de la mucosa (intramucosa), sin compromiso de la muscular mucosa hacia la submucosa.
- 2- Invasión en T4 incluye el compromiso de otros órganos u otros segmentos del colon como resultado de directa extensión a través de la serosa, confirmado por examen en microscopio (ejemplo: invasión del colon sigmoidees por un carcinoma de ciego) o, por cánceres en una localización retroperitoneal o subperitoneal, invasión directa de otros órganos o estructuras por extensión mas allá de la muscular propia (Esto podría ser, un tumor sobre la pared posterior del colon descendente invadiendo el riñón izquierdo o la pared abdominal lateral; o un cáncer de recto medio o distal con invasión de próstata, vesículas seminales, cérvix o vagina).
- 3- Un tumor que esta adherido a otros órganos o estructuras, burdamente es clasificado como cT4b. Sin embargo si no hay tumor adherido, microscópicamente la clasificación debería ser pT1-4a dependiendo de la profundidad de la invasión de la pared a nivel anatómico. La clasificación V y L deberían

utilizarse para identificar la presencia o ausencia de invasión vascular o linfática, respectivamente. Mientras que el factor sitio específico PN debería usarse para invasión perineural.

Ganglios linfáticos regionales (N)¹

La “N” en el sistema TNM corresponde a la invasión hacia ganglios linfáticos. Estos ganglios son órganos minúsculos con forma “arriñonada” ubicados en todo el cuerpo que ayudan a combatir infecciones, ya que forman parte del sistema inmunológico del cuerpo. Los ganglios linfáticos cercanos al colon y al recto se denominan ganglios linfáticos regionales (Figura 61). El resto conforma los ganglios linfáticos distantes, es decir, que están ubicados en otras partes del cuerpo, diferentes a las que tenemos en estudio.

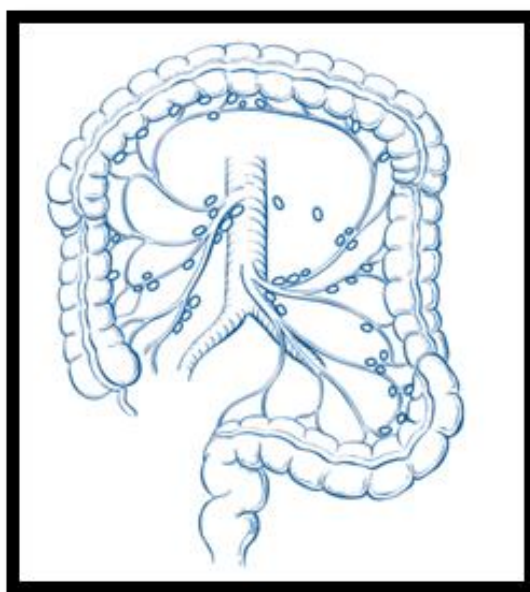


Figura 61. Distribución anatómica de ganglios linfáticos regionales en colon y recto

NX: ganglios linfáticos regionales sin valoración.

N0: no hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.

N1: Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos regionales.

N1a: Metástasis en 1 ganglio linfático regional.

N1b: Metástasis en 2–3 ganglios linfáticos regionales.

N1c: Tumor en subserosa, mesenterio, o tejido perirectal sin metástasis en ganglios regionales.

N2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales

N2a: Metástasis en 4 a 6 ganglios linfáticos regionales

N2b: Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales

- 1- Un nódulo peritumoral satélite en el tejido adiposo pericorectal de un carcinoma primario sin evidencia histológica de nódulos linfáticos residuales en el nódulo, puede representar diseminación discontinua, invasión venosa con diseminación vascular (V1/2), o un nódulo linfático tomado totalmente (N1/2). Los nódulos tomados deberían contarse como nódulos positivos en la categoría “N”, mientras que una diseminación discontinua o invasión venosa deberían ser clasificadas y englobadas en la categoría del factor sitio-específico “deposito tumoral” (TD)

Metástasis (M)

La letra “M” en el sistema TNM describe el cáncer que se ha diseminado a otras partes del cuerpo, como el hígado o los pulmones. Esto se denomina metástasis a distancia

M0: tumor sin metástasis.

M1: tumor con metástasis.

M1a: Metástasis confinada a un órgano o sitio (ejemplo: hígado, pulmón, ganglio no regional etc.)

M1b: Metástasis en más de un órgano/sitio o en peritoneo

Grado (G)

Los médicos también describen este tipo de cáncer según su grado (G), lo cual describe qué tan parecidas son las células cancerosas a las células sanas cuando se las observa a través de un microscopio. El médico compara el tejido canceroso con tejido sano. Habitualmente, el tejido sano contiene diferentes tipos de células que se agrupan. Si el cáncer tiene un aspecto similar al tejido sano y contiene diferentes agrupaciones de células, se lo denomina tumor diferenciado o de bajo grado. Si el tejido canceroso luce muy diferente al tejido sano, se lo conoce como tumor poco diferenciado o de alto grado. El grado del cáncer puede ayudar al médico a predecir qué tan rápido se diseminará el cáncer. En general, mientras más bajo es el grado del tumor, mejor es el pronóstico.

GX: no se puede identificar el grado del tumor.

G1: las células se asemejan más a las células sanas (denominadas bien diferenciadas).

G2: las células se asemejan en algo a las células sanas (denominadas moderadamente diferenciadas).

G3: las células se asemejan menos a las células sanas (denominadas poco diferenciadas).

G4: las células apenas se asemejan a células sanas (denominadas no diferenciadas).

1.1 Agrupación de los estadios del cáncer

En la nomenclatura de la estadificación del CCR se suele asignar el estadio del cáncer combinando las clasificaciones T, N y M (Tabla 8).

Estadio 0: se denomina cáncer in situ. Las células cancerosas se encuentran solo en la mucosa, o revestimiento interno, del colon o el recto.

Estadio I: el cáncer ha crecido y atravesado la mucosa invadiendo la capa muscular del colon o el recto. No se ha diseminado a los tejidos cercanos o ganglios linfáticos (T1 o T2, N0, M0).

Estadio IIA: el cáncer ha crecido y atravesado la pared del colon o del recto, pero no se ha diseminado a los tejidos o ganglios linfáticos cercanos (T3, N0, M0).

Estadio IIB: el cáncer ha crecido a través de las capas musculares hasta llegar al revestimiento del abdomen, denominado peritoneo visceral. No se ha diseminado a ganglios linfáticos cercanos ni a ninguna otra parte (T4a, N0, M0).

Estadio IIC: el tumor se ha diseminado a través de la pared del colon o del recto y ha invadido estructuras cercanas. No se ha diseminado a ganglios linfáticos cercanos ni a ninguna otra parte (T4b, N0, M0).

Estadio IIIA: el cáncer ha crecido a través del revestimiento interno o en las capas musculares del intestino y se ha diseminado hacia uno a tres ganglios linfáticos, o hacia un ganglio del tumor en tejidos que rodean el colon o el recto que no parecen ser ganglios linfáticos, pero no se ha diseminado hacia otras partes del cuerpo (T1 o T2; N1 o N1c, M0 o T1, N2a, M0).

Estadio IIIB: el cáncer ha crecido a través de la pared intestinal o en los órganos circundantes y en uno a tres ganglios linfáticos, o hacia un ganglio del tumor en tejidos que rodean el colon o el recto que no parecen ser ganglios linfáticos, pero no se ha diseminado a otras partes del cuerpo (T3 o T4a, N1 o N1c, M0; T2 o T3, N2a, M0; o T1 o T2, N2b, M0).

Estadio IIIC: independientemente de la profundidad con que se extendió el cáncer de colon, se ha diseminado a cuatro o más ganglios linfáticos, pero no a otras partes distantes del cuerpo (T4a, N2a, M0; T3 o T4a, N2b, M0; o T4b, N1 o N2, M0).

Estadio IVA: el cáncer se ha diseminado a una sola parte distante del cuerpo, como el hígado o los pulmones (cualquier T, cualquier N, M1a).

Estadio IVB: el cáncer se ha diseminado a más de una parte del cuerpo (cualquier T, cualquier N, M1b).

Recurrente: un cáncer recurrente es el cáncer que ha reaparecido después del tratamiento. La enfermedad puede hallarse en el colon, el recto o en otra parte del cuerpo. Si el cáncer regresa, se realizará otra serie de pruebas para obtener información sobre el alcance de la recurrencia. Esas pruebas y exploraciones generalmente son similares a aquellas que se realizan al momento del diagnóstico original.

Tabla 8. Estadio y clasificación TNM.

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	cualquier T	cualquier N	M1a
IVB	cualquier T	cualquier N	M1b

Nota: cTNM es la clasificación clínica, pTNM es la clasificación patológica. El prefijo “y” es usado para aquellos cánceres que son clasificados luego de un tratamiento neoadyuvante, por ejemplo: ypTNM. Los pacientes quienes poseen una respuesta patológica completa se denominan ypT0N0cM0, que pueden ser similares al estadio 0 o I. El prefijo “r” se utiliza para aquellos casos que recurrieron luego de un intervalo libre de enfermedad (rTNM).

