

La inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal puede predecirse en base al fenotipo tumoral.

Anna Colomer¹, Nadina Erill¹, August Vidal^{1,2}, Miquel Calvo³, Ruth Roman¹, Montse Verdú², Carlos Cordón-Cardó^{1,4}, Xavier Puig^{1,2}.

¹BIOPAT, Grup Assistència; ²HISTOPAT Laboratoris; ³Departamento de Estadística de la Universitat de Barcelona, Barcelona; y ⁴División de Patología Molecular, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York.

INTRODUCCIÓN

El 15% de tumores colorrectales esporádicos comparte mecanismos moleculares con el cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC), pues ambos se caracterizan por la alteración de uno o más genes reparadores del DNA (*MMR*). Las células con deficiencias en los genes *MMR* pierden la capacidad de reparar debidamente los errores espontáneos que ocurren durante el proceso de replicación del DNA, acumulando mutaciones que afectan sobretodo a las secuencias microsatélites. De este modo, los tumores que pertenecen al denominado fenotipo "mutador" presentan una rúbrica molecular conocida como alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H).

Los pacientes con tumores MSI-H se comportan como los HNPCC en términos de supervivencia, gozando de mejor pronóstico estadio por estadio que los pacientes con cáncer esporádico estable. Recientemente se ha propuesto que para tumores no avanzados con MSI-H, el régimen convencional de tratamiento posquirúrgico con 5-fluorouracilo no incrementa la supervivencia global ni el intervalo libre de enfermedad, lo que sugiere que la inestabilidad puede emplearse además como factor predictivo de respuesta a la terapia. La detección de inestabilidad, junto con los criterios clínicos de Ámsterdam o de Bethesda, contribuye también a la identificación de familias con HNPCC.

Los tumores MSI-H esporádicos y familiares comparten fenotipo histopatológico. Suelen ser lesiones proximales, caracterizadas esencialmente por un patrón microscópico mucoide o sólido-indiferenciado, infiltrado linfocitario peritumoral con formación de folículos -similar al de la enfermedad de Crohn-, e incremento de linfocitos intraepiteliales en las glándulas neoplásicas.

OBJETIVO

Proporcionar a los patólogos una herramienta coste-efectiva y fácil de incorporar a la sistemática de estudio patológico del carcinoma de colon que permite seleccionar los tumores candidatos al estudio de inestabilidad de microsatélites en base a parámetros clinicopatológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes. Estudio prospectivo de una serie de 204 pacientes consecutivos intervenidos quirúrgicamente por cáncer colorrectal primario (*población de entrenamiento*), utilizada para generar un modelo de predicción de MSI-H. En segunda fase, estudio de otra serie prospectiva de 68 pacientes (*población de validación*), para demostrar la eficacia del modelo generado con la primera serie. En la **Tabla 1** se hallan las características clinicopatológicas de ambas poblaciones.

Tejidos. Revisión histopatológica de secciones teñidas con H&E de tejido fijado en formol e incluido en parafina representativas de tumor, mucosa normal, lesiones asociadas, márgenes -proximal, distal y radial-, y ganglios linfáticos para reevaluar parámetros en base a criterios vigentes, sin conocimiento previo del estado de inestabilidad. Estudio de inestabilidad realizado a partir del DNA obtenido de áreas representativas de secciones de 5 µm de tejido normal y tumoral.

Inmunohistoquímica. Detección de expresión de las proteínas p53 y Ki67 realizada por método de avidina-biotina inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales primarios DO-7 y MIB-1, respectivamente (ambos de DAKO, Glostrup, DK), en secciones de 4 µm previa recuperación antigénica por calor en tampón citrato.

Análisis de inestabilidad. Amplificación de 11 marcadores microsatélites por PCR: los 5 del panel del NCI (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 y D17S250), 6 de los convencionalmente usados para estudiar LOH en el cromosoma 18q (D18S55, D18S58, D18S61, D18S64 y D18S69), y otro del locus TP53 en el cromosoma 17p (P53CA). Acorde a las directrices del US National Cancer Institute, los casos que presentaron inestabilidad en más del 30% de los loci testados se clasificaron como MSI-H.

Análisis estadístico. Modelo de predicción obtenido tras el análisis multivariable mediante regresión logística utilizando 29 parámetros clinicopatológicos de cada tumor (**Tabla 2**). Evaluación de la robustez del modelo por técnica de *10-fold cross-validation*. Validación del modelo implementado en la práctica clínica utilizando una serie independiente de pacientes.

RESULTADOS

Modelo. Se generó mediante el cálculo de la probabilidad de que un tumor fuera MSI-H en base a la siguiente fórmula:

$$P = 1 - \frac{1}{1 + e^X} \quad \text{donde } P \text{ es la probabilidad estimada, y}$$

$$X = -2,648 - 2,401 \cdot x_1 + 0,021 \cdot x_2 + 0,0453 \cdot x_3 - 1,884 \cdot x_4 + 0,050 \cdot x_5 - 0,029 \cdot x_6 - 0,118 \cdot x_7 - 1,600 \cdot x_8$$

corresponde al desarrollo del componente lineal de la fórmula, representando x_i el valor que toma una determinada variable para cada tumor individual (0 ó 1 en caso de ser dicotómica). El punto de corte óptimo se estimó empíricamente en una $P < 0,29$.

Fenotipo tumoral MSI-H. Las 8 características que se hallaron asociadas a los tumores MSI-H fueron: localización proximal (x_1), crecimiento expansivo (x_2) (Fig. 2A), presencia de infiltrado inflamatorio peritumoral Crohn-like (x_3) (Fig. 2B), patrón microscópico sólido (x_4) y/o mucoide extracelular (x_5) (Fig. 2C), ausencia de patrón cribiforme (x_6) (Fig. 2D), alto índice proliferativo (Ki67) (x_7) (Fig. 3A), e inmunofenotipo p53 negativo (x_8) (Fig. 3B).

Validación del modelo. En la **Tabla 3** se muestran los resultados obtenidos tras aplicar el modelo de predicción generado a las poblaciones estudiadas. La ecuación permitió clasificar correctamente 194 de los 204 tumores de la población de entrenamiento. De los 10 casos mal clasificados, 6 fueron falsos positivos y 4 falsos negativos. Tras el análisis de *10-fold cross-validation* se comprobó la robustez del modelo que, en el peor de los casos, fue capaz de clasificar correctamente 185 de los 204 tumores (91%), con un valor predictivo negativo del 96%. La aplicación de nuestro modelo de predicción a la población de validación permitió clasificar correctamente 63 de los 68 tumores (93%). Los parámetros de validación para ambas poblaciones se hallan también en la misma tabla.

CONCLUSIONES

- El modelo de regresión logística propuesto es útil para predecir el estado de inestabilidad de microsatélites en base a parámetros clinicopatológicos. Implementada en una hoja de cálculo, la ecuación resulta fácil de aplicar al estudio patológico rutinario.
- La aplicación de la ecuación a todos los adenocarcinomas colorrectales, complementada con el análisis molecular para determinar el estado de inestabilidad de microsatélites únicamente en los casos con predicción positiva de MSI-H (<10%) mejora el modelo en términos de exactitud global (>98%), y es coste-efectiva.

TABLAS

Tabla 1. Características clinicopatológicas de las poblaciones de entrenamiento y validación usadas para generar y validar el modelo de predicción de MSI-H, respectivamente.

| Características | Población entrenamiento (n = 204) | Población validación (n = 68) |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Edad | 68,7 ± 12,1 | 71,3 ± 10,4 |
| Sexo | | |
| Hombre | 119 (58,3) | 45 (66,2) |
| Mujer | 85 (41,7) | 23 (33,8) |
| Histología | | |
| Adenocarcinoma | 174 (85,3) | 65 (95,6) |
| Adenocarcinoma mucoide | 30 (14,7) | 3 (4,4) |
| Extensión de la invasión (TNM) | | |
| pT1 | 13 (6,4) | 6 (8,8) |
| pT2 | 26 (12,7) | 19 (14,7) |
| pT3 | 102 (50,0) | 26 (38,2) |
| pT4 | 63 (30,9) | 26 (38,2) |
| Afectación ganglionar (TNM) | | |
| pN0 | 99 (48,5) | 40 (58,9) |
| pN1 | 58 (28,4) | 12 (17,6) |
| pN2 | 47 (23,0) | 16 (23,5) |
| Estadio (Astler-Coller's) | | |
| A | 10 (4,9) | 14 (20,6) |
| B | 86 (42,2) | 25 (36,8) |
| C | 90 (44,1) | 21 (30,9) |
| D | 18 (8,8) | 8 (11,8) |
| Grado histológico (WHO) | | |
| 1 | 76 (37,3) | 52 (76,5) |
| 2 | 82 (40,2) | 11 (16,2) |
| 3 | 46 (22,5) | 5 (7,4) |

Tabla 2. Parámetros clinicopatológicos utilizados para generar el modelo de predicción de MSI-H por análisis multivariable de regresión logística.

| Variable categórica (n = 204) | MSI-H (n = 18) | no MSI-H (n = 186) |
|--------------------------------------------|-----------------|---------------------|
| Sexo | | |
| Varón | 8 (44,4) | 75 (40,3) |
| Mujer | 10 (55,6) | 75 (40,3) |
| Localización | | |
| Proximal | 14 (77,8) | 58 (31,2) |
| Distal | 4 (22,2) | 128 (68,8) |
| Configuración | | |
| Exfoliativa | 9 (50,0) | 74 (39,8) |
| Ulcerosa | 7 (38,9) | 73 (39,2) |
| Estenosante | 2 (11,1) | 80 (43,0) |
| Grado (WHO) | | |
| 1 | 3 (16,7) | 73 (39,2) |
| 2 | 2 (11,1) | 80 (43,0) |
| 3 | 13 (72,2) | 33 (17,7) |
| Extensión de la invasión (TNM) | | |
| pT1 | 0 | 13 (7,0) |
| pT2 | 3 (16,7) | 23 (12,4) |
| pT3 | 11 (61,1) | 91 (48,9) |
| pT4 | 4 (22,2) | 59 (31,7) |
| Estadio (Astler-Coller's) | | |
| A | 0 | 10 (5,4) |
| B | 13 (72,2) | 73 (39,2) |
| C | 5 (27,8) | 85 (45,7) |
| D | 0 | 18 (9,7) |
| Invasión vasos paredes delgadas intramural | | |
| Presencia | 3 (16,7) | 77 (41,4) |
| Ausencia | 15 (83,3) | 109 (58,6) |
| Invasión vasos paredes delgadas extramural | | |
| Presencia | 3 (16,7) | 66 (35,5) |
| Ausencia | 15 (83,3) | 120 (64,5) |
| Invasión venosa intramural | | |
| Presencia | 2 (11,1) | 11 (5,9) |
| Ausencia | 16 (88,9) | 175 (94,1) |
| Invasión venosa extramural | | |
| Presencia | 3 (16,7) | 38 (20,4) |
| Ausencia | 15 (83,3) | 148 (79,6) |
| Invasión perineural intramural | | |
| Presencia | 0 | 7 (3,8) |
| Ausencia | 18 (100,0) | 179 (96,2) |
| Invasión perineural extramural | | |
| Presencia | 0 | 22 (11,8) |
| Ausencia | 18 (100,0) | 164 (88,2) |
| Patrón de crecimiento | | |
| Expansivo | 12 (66,7) | 56 (30,1) |
| Infiltrativo | 6 (33,3) | 130 (69,9) |
| Reactividad Crohn-like | | |
| Presencia | 13 (72,2) | 37 (19,9) |
| Ausencia | 5 (27,8) | 149 (80,1) |
| Infiltración linfocitaria extensa (TLI) | | |
| Presencia | 9 (50,0) | 21 (11,3) |
| Ausencia | 9 (50,0) | 165 (88,7) |
| Adenomas | | |
| Presencia | 5 (27,8) | 49 (26,3) |
| Ausencia | 13 (72,2) | 137 (73,7) |
| Pólipos no adenomatosos | | |
| Presencia | 3 (16,7) | 21 (11,3) |
| Ausencia | 15 (83,3) | 165 (88,7) |
| Vestigio de adenoma | | |
| Presencia | 6 (33,3) | 53 (28,5) |
| Ausencia | 12 (66,7) | 133 (71,5) |
| Variable numérica (n = 204) | MSI-H* (n = 18) | no MSI-H* (n = 186) |
| Edad (años) | 67,6 ± 14,1 | 67,8 ± 11,9 |
| Medida del tumor (mm o máximo) | 51,3 ± 10,5 | 30,9 ± 20,6 |
| Carcinoma sólido (%) | 19,4 ± 28,3 | 10,5 ± 16,7 |
| Carcinoma mucoide extracelular (%) | 40,8 ± 31,4 | 10,9 ± 24,1 |
| Carcinoma mucoide intracelular (%) | 0,8 ± 2,6 | 0,5 ± 3,7 |
| Patrón cribiforme (%) | 2,2 ± 5,2 | 6,9 ± 15,1 |
| Patrón microcapilar (%) | 1,1 ± 3,2 | 3,6 ± 10,7 |
| Patrón microglándular infiltrativo (%) | 0,8 ± 2,6 | 4,4 ± 11,8 |
| Afectación ganglionar (n) | 3,6 ± 8,8 | 2,2 ± 3,3 |
| Índice proliferativo Ki67 (%) | 70,8 ± 13,9 | 53,9 ± 22,1 |
| Sobrexpresión p53 (%) | 15,3 ± 22,6 | 36,5 ± 34,5 |

*Media aritmética ± desviación estándar

Tabla 3. En los paneles superiores, resultados de la aplicación del modelo de predicción de MSI-H a las poblaciones estudiadas. Nótese que para ambas poblaciones, la realización del análisis molecular en los casos con predicción positiva limita el estudio al 10% de los tumores. En los paneles inferiores se muestran los parámetros de validación para cada una de las poblaciones, siendo el valor predictivo negativo en ambas del 98%.

| | Población de entrenamiento | | | Población de validación | | |
|--------------|----------------------------|----------|-----|-------------------------|----------|----|
| | MSI-H | no MSI-H | | MSI-H | no MSI-H | |
| predicción + | 14 | 6 | 20 | 3 | 4 | 7 |
| predicción - | 4 | 180 | 184 | 1 | 60 | 61 |
| | 18 | 186 | 204 | 18 | 64 | 68 |

| | Población de entrenamiento | | | Población de validación | | |
|--------------------|----------------------------|----------|-----|-------------------------|----------|-----|
| | MSI-H | no MSI-H | | MSI-H | no MSI-H | |
| exactitud | | | 95% | | | 93% |
| sensibilidad | | | 78% | | | 75% |
| especificidad | | | 97% | | | 94% |
| valor predictivo + | | | 70% | | | 43% |
| valor predictivo - | | | 98% | | | 98% |

FIGURAS

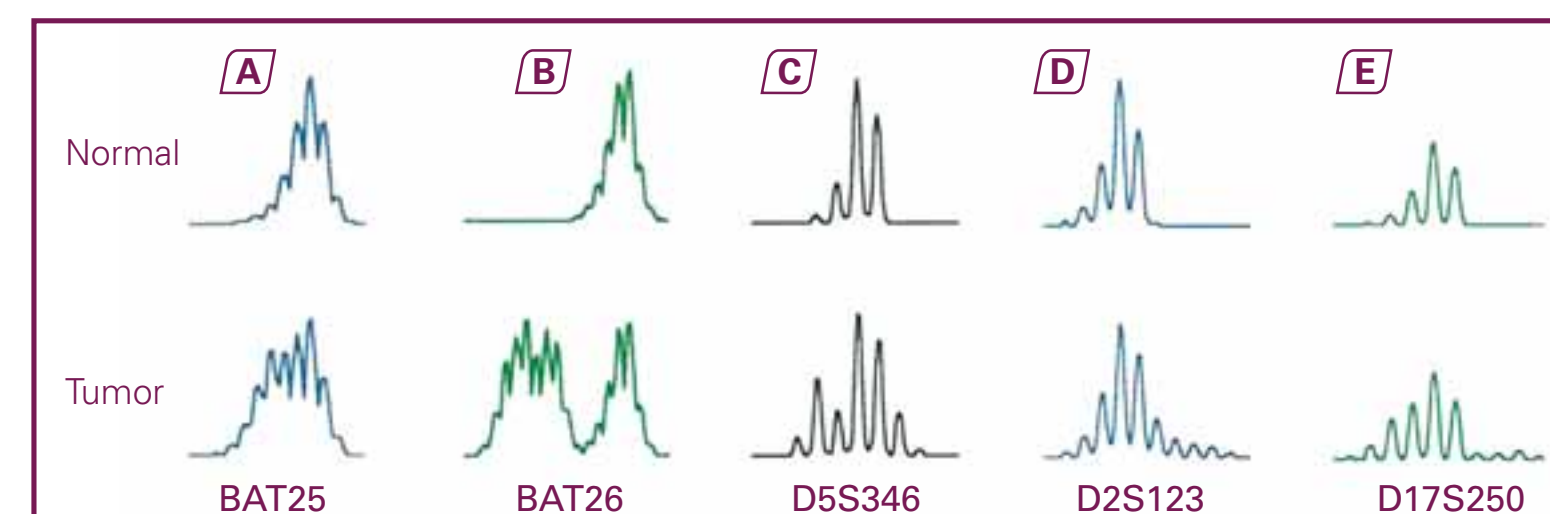


Figura 1. Electroferogramas obtenidos en los ensayos para determinar inestabilidad de microsatélites utilizando los marcadores del panel del NCI. Ejemplo representativo de un tumor MSI-H. Para cada uno de los marcadores, la imagen superior representa el DNA normal, y la inferior el DNA tumoral. (A) BAT25, (B) BAT26, (C) D5S346, (D) D2S123 y (E) D17S250.

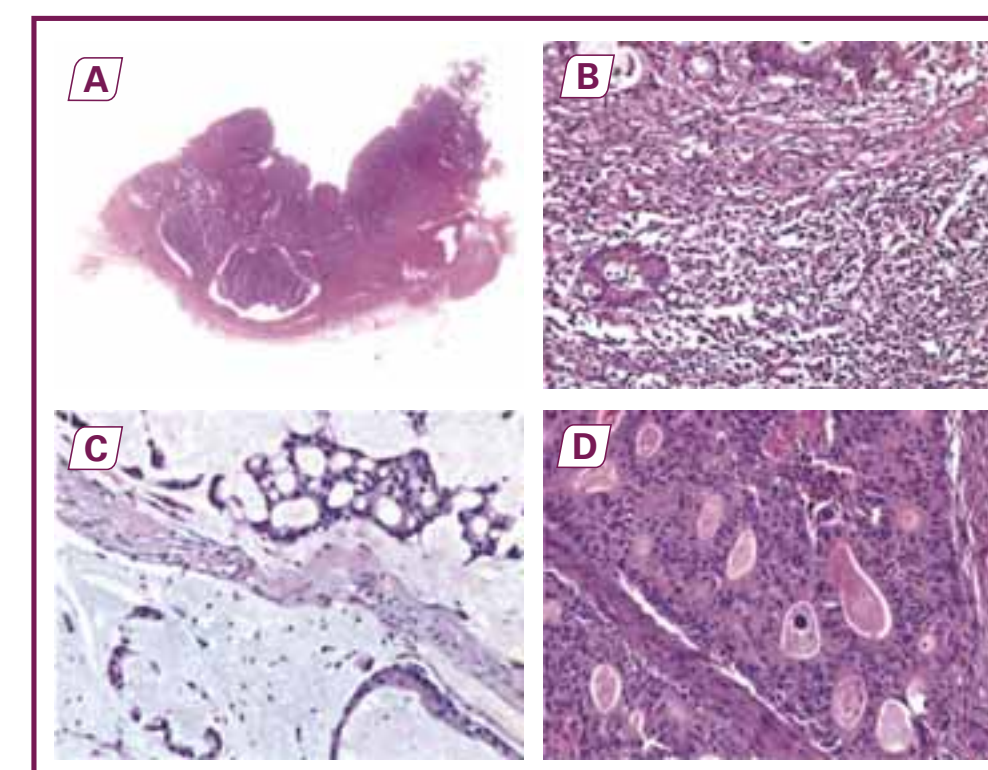


Figura 2. Ejemplos representativos del aspecto microscópico de algunos de los parámetros morfológicos que se hallaron relacionados con el cáncer colorrectal MSI-H. (A) Patrón de crecimiento de tipo expansivo, caracterizado por la configuración del borde tumoral externo, liso y bien definido (H&E, montaje "macro/micro" de sección completa). (B) Denso infiltrado linfocitario peritumoral, con reacción linfoide Crohn-like (H&E, x200). (C) Diferenciación mucoide, caracterizada por la presencia de un fondo de moco extracelular que engloba nidos y cordones de células neoplásicas (H&E, x200). (D) Patrón de crecimiento cribiforme, caracterizado por la presencia de estructuras glandulares carentes de estroma, con pequeños lúmenes secundarios redondeados (H&E, x200).

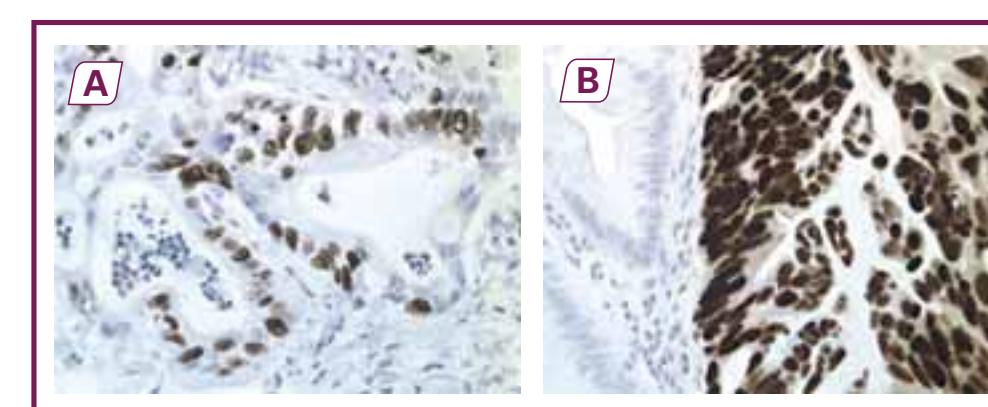


Figura 3. Ejemplos representativos de los dos parámetros inmunohistoquímicos que se hallaron asociados al cáncer colorrectal MSI-H. (A) Índice proliferativo >70% en un caso con MSI-H (inmunoreactividad para MIB-1, x200). (B) Sobreexpresión de p53 en >90% de las células neoplásicas del tumor -derecha- en contraste con los núcleos negativos de las criptas no tumorales -izquierda- (inmunoreactividad para DO-7, x200).

BIBLIOGRAFÍA

- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-57.
- Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004;126:394-401.
- Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S, et al. Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* 2000;31:1506-14.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69-77.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
- Jass JR, Do KA, Simms LA, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998;42:673-9.
- Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-institution status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.
- Ripley BD. Pattern recognition and neural networks. Cambridge: Cambridge University Press; 1996. Capítulo 7.