

## **Marcadores inmunohistoquímicos de inestabilidad microsatelital para la tipificación del cáncer colorrectal. Aspectos claves para la interpretación por el patólogo**

Immunohistochemical markers of microsatellite instability for the typing of colorectal cancer. Key aspects for interpretation by the pathologist

María del Consuelo López Sánchez<sup>1</sup> <https://www.orcid.org/0000-0002-3918-1887>

Fernanda Monteagudo Cásarez<sup>1</sup> <https://www.orcid.org/0000-0002-9612-378x>

Marisol Rodríguez Touceiro<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5149-2450>

Gissel García Menéndez<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9851-2041>

<sup>1</sup>Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [gisselgarcia@infomed.sld.cu](mailto:gisselgarcia@infomed.sld.cu)

### **RESUMEN**

**Introducción:** La inestabilidad microsatelital son mutaciones en secuencias repetitivas simples que caracterizan al ADN de células tumorales pues lleva a afectaciones en el sistema de proteínas reparadoras de errores de apareamiento. Detectar estas afectaciones constituye en la actualidad una potente herramienta diagnóstica que permite conocer el estadio del tumor y predecir su comportamiento.

**Objetivo:** Orientar al patólogo para la interpretación del sistema de inmunohistoquímica Ventana Roche para la detección de la presencia o ausencia de expresión de las proteínas del sistema de reparación de errores del ADN en el cáncer colorrectal.

**Métodos:** Se aplicó el sistema de inmunohistoquímica Ventana Roche para la determinación de la presencia o ausencia de las proteínas reparadoras MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2.

**Resultados:** Se identificó un tumor con alta inestabilidad microsatelital al no expresar la presencia de las proteínas HML1y PSM2.

**Conclusiones:** El sistema Ventana Roche integra anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. Su correcta interpretación permite obtener una clasificación más certera del tumor de colon y sugiere o descarta la necesidad posterior de realizar pruebas genéticas.

**Palabras clave:** cáncer colorrectal; MLH1; MSH2; MSH6 y PMS2; inestabilidad microsatelital; inmunohistoquímica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Microsatellite instability are mutations in simple repetitive sequences characterizing the DNA of tumor cells, since it leads to damages in the protein system that repairs mismatches. Detecting these affectations is at present a powerful diagnostic tool allowing to know the stage of the tumor and predicting its behavior.

**Objective:** To guide the pathologist in the interpretation of the Ventana Roche immunohistochemistry system for the detection of the presence or absence of expression of DNA error repair system proteins in colorectal cancer.

**Methods:** Ventana Roche immunohistochemical system was applied to determine the presence or absence of repair proteins MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2.

**Results:** A tumor with high microsatellite instability was identified as it did not express the presence of HML1 and PSM2 proteins.

**Conclusions:** Ventana Roche system integrates monoclonal antibodies directed against the proteins MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2. Its correct interpretation allows obtaining a more accurate classification of the colon tumor and suggests or rules out the subsequent need for genetic testing.

**Keywords:** colorectal cancer; MLH1; MSH2; MSH6 and PMS2; microsatellite instability; immunohistochemistry.

Recibido: 28/05/2022

Aprobado: 10/09/2022

## Introducción

El cáncer es un complejo proceso evolutivo en cuyo desarrollo diversas poblaciones de células cancerígenas están sometidas a presiones selectivas frente a la ecología tisular del organismo. Estas fuerzas en su mayoría se asocian a la diversidad genética cuyos mecanismos, que explican el desarrollo tumoral, no han sido totalmente dilucidados.<sup>(1)</sup>

Entre los cánceres más comunes y agresivos está el cáncer colorrectal (CCR) cuyos datos de incidencia y mortalidad se incrementan cada año. Hasta el año 2018 era considerado la tercera causa de muerte por cáncer.<sup>(2)</sup> Sin embargo, reportes en el año 2020 muestran que ha ocupado el segundo lugar con un total de 19,3 millones de nuevos casos en el mundo y con un incremento en la incidencia en individuos menores de 50 años.<sup>(3)</sup>

El CCR es un diagnóstico que engloba múltiples causas, entre ellas se han identificado 4 vías moleculares oncogénicas que inciden en su progresión. Estas cuatro vías son: inestabilidad cromosómica, fenotipo de metilación en islas CP, inestabilidad microsatélite (IMS) y vía cerrada.<sup>(4)</sup>

La inestabilidad microsatelital es un fenómeno que caracteriza al ADN de células cancerígenas con importantes implicaciones clínicas en el desarrollo del tumor. Se relaciona con el sistema reparador de errores de apareamiento (MMR, del inglés *miss mach repare*), responsable del mantenimiento de la estabilidad genómica y la homeostasis. Un defecto en estos genes lleva al desarrollo de mutaciones en secuencias repetitivas simples (llamadas microsatélite), las cuales causan la inestabilidad microsatelital (IMS). Un sistema de reparación comprometido lleva a la acumulación acelerada de mutaciones somáticas, resultando en carcinogénesis.<sup>(4)</sup>

La detección de ambos sistemas como un algoritmo integrado, constituye hoy en día una potente herramienta diagnóstica que permite conocer el estadio del tumor, evaluar el riesgo y predecir su comportamiento y sensibilidad al tratamiento de inhibición inmune.<sup>(5,6,7)</sup> Sin embargo, la interpretación del sistema suele ser compleja para el patólogo.<sup>(8,9,10)</sup> Es por ello que en el presente trabajo nos proponemos orientar al patólogo en aspectos clave que ha de tener en cuenta para la interpretación del sistema de inmunohistoquímica Ventana Roche para la detección de la presencia o ausencia de expresión de las proteínas del sistema de reparación de errores del ADN en el cáncer colorrectal.

## Métodos

El sistema que detecta la afectación en las proteínas MMR es una técnica inmunohistoquímica automatizada diseñada para ser ejecutada en un equipo Benchmark Ultra (Roche) siguiendo las orientaciones del fabricante. Una vez que se introduce el tejido en el bloque de parafina se le realiza un corte con micrótopo de 2 a 5 nm. Se coloca en un portaobjetos comercializado con carga y rotulado con una etiqueta brindada por el equipo. El portaobjetos previamente preparado se ajusta en el equipo, el cual es programado para el anticuerpo seleccionado: MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2.

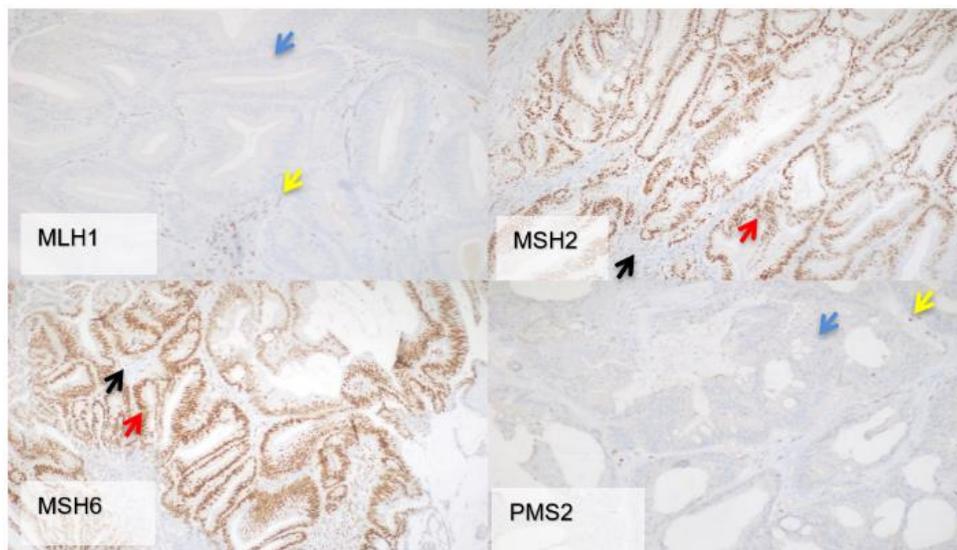
De manera general se desparafina por calentamiento del portaobjetos a 72 °C. Posteriormente, se somete a diferentes programas de baños según el anticuerpo a emplear en el protocolo. Estos pasos se realizan con el empleo del condicionador celular CC1, previo calentamiento del portaobjetos a 100 °C, así como su incubación como paso inicial a los baños. Luego, se aplica una solución de peróxido al 3 %, seguido de una gota del anticuerpo indicado con la subsiguiente aplicación del cromógeno. En este caso se utilizó un cromógeno color café. Se continúa el proceso enjuagando con *bluing reagent*, se aplica una gota de hematoxilina y se enjuaga nuevamente con *bluing reagent*. Se extrae el portaobjetos y se lava en abundante agua corriente. Se procede a deshidratar el tejido con alcoholes de concentraciones crecientes (75, 80, 90 y 100 %). Posteriormente, se aplica un baño de xilol<sup>(11)</sup> y finalmente se procede al montaje con UKITT para la observación al microscopio.

La técnica emplea como control interno el tejido glandular sin atipia presente en la muestra y/o las células inmunes. En caso de no existir tejido no tumoral en la muestra se usa un control externo con tejido colónico normal.

La expresión nuclear de todas las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 es un indicador de que el sistema de reparación está intacto (eficiente) y la ausencia de expresión nuclear de alguno de los marcadores permite clasificar al adenocarcinoma como con un sistema de reparación deficiente.<sup>(7)</sup> Según la cantidad de mutaciones de MS los tumores se clasifican como tumores con alta inestabilidad microsatelital (MSI-H), tumores de baja inestabilidad microsatelital (MSI-L) y tumores que no muestran inestabilidad microsatelital o microsatélites estables (MSS).<sup>(5,8)</sup>

## Resultados

La siguiente figura muestra el corte histológico de un adenocarcinoma de colon derecho (transverso) procesado mediante inmunohistoquímica<sup>(12)</sup> donde se muestra la expresión de las proteínas MSH2 y MSH6 debido al marcaje con el cromógeno café de los núcleos de las células tumorales y ausente marcaje nuclear en las proteínas MLH1, PMS2. Esto se traduce como un sistema de reparación deficiente y una IMS-H. También se muestra el control interno con el marcaje nuclear de las células inmunes peritumorales.



Marcaje realizado mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) dirigida a las proteínas reparadoras de errores del ADN (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2). Se muestran los núcleos positivos de las células tumorales mediante el marcaje por el cromógeno en color café las proteínas MSH-2 y MSH-6 (flechas rojas), así como el marcaje de los núcleos de linfocitos peritumorales como control interno de la técnica (flechas negras). Se nota la ausencia de expresión de marcaje en los núcleos de células tumorales para las proteínas MLH-1 y PMS-2 (flechas azules) y el marcaje positivo de los núcleos de linfocitos peritumorales como control interno de la técnica (flechas amarillas).

Imágenes obtenidas en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Quirúrgico “Hermandos Ameijeiras.”

**Fig.-** Microfotografía de corte histológico de colon transverso con diagnóstico de adenocarcinoma de colon.

## Discusión

Para interpretar este sistema de ventana debemos tener presente las siguientes premisas:

- 1- La asociación entre IMS y la lateralidad. Diferentes estudios ilustran que la localización del tumor hacia el colon derecho es un predictor con significado estadístico

de inestabilidad microsatelital con una sensibilidad del 70,4 % y una especificidad de 62,9 % con valores predictivos de IMS<sup>(7-9)</sup>. Esto concuerda con el resultado obtenido por el IHQ ya que la biopsia proviene de un paciente con adenocarcinoma de colon derecho y se puede observar la ausencia de marcaje en las glándulas colónicas de las proteínas producidas por los genes MLH1 y MSH2, lo cual da el diagnóstico de MSI-H.

2- Identificación de los fenotipos de IMS. El fenotipo de MSI-H está presente si dos o más de los 4 marcadores IHQ no se expresan en los núcleos tumorales. Por el contrario, es MSI-L si solo está ausente uno de los cuatro marcadores y se reporta estabilidad microsatelital si los 4 marcadores IHQ se encuentran expresados en los núcleos tumorales.<sup>(9)</sup> En nuestro caso no se expresó la proteína primaria MLH1 y cuando esto ocurre automáticamente se inhibe la expresión de su complemento PMS2, pues esta es la proteína secundaria del heterodímero. Esto, unido al hecho de detectar la expresión de las proteínas que forman el heterodímero MLH2-MSH6 nos indica que se trata sin dudas de un tumor de CCR esporádico de MSI-H. Es necesario tener en cuenta que de haber existido afectación en otra de las proteínas de MMR se haría imprescindible la determinación de la expresión de la proteína BRAF o la detección de la mutación V600F en dicho gen. Si esta mutación está presente esto confirmaría el carácter esporádico del tumor. Pero si no se detecta, entonces se plantea que se trata de un posible síndrome de Lynch, ya que los genes que codifican para las proteínas PMS2, MLH2 y MSH6 son genes que se encuentran en línea germinal.<sup>(5,10)</sup>

3- Determinación de MSS mediante prueba en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR). Si por el contrario las mutaciones en el MMR ocurrieron en los genes que codifican para las proteínas secundarias PMS2 y MSH6, entonces el sistema de IHQ detecta heterodímeros inestables o con pérdida de la función ya que estas proteínas pueden remplazarse por otras del sistema MMR. Por ejemplo, la proteína MSH6 puede sustituirse por MSH3 y PMS2 por MLH3 o PMS1. En ese caso son tumores de baja inestabilidad o estables (IMS-L o MSS, respectivamente), los cuales tienen un peor pronóstico. En estos casos se realizará la prueba PCR-TR que permitirá corroborar el resultado o encontrar el IMS que permita definir sus opciones de tratamiento.<sup>(10)</sup> La gran mayoría de los laboratorios utilizan un ensayo comercializado por la casa

comercial Promega, el cual está validado y demostrado su alta concordancia con el método de ventana de IHQ.<sup>(10,12)</sup>

Esta nueva clasificación de los tumores tiene importante repercusión en el tratamiento de los pacientes que padecen CCR, ya que los tumores que presentan inestabilidad microsatelital tienen una mayor respuesta al bloqueo de la proteína PD-L1. Es por ello que se considera recientemente la posibilidad de tratar pacientes con estrategias de inmunoterapia utilizando bloqueadores de PD-1MAB (pembrolizumab).<sup>(6)</sup>

La IHQ como método inicial para el diagnóstico de cáncer de colon tiene la ventaja de que es una técnica sencilla y accesible pero que necesita ser bien interpretada para identificar tumores con fenotipo mutador o encaminar el diagnóstico de síndrome de Lynch.<sup>(6)</sup>

## Conclusiones

El sistema Ventana Roche integra anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. Su correcta interpretación permite obtener una clasificación más certera del tumor de colon y sugiere o descarta la necesidad posterior de realizar pruebas genéticas.

## Referencias bibliográficas

1. Somarelli J, Gardner H, Cannataro V, Gunady E, Boddy A, Johnson N, *et al.* Molecular biology and evolution of cancer: from discovery to action. *Mol Biol Evol.* 2020;37(2):320-6. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msz242>
2. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(2):89-103. DOI: <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
3. Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in

- 185 countries. *Cancer J Clinicians.* 2021;71(3):209-49. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
4. Nehs I, Samar A, Suzan M, Eman M. Mismatch repair proteins and microsatellite instability in colorectal carcinoma (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) histopathological and immunohistochemical study. *Macedonian J Medical Sciences.* 2017;5(1). DOI: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.003>
5. Tieng F, Abu N, Lee L, Mutalib N. Microsatellite instability in colorectal cancer liquid biopsy-current updates on its potential in non-invasive detection, prognosis and as a predictive marker. *Diagnostics.* 2021;11(3):544. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030544>
6. Rodas O, Oregón E. Identificaciones del fenotipo de inestabilidad microsatelital en carcinoma colorrectal mediante el análisis de la expresión de proteínas reparadoras del ADN: revisión narrativa. *Ciencia, Tecnol Salud.* 2021;8(2). DOI: <https://doi.org/10.36829/63cts.v8i2.945>
7. Baracaldo R, Peña L, Gómez O, Polo F, López P, Parra R. Características histopatológicas del carcinoma colorrectal con inestabilidad microsatelital (IMS). *Fund Univ Cienc Salud.* 2020 [acceso: 20/02/2022];29(1):[aprox. 9p.]. Disponible en: <https://revistas.fucsalud.edu.co/index.php/repertorio/article/view/172>
8. Li K, Luo H, Huang L, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Internat.* 2020;20(1):16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1091-8>
9. Gian L, Lorena B, Cinzia A. Microsatellite instability in colorectal cáncer. *Acta Biomed.* 2018;89(9):[aprox. 5 p.]. DOI: <https://doi.org/10.23750/abm.v89i9-s.7960>
10. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg M, Singh N, Nottegar A, Bosse T, *et al.* Esmo recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with pd-1/pd-l1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Annals Oncology.* 2019;30(8):1232-43. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz116>
11. Provenzale D, Gupta S, Ahnen D, Bray T, Cannon J, Cooper G, *et al.* Genetic/familial high-risk assessment: colorectal version 1.2016, nccn clinical practice guidelines in



oncology. J National Comprehensive Cancer Network. 2016;14(8):1010-30. DOI: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2016.0108>

12. Roche Tissue Diagnostics. Our mission is to improve the lives of all patients afflicted with cancer. Roche Tissue Diagnostics. 2020 [acceso: 20/02/2022]. Disponible en: <https://diagnostics.roche.com/global/en/about/roche-tissue-diagnostics.html>

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.