

## ESTUDIO DE REORDENAMIENTOS INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN ADN TUMORAL

### El sistema de reparación del ADN por apareamiento erróneo (*mismatch repair*)

Las células humanas poseen múltiples sistemas complementarios capaces de reparar alteraciones del ADN, espontaneas o inducidas por agentes externos, así como errores producidos durante la replicación. La tasa de error intrínseca de las DNA polimerasas es del orden de 1 por cada  $10^4$ - $10^5$  nucleótidos incorporados. Sin embargo, gracias a estos sistemas, la tasa efectiva de mutación se reduce a 1 de cada  $10^9$  y  $10^{10}$  bases en cada división celular.

En concreto, el **sistema de reparación por apareamiento erróneo (*mismatch repair* o MMR)** se encarga de la reparación de errores pequeños de secuencia, de entre 1 y 4 pares de bases, producidos durante la replicación del DNA. Cuando, durante la copia de la hebra molde de DNA, se incorpora un nucleótido erróneo, se produce un error de apareamiento (*mismatch*) entre las hebras madre e hija. Este error provoca una alteración en la estructura de la doble hebra que puede ser reconocida y reparada por los enzimas del sistema MMR.

En humanos, los componentes principales del MMR son dos heterodímeros proteicos: MutS y MutL. El dímero MutS $\alpha$  está formado por el producto de los genes ***MSH2* y *MSH6***, y es capaz de reconocer los errores de apareamiento. MutL $\alpha$ , constituido por las proteínas codificadas por los genes ***MLH1* y *PMS2***, se une entonces al dímero MutS y recluta al resto de proteínas necesarias para la corrección del error: exonucleasa, DNA polimerasa y pinza replicativa, entre otras. El complejo es capaz de reconocer la hebra de DNA de nueva síntesis, eliminar varios nucleótidos consecutivos

# Catlab Informa

en torno al error y resintetizar de nuevo esta hebra, evitando de esta forma que se consolide la mutación.

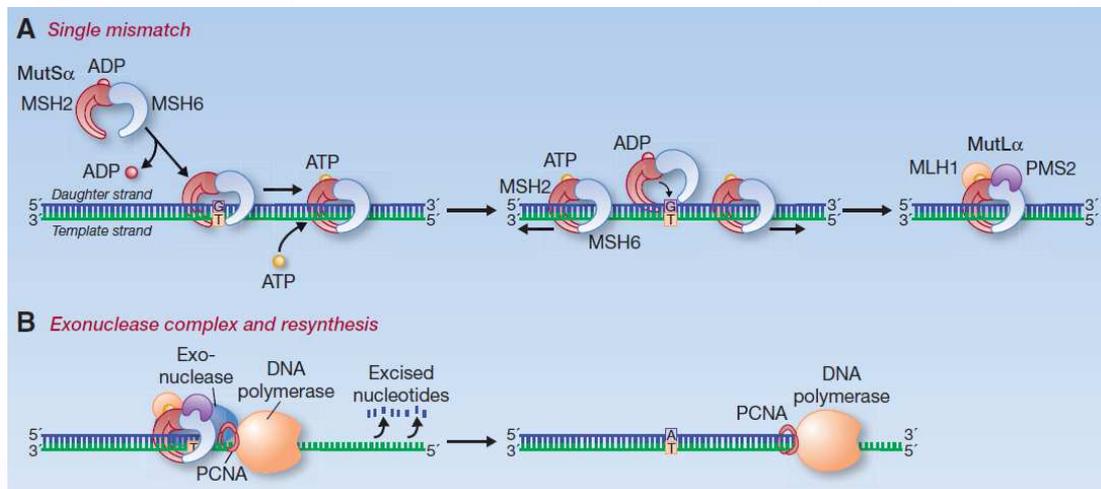


Figura 1. Representación esquemática del funcionamiento del sistema *mismatch repair* (de Sinicrope y Sargent, 2012).

Existen otros heterodímeros MutS y MutL diferentes, que participan en la reparación de apareamientos erróneos de mayor longitud y otros tipos de apareamientos erróneos.

## **Mismatch repair e inestabilidad de microsatélites (MSI)**

Los microsatélites son secuencias localizadas a lo largo de todo el genoma, constituidas por un número variable de repeticiones (de 5 a 50) de un motivo de 1 a 6 pares de bases (ej: TATATATATATATA...). Estas secuencias son particularmente propensas a errores durante la replicación, especialmente pequeñas inserciones y deleciones, debido a la formación de estructuras secundarias aberrantes y al deslizamiento de la polimerasa en estas regiones repetitivas.

En condiciones normales, el sistema MMR es capaz de reconocer y reparar estos errores. Sin embargo, si una célula tiene un defecto en el funcionamiento de este mecanismo de reparación (dMMR), será propensa a desarrollar mutaciones en estas secuencias repetitivas. A lo largo de múltiples ciclos de replicación,

# Catlab Informa

la población celular con el defecto acumulará variaciones en la longitud de secuencia de sus regiones microsatélite. Este fenómeno se conoce como **inestabilidad de microsatélites (MSI)**.

## Tumores con inestabilidad de microsatélites

En algunos tipos tumorales, especialmente cánceres colorrectales y de endometrio, la carcinogénesis es consecuencia de un defecto en el funcionamiento del sistema MMR, de forma que presentan inestabilidad de microsatélites a nivel genético.

Los microsatélites se encuentran repartidos por todo el genoma, incluso dentro de las secuencias codificantes de genes. A lo largo de la progresión neoplásica, se acumulan mutaciones, generalmente inactivantes, en estos genes, algunos de ellos implicados en la carcinogénesis.

Los tumores con inestabilidad de microsatélites forman un subgrupo diferente de otros tumorales. Por norma general, constituyen un tipo tumoral menos agresivo y de mejor pronóstico. Además, desarrollan un conjunto de interacciones particulares con el sistema inmune y tienen un comportamiento biológico único, lo que les hace susceptibles de ser tratados con toda una batería de nuevos fármacos.

## Causas moleculares de la inestabilidad de microsatélites y tumores hereditarios

En general, cualquier defecto de función permanente en alguno de los genes del sistema MMR puede dar como resultado un fenotipo MSI positivo. Estos defectos pueden darse como consecuencia de alteraciones a nivel somático o de mutaciones heredadas.

Los **defectos somáticos son los más frecuentes** y, en concreto, la causa más común es la **hipermetilación del de promotor gen *MLH1***. Esta alteración epigenética provoca la

---

# Catlab Informa

represión de la expresión de este gen y con ello el fallo en todo el mecanismo de reparación.

En un 20-30% de todos los tumores MSI positivos (alrededor de un **3% de todos los cánceres colorrectales**), el defecto en el sistema MMR es resultado de **mutaciones heredables** en alguno de los genes del sistema (*MLH1* y *MSH2*, y, más raramente, *MSH6* y *PMS2*). También se han descrito casos de alteraciones epigenéticas heredables en alguno de estos genes.

En cualquiera de los casos, estos defectos hereditarios en el sistema MMR son responsables de un trastorno genético autosómico dominante conocido como **síndrome de Lynch**. Los individuos que poseen una de estas mutaciones (o epimutaciones) tienen un elevado riesgo de desarrollar cáncer de colon no polipósico y otros tipos de cáncer, incluido endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, tracto hepatobiliar, tracto urinario superior, cerebro y piel.

## **Análisis de la MSI en la Unidad de Patología Molecular (servicio de anatomía patológica HUMT y área de genética de Catlab)**

En el servicio de Anatomía Patológica se realiza la fijación y preparación de la muestra tumoral, y el estudio de expresión de los genes del sistema MMR, mediante inmunohistoquímica. Posteriormente, el patólogo hace una selección de los cortes de parafina más adecuados para el estudio molecular, con la mayor representación posible de tejido tumoral, indispensable para alcanzar un rendimiento diagnóstico óptimo. Una vez seleccionada, la muestra se remite al laboratorio de Genética de Catlab, para el estudio de inestabilidad de microsatélites.

El análisis se basa en la evaluación de una serie de marcadores microsatélites cuasimonomórficos, esto es, que no poseen apenas variabilidad en su número de repeticiones a nivel poblacional.

Tras una extracción automatizada del DNA de la muestra parafinada de tejido tumoral, se realiza una amplificación por PCR de

# Catlab Informa

los microsatélites de interés. Para ello se utilizan como cebadores oligonuclótidos marcados fluorescentemente, flanqueantes a las secuencias microsatélite.

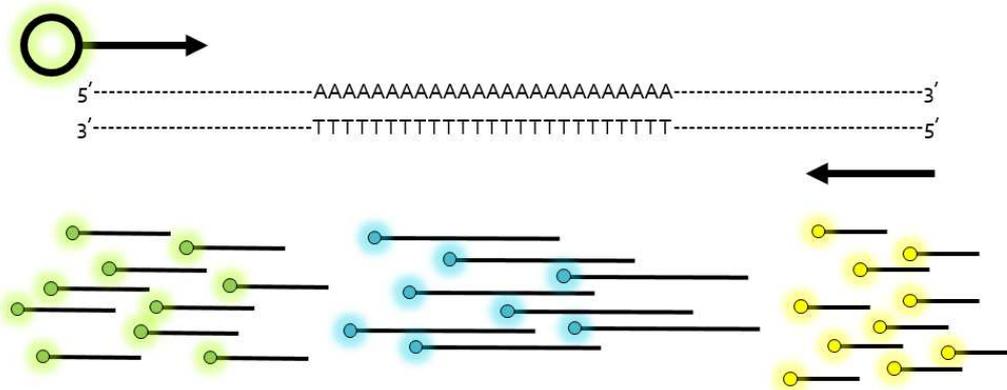


Figura 2. Esquema del diseño de cebadores para la PCR de MSI i de los productos obtenidos. Las flechas negras representan los cebadores de la reacción. En colores verde, azul y amarillo se esquematizan los diferentes fluorocromos.

Como producto de esta reacción se obtienen millones de copias de cada microsatélite, cada una con un tamaño que dependerá del número de repeticiones del motivo repetitivo en el DNA amplificado.

Este producto de reacción se somete a electroforesis capilar en un secuenciador automático, capaz de separar estos fragmentos por tamaño y mostrar el resultado de la separación en un electroferograma (Figura 3).

Idealmente, cuando no existe inestabilidad de microsatélites, cada uno de los 5 marcadores se observa como una *montaña* del color del fluorocromo usado en la amplificación, formada por un pico principal y varios picos secundarios flanqueándolo (ver Figura 3, arriba), que son resultado inserciones y deleciones producidas *in vitro* por el deslizamiento de la DNA polimerasa. En el electroferograma, cada marcador se puede identificar por su color y por el rango de tamaños en el que se localiza.

Para valorar la inestabilidad de microsatélites en una muestra tumoral, el patrón de picos observado se compara con el de un

# Catlab Informa

control estable, idealmente un DNA de sangre periférica del mismo paciente.

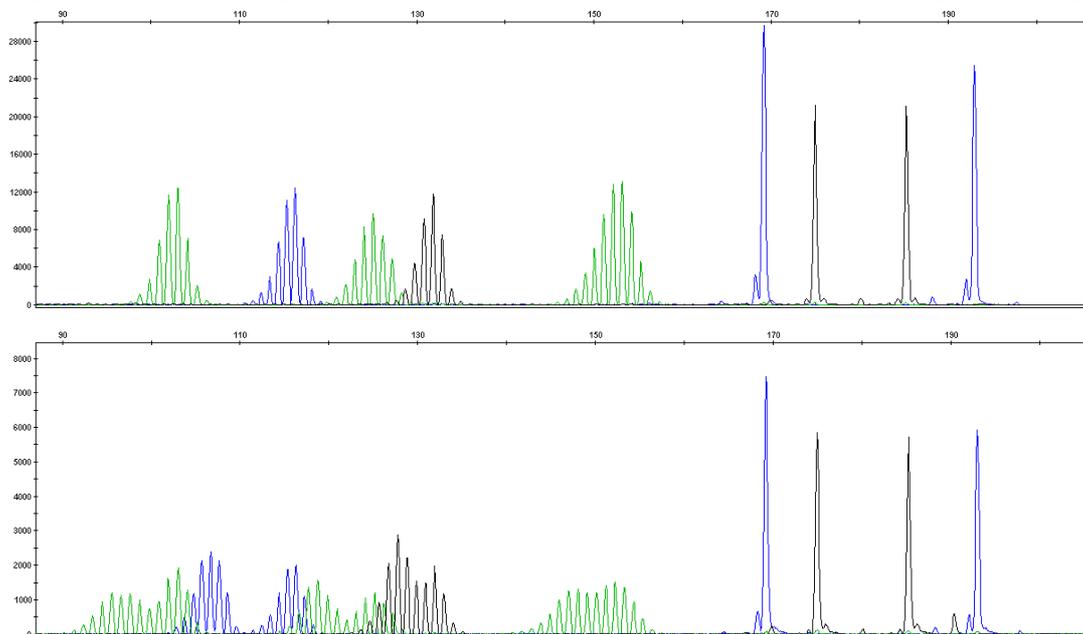


Figura 3. Comparativa de muestra de tumor de colon MSI positivo (abajo) con muestra de sangre del mismo paciente (arriba) como control estable. A la izquierda, en cada imagen, los 5 marcadores microsatélites analizados. Los cuatro picos de la derecha corresponden a marcadores polimórficos, empleados como control de calidad y de emparejamiento de muestras un mismo paciente.

Para cada microsatélite se evalúa la inestabilidad individualmente. Un microsatélite se considera inestable cuando se produce una distorsión en la forma de la *montaña* de picos, con formas no simétricas o aparición de picos principales adicionales, flanqueados por picos secundarios menores. Un tumor se considera MSI positivo, cuando se observa inestabilidad en al menos dos de los cinco (40 %) marcadores analizados.

Finalmente se emite un informe integrado firmado por los facultativos de anatomía patológica y de genética.

# Catlab Informa

## **Bibliografía**

1. Li G-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. Cell Research. 2008;18(1):14.
2. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular Pathways: Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Prognostic, Predictive, and Therapeutic Implications. Clinical Cancer Research. 15 de marzo de 2012;18(6):1506-12.
3. Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee, Hegde M, Ferber M, Mao R, Samowitz W, Ganguly A. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis and MYH-associated polyposis). Genetics in Medicine. enero de 2014;16(1):101-16.
4. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. Archives of Toxicology. junio de 2015;89(6):899-921.
5. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park W-Y, Kim T-M, Park PJ. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. Nat Commun [Internet]. 6 de junio de 2017 [citado 11 de julio de 2019];8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5467167/>
6. Kunitomi H, Banno K, Yanokura M, Takeda T, Iijima M, Nakamura K, et al. New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer. Oncology Letters. septiembre de 2017;14(3):3297-301.
7. Yan L, Zhang W. Precision medicine becomes reality—tumor type-agnostic therapy. Cancer Communications. 31 de marzo de 2018;38(1):6.

### **Carlos Lombardía**

Genética / Citometría

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35018, 35044, 35041

[clombardia@catlab.cat](mailto:clombardia@catlab.cat)

[www.catlab.cat](http://www.catlab.cat)

---