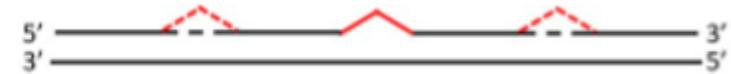
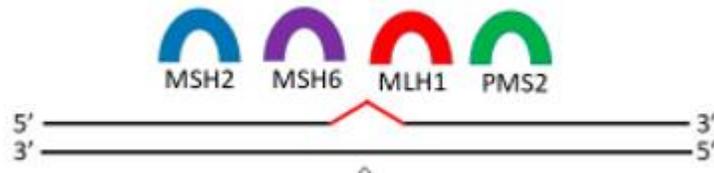


DE HETERODIMEROS DEL SISTEMA DE REPARACIÓN DEL ADN, INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITE Y DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE COLON .

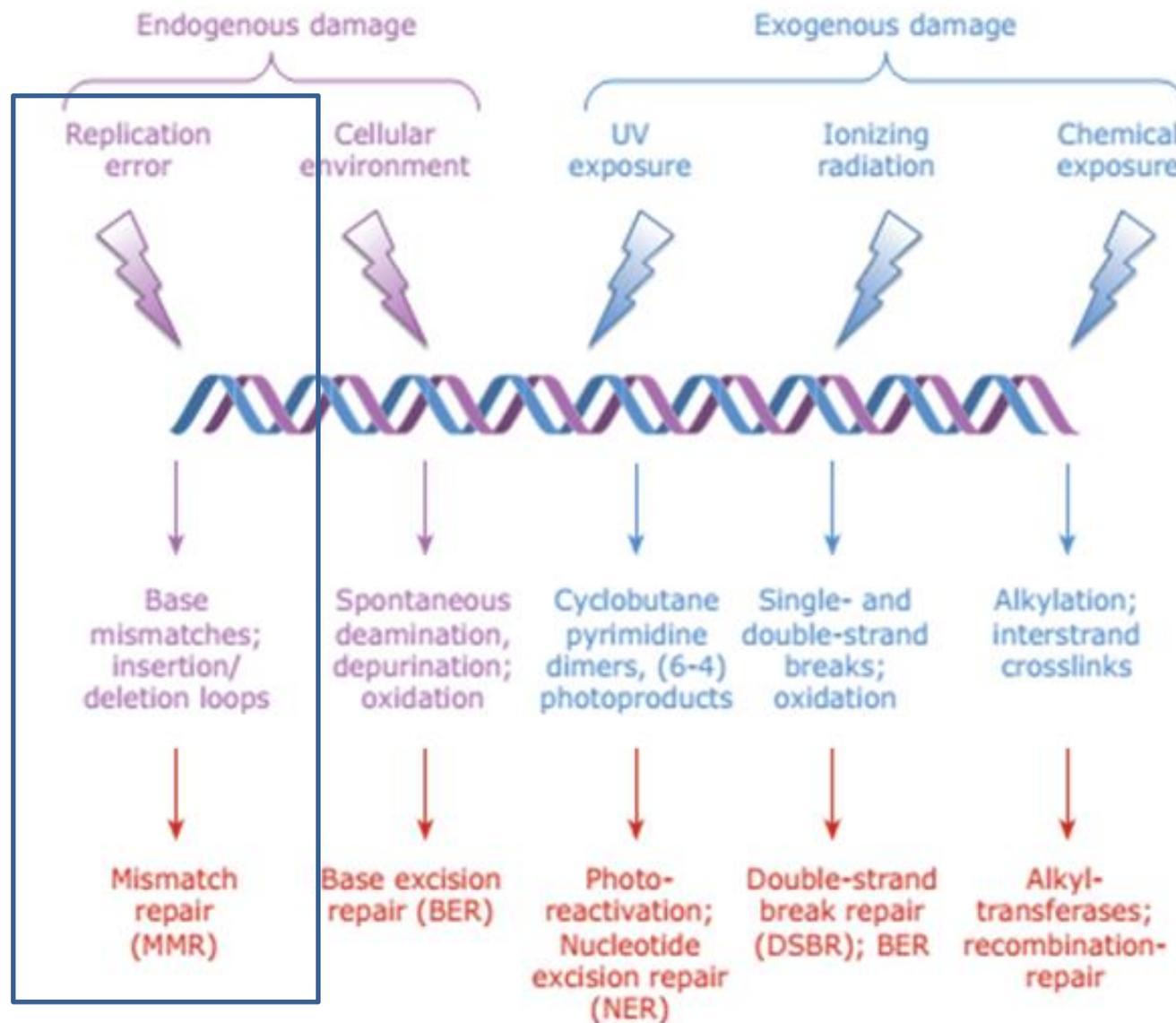


DrC Gissel García Menéndez

Dpto Anatomía Patológica

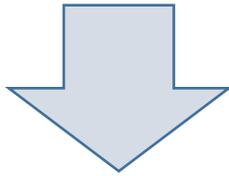
Hospital C.Q Hermanos Ameijeiras

El ADN está sujeto a daño



El ADN es reparado por sistemas moleculares especializados

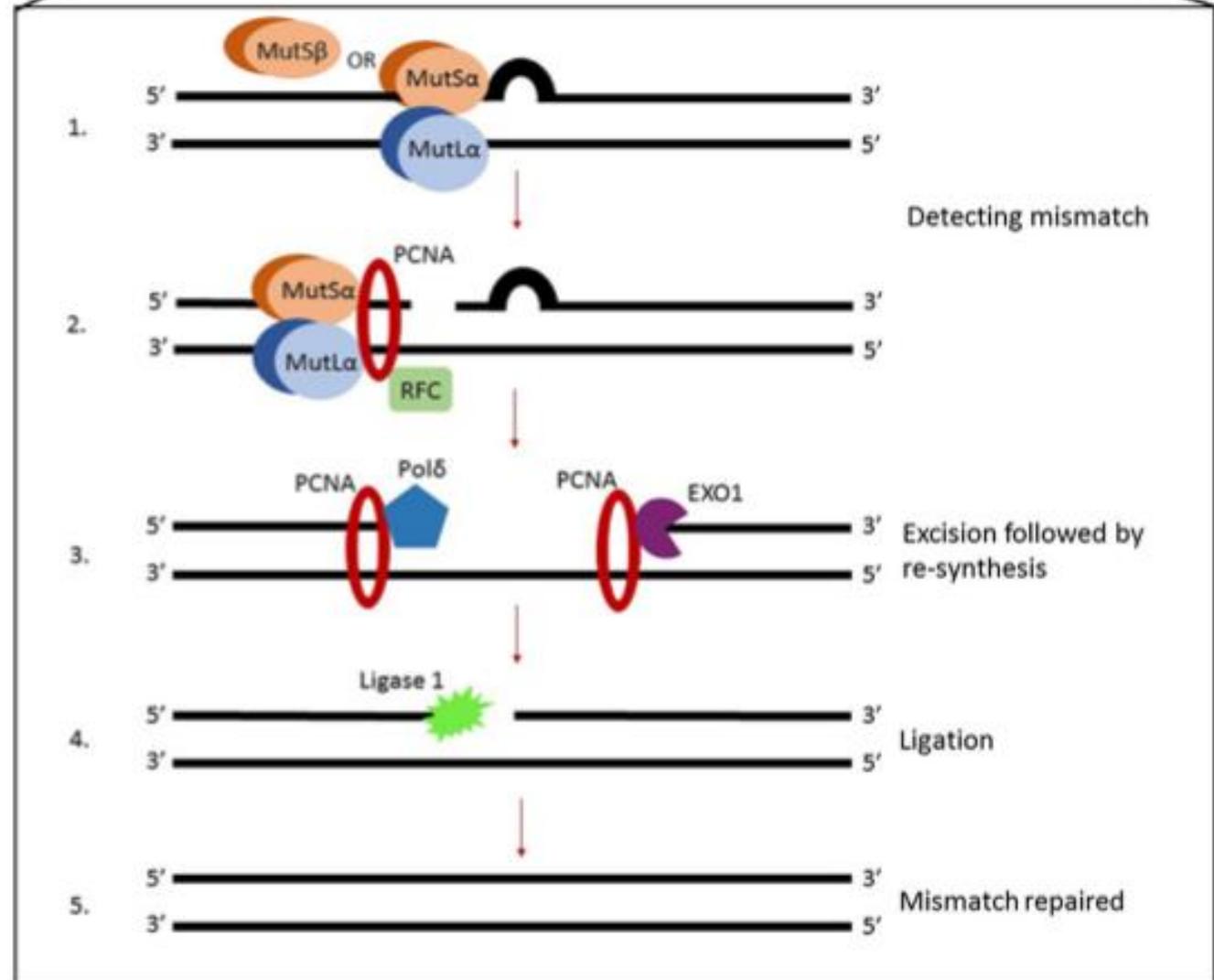
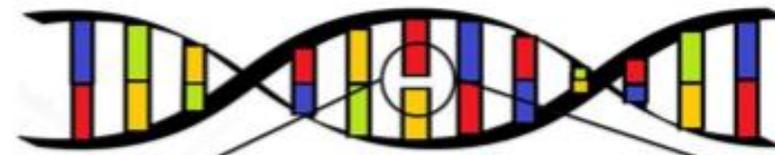
Estabilidad del genoma



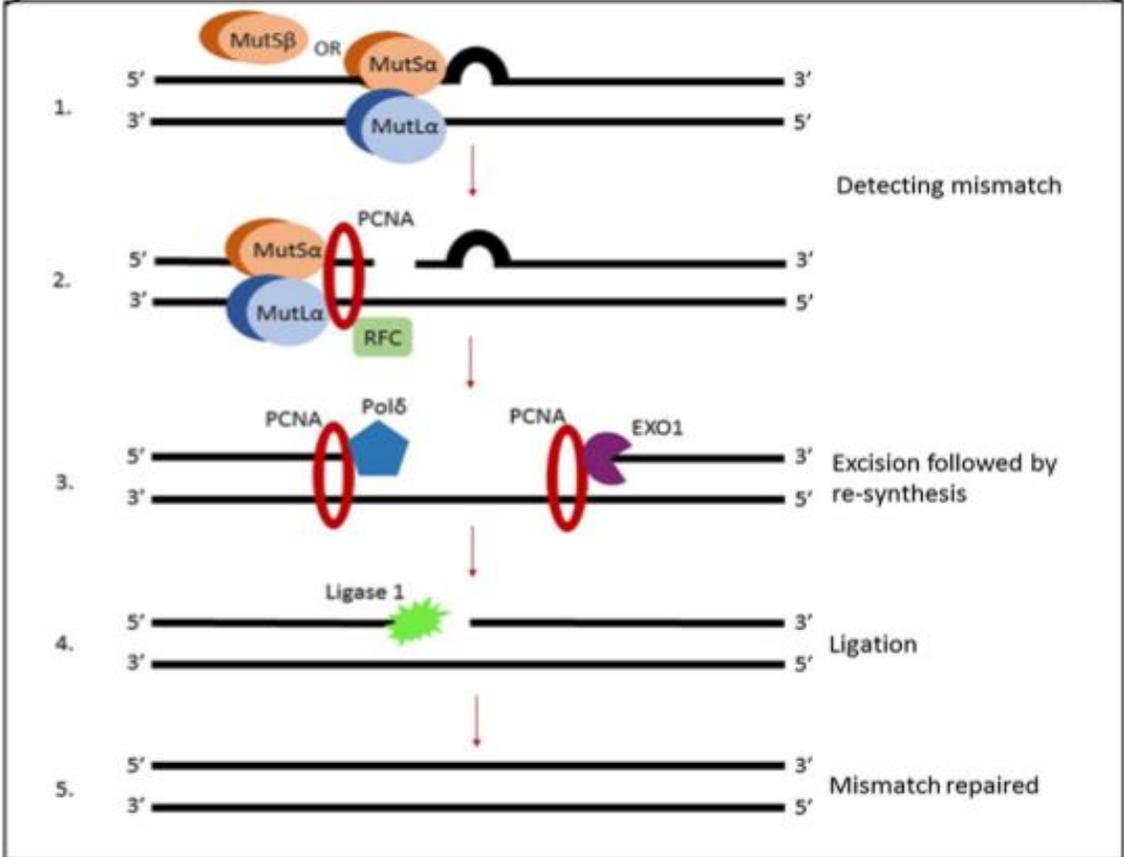
SISTEMA DE REPARACIÓN
DE COMPLEMENTARIEDAD
DE BASES

MMR

(Mismatch repair system)



MRR en E.Coli y su homología en el humano



Proteínas en E.coli
implicadas en
mecanismo de MMR
(1 gen= 1 proteína)

**MutS,
MutL,
MutH,
uvrD (ultraviolet
repair protein D)**

**Proteínas homólogas en
humanos implicadas en
mecanismo de MMR
(MSH y MLH/PMS)
Complejo de 8 genes**

MutS → Complejo MSH
MutL → Complejo MLH

Genes humanos homólogos a genes de E.coli

MutS Homolog **X** o hMSHX
MutL Homolog **X** o hMLHX

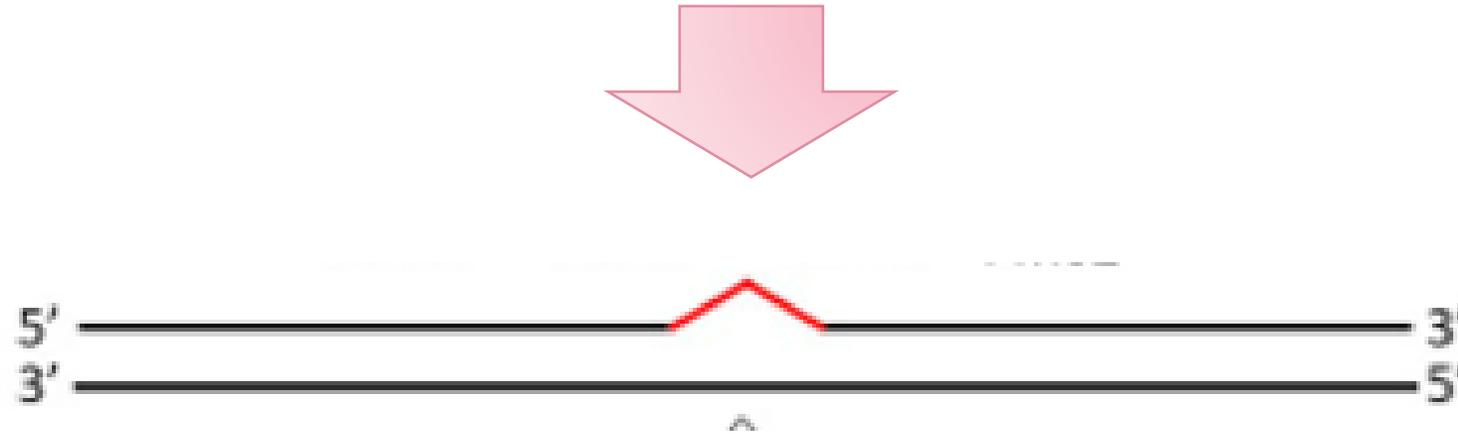
Genes en E.Coli

Genes en Humanos

MutS → hMSH2, hMSH3, hMSH5, hMSH6

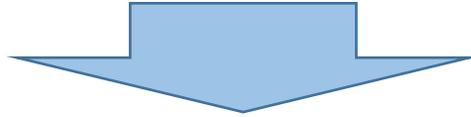
MutL → hMLH1, hPMS1 (hMLH2),
hMLH3, hPMS2 (hMLH4)

REGIONES DE MICROSATELLITES (MS) = REGIONES DE MISMATCH

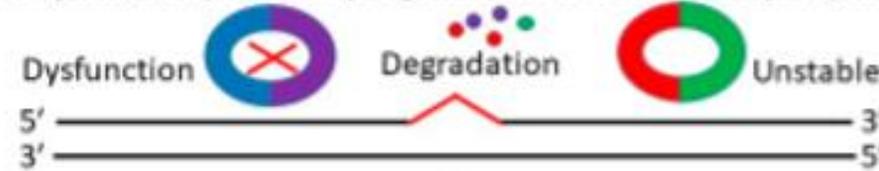


Los MS constituyen una huella en el ADN de cada persona. Son altamente variables y su polimorfismo constituye un marcador genético

Pérdidas de las funciones o pérdida de la expresión de las **proteínas** reparadoras del daño MMR



b. Dysfunction/unstable/degradation of mismatch repair (MMR)



c. Formation of microsatellite instability (MSI)

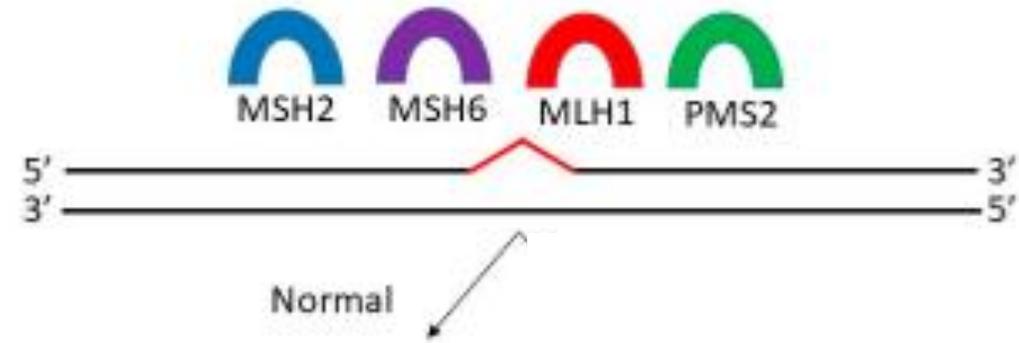
High frameshift mutations frequency in microsatellite DNA



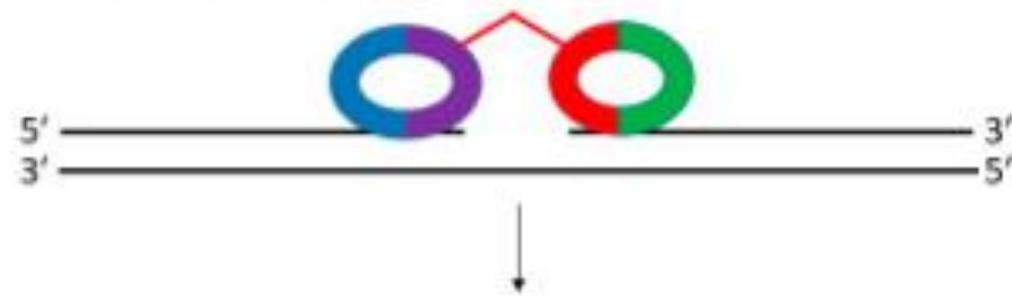
Mecanismos de Inestabilidad de Microsatélites (MSI)

CÁNCER Y SU RELACION CON MSI

A. Identification of DNA mismatch error



B. Excision of DNA mismatch error



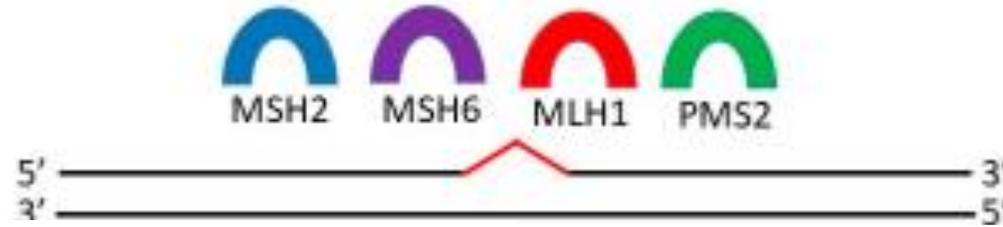
C. Repair/re-synthesis



Afectaciones usuales en los genes que codifican para diversas proteínas son reparadas por MMR

Afectaciones en los genes que codifican para las proteínas del MMR. ¿Qué ocurre?

A. Identification of DNA mismatch error



Mutaciones que ocurren en la célula normal



Incrementa el número de mutaciones

- Inestabilidad genética

(“Hipótesis del gen mutador.”) (Fishel, 2015).

OncoTargets and Therapy 2021:14 1937–1951

c. Formation of microsatellite instability (MSI)

High frameshift mutations frequency in microsatellite DNA



- Son mas frecuentes en regiones no codificantes del genoma.
- Pueden ser de **mono** (poseen mayor frecuencia de IMS) , di o tetranucleótidos

Aberraciones en el gen

MSH3 se asocian con:

- ✓ Cáncer colorectal
- ✓ Cáncer de vejiga
- ✓ Cáncer de endometrio
- ✓ Cáncer hereditario colorectal no polipósico tipo 7 (HNPCC7)
- ✓ Glioma de bajo grado

(Kawakami et al., 2004; Yamamoto and Imai, 2015).
(Duraturo et al., 2016; Valle et al., 2019).

Variantes patogénicas de

MSH6 se asocian a :

- ✓ Síndrome de Lynch tipo 5
- ✓ Cáncer de endometrio
- ✓ Cáncer de colon y recto

(Poulogiannis et al., 2010; Rosenthal et al., 2020).

Mutaciones que inactivan el gen **hMLH1** (**PMS1**)

- ✓ Syndrome Lynch tipo 3

(Deng et al., 2002).

En dependencia de la cantidad de MS que revelan la MSI en el tumor con respecto al ADN constitutivo del paciente, la IMS se clasifica en:

(BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346, D17S250)

Panel de referencia Bethesda (1997)

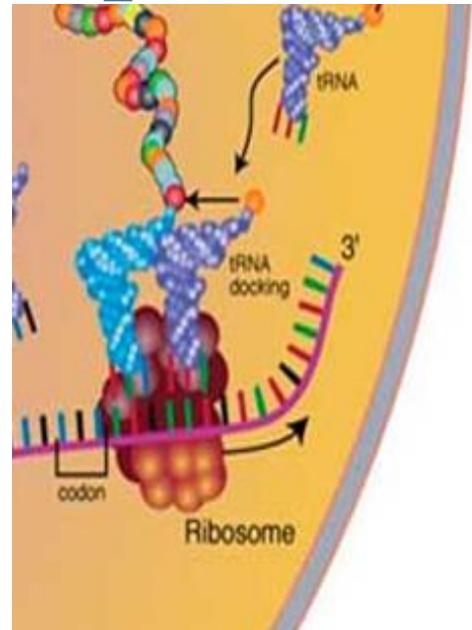
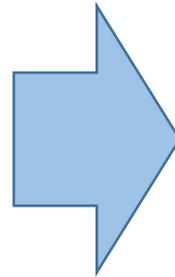
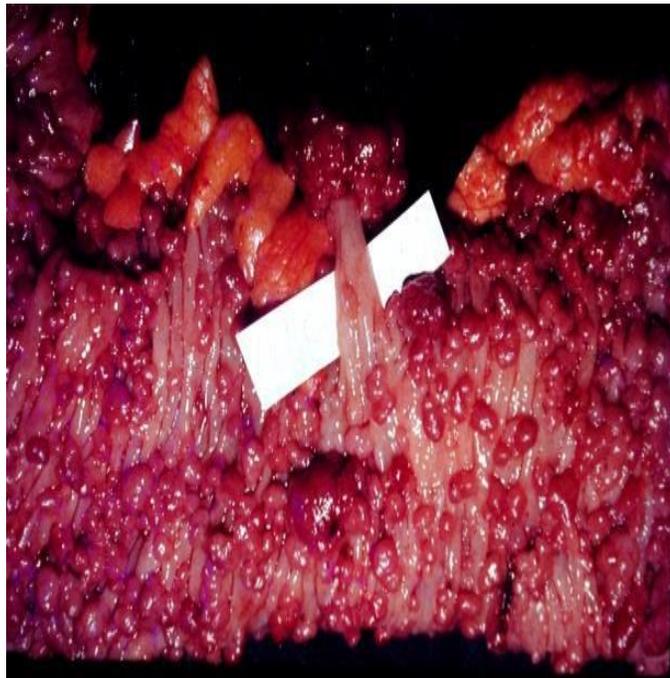


Mayor supervivencia

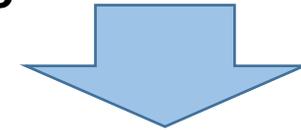
- ❑ Esta categorías permiten pronosticar el comportamiento del tumor. (Zhou et al., 1997; Brennetot et al., 2005; Watson et al., 2014., Yamamoto and Imai, 2015).
- ❑ Se sugiere que MSI-L deben incluirse como MSS (Kim TM, Laird PW, Park PJ.. Cell 2013. ; Hause RJ, et al. Nat Med 2016; Annals of Oncology, 2019 doi:10.1093/annonc/mdz116)

Alta (MSI-H) = Mayor supervivencia ➔ Paradoja?

Células cancerosas MSI-H



Alto número de agregados de proteínas mutadas y truncadas de todo tipo



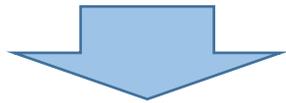
“Despierta” el reconocimiento y respuesta del SI



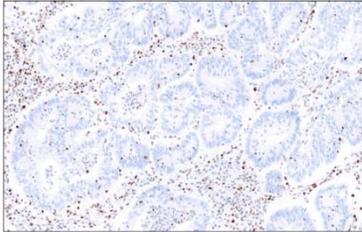
Progresión lenta del tumor

¿Cómo determinar la pérdida de expresión de proteínas MMR y la MSI?

Método diagnóstico de rutina para determinar la pérdida de expresión de proteínas de MMR



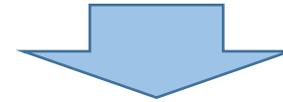
IHQ



VENTANA MMR IHC Panel
Interpretation Guide for Staining of Colorectal Tissue

VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

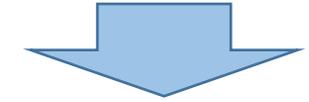
Método diagnóstico para determinar MSI



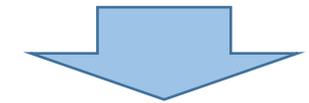
PCR-TR

Markers BAT25, BAT26, NR21, NR24 and MONO-27 Promega 'pentaplex assay' version 1.2 kit (Promega)

Berg KD, Glaser CL, Thompson RE, Hamilton SR, Griffin CA, Eshleman JR. Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.* 2000; 2; 20-28



NGS BLANCO



1. Mayor velocidad de análisis
2. Detección en paralelo del mismatch y su impacto en toda la carga mutacional del tumor

Nowak et al., 2017; Zhu et al., 2018; Kim et al., 2019; Pang et al., 2019; Yamamoto and Imai, 2019; Rosenthal et al., 2020

Mutaciones en genes que codifican para proteínas primarias del heterodímero

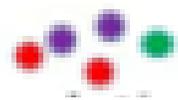


Mutación en gen que codifica para **MLH1**

Mutación en gen que codifica para **MSH2**

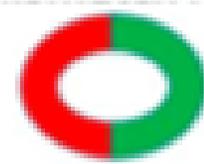
Se asocia en IHQ con la pérdida de

Se asocia en IHQ con la pérdida de



Degradación de los heterodímeros

Mutaciones en genes que codifican para proteínas secundaria del heterodímero



Heterodímero inestable



Pérdida Función

Sustitución de proteína secundaria por otra ej, MSH6 por MSH3
PMS2 por MLH3 o PMS1

Resultado indeterminado

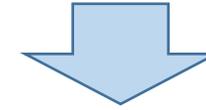
Se pueden obtener resultados indeterminados en la IHQ y no se refleja el estatus real de la maquinaria MMR



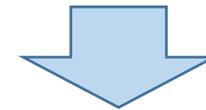
Razones Técnicas



- Falsos negativos debido a la preanalítica ej, fijación del tejido.
- Teñimiento aberrante en citoplasma o perinuclear.
- Se necesita la presencia de un control positivo interno como mucosa normal, linfocitos o células del estroma para la interpretación de los resultados (mandatorio).



Razones Biológicas



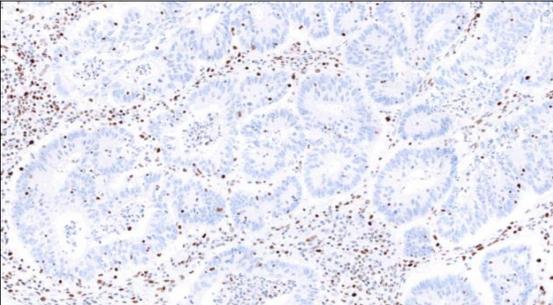
- La inmuno detección puede ser positiva y no reflejar la deficiencia del sistema MMR pues **MLH1 Y MHS2** pueden formar heterodímeros con otras proteínas como **MSH3, MLH3 Y PMS1**. (MSH3 reemplaza MSH6, MLH3 o PMS1 reemplazan a PMS2).
- Mutaciones sin sentido en cualquier gen que codifique para el sistema MMR puede resultar en una proteína catalíticamente inactiva pero antigénicamente intacta.

¿Cómo se analiza la afectación de las proteínas MMR que indican IMS?



VENTANA MMR IHC Panel
Interpretation Guide for Staining of Colorectal Tissue

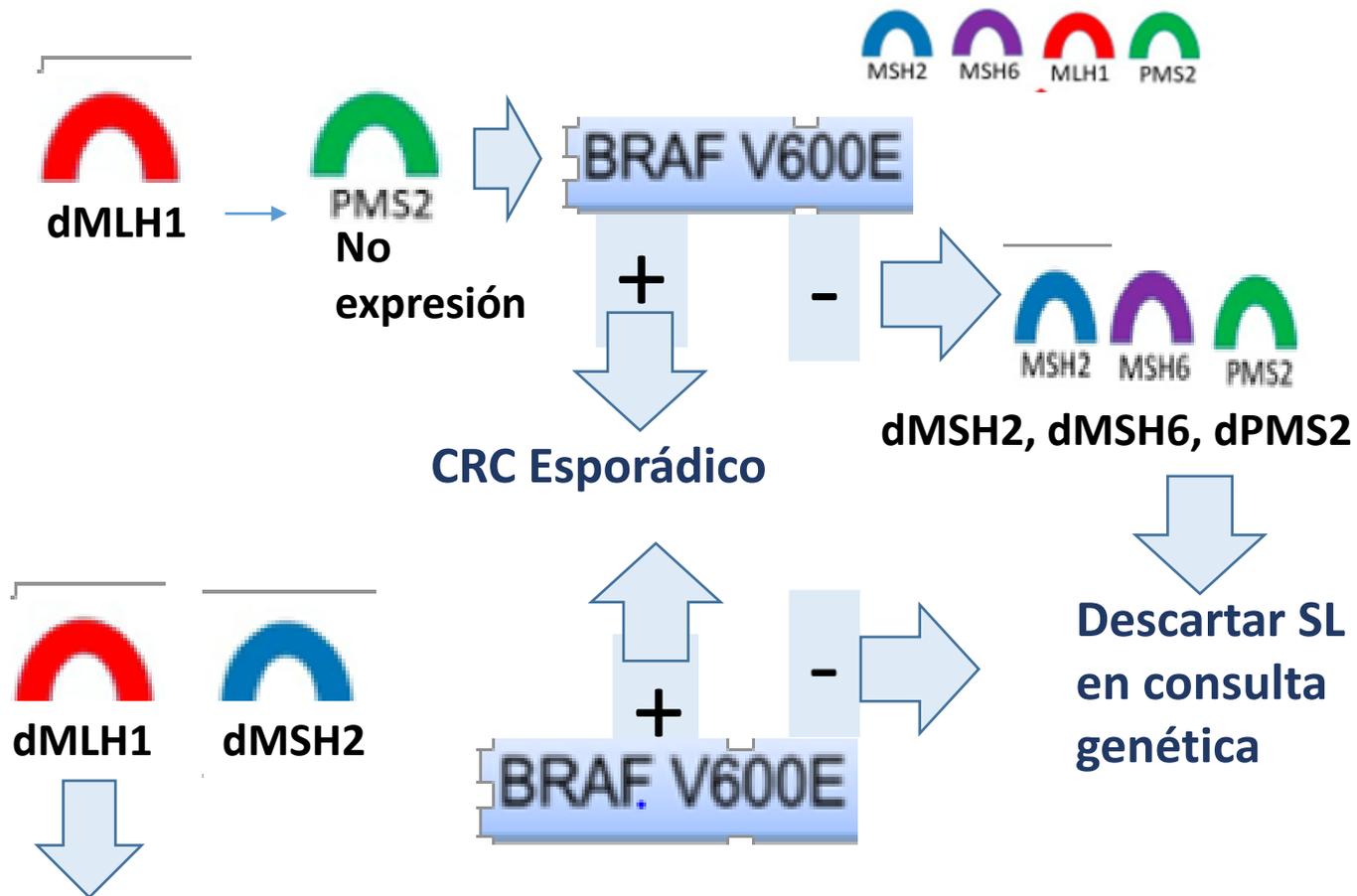
VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody



El panel ventana MMR IHQ permite detectar las proteínas del sistema de reparación del ADN (MMR)

(MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) y BRAF V600E

Afectación de proteínas reparadoras



Se asume que dMLH1 es por met promotor de manera esporádica

TUMORES CON MSI

- ❑ Tumores **MSI** tienden a ocurrir en estadios tempranos y son de bajo rango de recurrencia comparados con los MSS
- ❑ No se benefician de la quimioterapia adyuvante basada en fluorouracilo en estados de CC II o III.
- ❑ **Estatus de MSI es reconocido como biomarcador para terapia inhibición inmune**

Prevalencia de alta MSI (MSI-H) en diferentes tumores

TIPO DE TUMOR	% MSI-H
Uterine corpus endometrial carcinoma	31.37%
colon adenocarcinoma	19.72%
stomach adenocarcinoma	19.09%
rectal adenocarcinoma	5.73%
adrenocortical carcinoma	4.35%
uterine carcinosarcoma	3.51%
cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma,	2.62%
pediatric high-risk Wilms tumor	2.44%
mesothelioma	2.41%
esophageal carcinoma	1.63%
breast carcinoma	1.53%
kidney renal clear cell carcinoma	1.47%
ovarian serous cystadenocarcinoma	1.37%

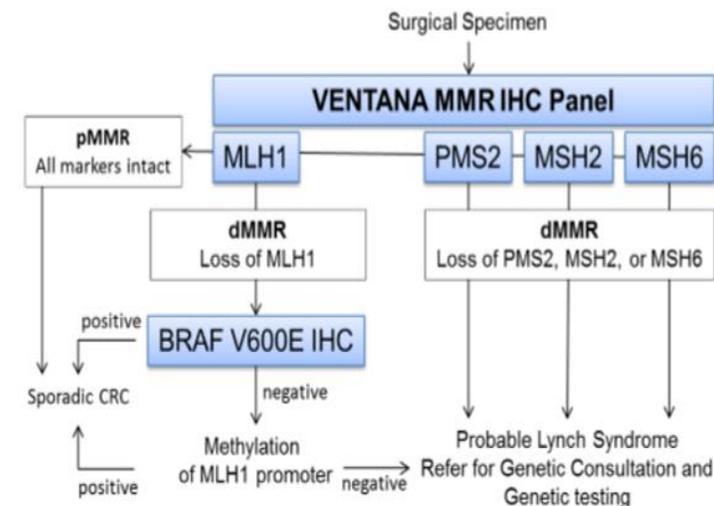
Guías clínicas actuales recomiendan la determinación de MSI en cáncer colorectal y de endometrio (Bonneville et al., 2017)

SPECIAL ARTICLE

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

European Society for Medical Oncology (ESMO)

1- IHQ para detección de MMR



2- Detección de MSI

PCR TR (Pentaplex assay' version 1.2 kit (Promega))

NGS que acople MMR y MSI

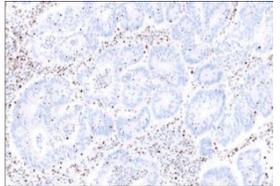
3- Detección de la expresión de PD1/PDL1 por IHQ.

4- Detección de la expresión de HER2, NTRK en no respondedores (MSS)

Nuestras Condiciones

Tenemos

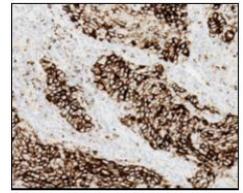
 

VENTANA MMR IHC Panel 

Interpretation Guide for Staining of Colorectal Tissue

VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody
VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay 

REF 741-4860
08008540001

IVD  50

HER-2/neu PATHWAY

VENTANA HER2 Dual ISH DNA
Probe Cocktail (30 tests)

No Tenemos



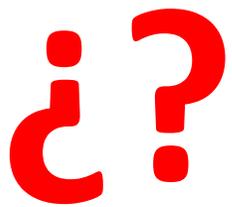
Podemos

Diagnosticar MSI-H
por IHQ

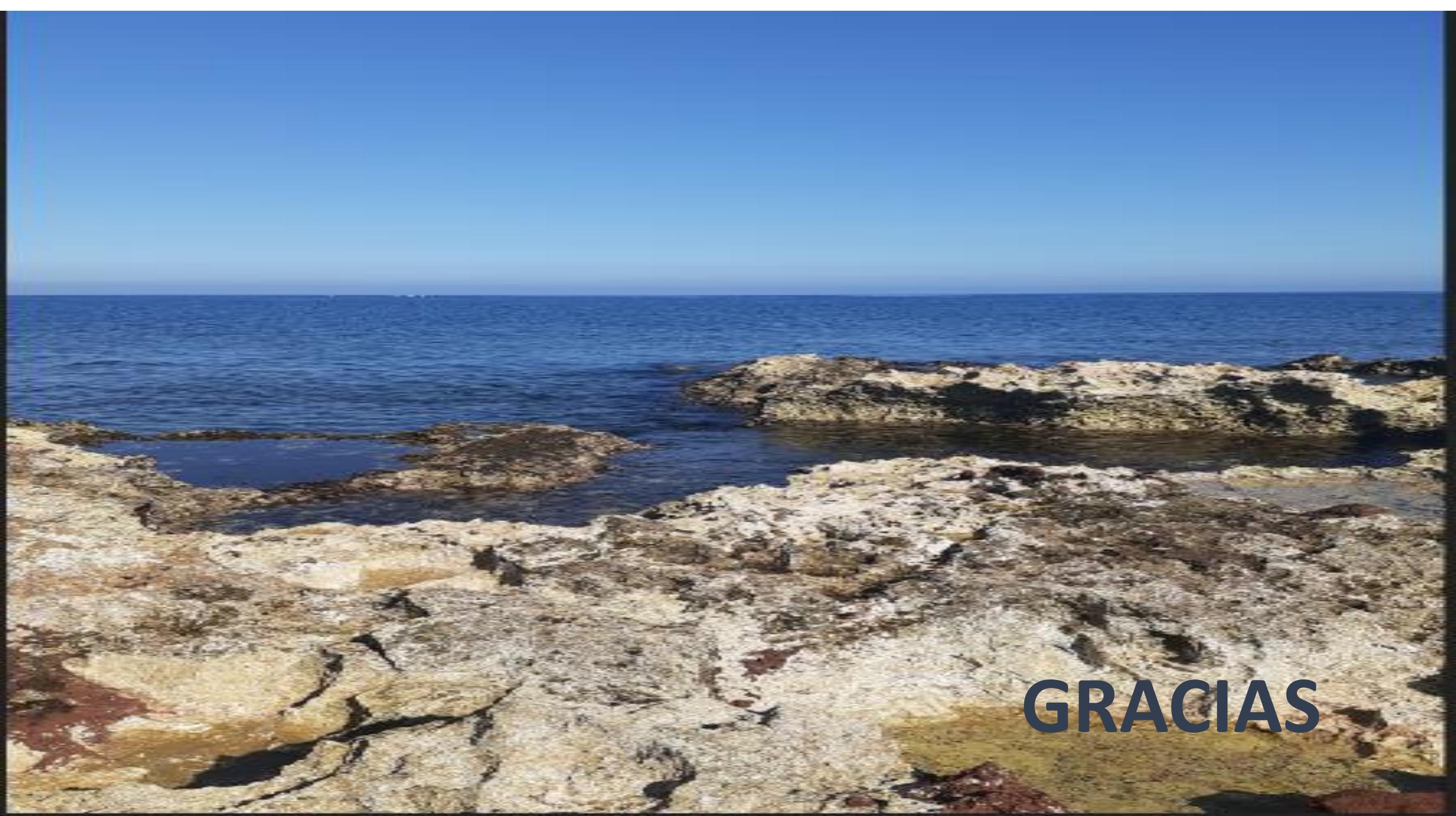
Trabajamos en crear el
sistema diagnóstico
para detectar MSI y
completar el
diagnóstico.

Conclusión

- ✓ La detección de la afectación del sistema MMR constituyen una sensible herramienta diagnóstica que permite evaluar el riesgo de cáncer, pronosticar y llegar al tratamiento de inmunoterapia en muchos casos que padecen CRC.



¿Siempre que hay un tumor de colon se aplica la detección de MMR?



GRACIAS