

Screeningul imunohistochimic al mutațiilor genelor hMLH1 respectiv hMSH2 la pacienții diagnosticați cu cancer colorectal și suspiciune de instabilitate microsatelitară

F. Mureșan¹, R. Simescu¹, I. Domșa², R. Buiga³, M. Cazacu¹

¹Clinica Chirurgie IV, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, România

²Departamentul de Anatomie Patologică, Spitalul Clinic CF Cluj-Napoca, România

³S.C. Santomar Oncodiagnostic S.R.L, Cluj-Napoca, România

Rezumat

Scopul studiului: screeningul imunohistochimic al mutațiilor genelor hMLH1, respectiv hMSH2 la pacienții cu cancer colorectal susceptibile de instabilitate microsatelitară, diagnosticate în intervalul ianuarie 2002-decembrie 2009 în Clinica Chirurgie IV a Spitalului Clinic C.F. Cluj-Napoca (studiu prospectiv non- randomizat).

Material și metodă: criteriile de includere au fost diagnosticul histopatologic de adenocarcinom și satisfacerea a minim unul dintre criteriile Bethesda revizuite pentru testarea genetică a instabilității microsateliților în tumorile maligne colorectale. 110 pacienți eligibili au fost subîmpărțiți în două grupuri, în funcție de numărul de criterii Bethesda îndeplinite (grupul A - un criteriu, respectiv grupul B - două sau mai multe criterii). Grupurile au fost comparate statistic sub aspectul parametrilor clinico-patologici specifici sindroamelor Lynch. Pentru toți pacienții au fost efectuate colorații imunohistochimice pentru analizarea expresiei genelor hMLH1, respectiv hMSH2 la nivelul epiteliului tumoral.

Rezultate: vârsta, prezența antecedentelor familiale de cancer colorectal și localizarea pe hemicolonul drept au fost parametrii la care s-au constatat diferențe semnificative statistic între grupurile analizate. Colorațiile imunohistochimice au relevat lipsa expresiei genei hMLH1 la 9 pacienți, respectiv a genei hMSH2 la 4 pacienți.

Concluzii: Imunohistochimia permite identificarea pacienților care trebuie testați genetic pentru obiectivarea mutațiilor la nivelul genelor reparatoare ale ADN și stabilirea diagnosticului de sindrom Lynch.

Cuvinte cheie: imunohistochimie, cancer colorectal, instabilitate microsatelitară, sindrom Lynch

Abstract

Immunohistochemical screening of hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients diagnosed with colorectal cancer and microsatellite instability suspicion

Study aim: immunohistochemical screening of hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients diagnosed with colorectal cancers, suspected of having microsatellite instability, as diagnosed between January 2002 and December 2009 in the Surgery Department of the CF Clinical Hospital Cluj-Napoca (prospective non-randomised study).

Methods: inclusion criteria were adenocarcinoma pathology finding and also minimum one of the revised Bethesda criteria for genetic testing of microsatellite instability in colorectal cancers. 110 eligible patients were divided in 2 study groups according to the number of Bethesda criteria met (group A - 1 criteria; group B - 2 or more criteria). Both groups were statistically compared considering the clinical and pathological parameters specific to the Lynch syndrome. We performed immunohistochemical staining to determine the expression of hMLH1 and hMSH2 genes in the tumors of all the patients.

Correspondență: Asist. Univ. Dr. Flaviu Mureșan
Clinica Chirurgie IV, Spitalul Clinic CF
400015, Str. Republicii, nr. 18, Cluj-Napoca, România
E-mail: m_flaviu1977@yahoo.com

Results: we found the differences in age, colorectal family history and right colon tumor site between the two groups to be statistically significant. Immunohistochemical stainings showed lack of hMLH1 gene expression in 9 patients and of hMSH2 gene in 4 patients respectively.

Conclusions: Immunohistochemical staining can identify patients who need to be genetically tested for mutations of the DNA mismatch repair genes, in order to establish the correct diagnostic of Lynch syndrome.

Key words: immunohistochemistry, colorectal cancer, microsatellite instability, Lynch syndrome

Introducere

Circa 10-15% din carcinoamele colorectale sporadice și 90-95% din cancerele colorectale ereditare nonpolipozice (cunoscute sub termenul HNPCC – Hereditary NonPolypsis Colorectal Cancer – sau mai corect sub denumirea de sindrom Lynch) apar ca urmare a instabilității microsateliților - secvențe repetitive de mici dimensiuni din structura ADN. Instabilitatea microsateliților este caracterizată prin acumularea - în cursul replicării ADN - a unor mutații genetice succesive în structura acestora, erori care sunt corectate în condiții obișnuite de genele de reparare ale împerecherilor nepotrivite de baze azotate (MMR-MisMatchRepair) (1,2,3,4,5,6). Apărut consecutiv inactivării prin mutații (transmise autosomal dominant în sindromul Lynch, ori survenite sporadic) ale genelor reparatoare ale ADN, fenomenul de instabilitate microsatelitară este responsabil de acumularea rapidă a unor mutații somatice la nivelul unor oncogene, respectiv gene supresoare tumorale cu rol fundamental în procesul de inițiere și progresiune tumorală.

La ora actuală se cunosc următoarele gene implicate în repararea împerecherilor nepotrivite de baze azotate: hMLH1 (human mutator L homolog 1), hMLH3 (human mutator L homolog 3), hMSH2 (human mutator S homolog 2), hMSH3 (human mutator S homolog 3), GTBP (guanine/thymidine mismatch-binding protein) /hMSH6 (human mutator S homolog 6), hPMS1 (human postmeiotic segregation increased 1), hPMS2 (human postmeiotic segregation increased 2). S-au evidențiat de asemenea numeroase copii ale unor gene PMS2 like (notate PMS2 L1-L14 sau PMS3-8), care aparțin familiei genelor reparatoare ale ADN.

În majoritatea cazurilor de sindrom Lynch (circa 90%), mutațiile afectează genele hMLH1 sau hMLH2. Mutația genei hMSH6 se întâlnește în circa 7-10% din cazurile de sindrom Lynch, iar mutațiile genelor hPMS1 și hPMS2 apar la sub 5% din cazuri.

În circa 15% dintre cancerele colorectale sporadice (cu precădere în tumorile cu localizare la nivel proximal pe colon) se poate constata instabilitatea microsateliților fără a exista mutații la nivelul celulelor germinale. În aceste situații s-a constatat metilarea bialelică a fragmentelor de citozină (Cp) de la nivelul secvenței promotor a genei hMLH1 (regiune bogată

în citozină și guanină – CpG), modificare epigenetică generatoare a deficienței mecanismelor reparatoare.

În 1996 a fost elaborat un set de criterii clinice și anatomo-patologice cu scopul selecției pacienților cu cancer colorectal în vederea testării genetice pentru fenomenul de instabilitate microsatelitară și anume criteriile Bethesda, revizuite ulterior în 2004 (7).

Instabilitatea microsatelitară poate fi obiectivată prin testare genetică. Pe de altă parte colorațiile imunohistochemice decelează lipsa expresiei unei gene reparatoare a ADN, a cărei mutație determină instabilitatea microsatelitară. Prezența instabilității microsatelitare și lipsa de expresie a unei gene reparatoare impune testarea genetică pentru identificarea mutației moștenite a genei respective (îndeosebi pentru hMLH1) și excluderea hipermetilării secvenței promotor ca element generator al deficienței mecanismelor reparatoare. Odată identificată genetic această mutație, avem certitudinea diagnosticului de sindrom Lynch.

Sensibilitatea colorației imunohistochemice în depistarea mutațiilor principalelor gene reparatoare ale ADN este de 74% pentru hMLH1, respectiv 91% pentru hMSH2, iar specificitatea este de 81% pentru hMLH1, respectiv 90% pentru hMSH2, valori comparabile cu cele obținute în cazul testării genetice a instabilității microsateliților (8). Analiza imunohistochimică este însă mult mai puțin costisitoare și poate fi efectuată mult mai rapid comparativ cu testarea genetică pentru depistarea instabilității microsatelitare. În plus, colorația imunohistochimică permite precizarea genei reparatoare afectate de mutație și ghidează specialistul care recomandă testarea genetică la pacienți proveniți din familii la care se suspicionează existența HNPCC.

Scopul studiului îl constituie identificarea pacienților cu cancer colorectal susceptibile de a prezenta instabilitate microsatelitară (selecți pe baza criteriilor Bethesda revizuite) și efectuarea analizei imunohistochemice a acestor tumori pentru decelarea lipsei expresiei uneia dintre genele hMLH1, respectiv hMSH2 și pentru identificarea potențialilor pacienți cu sindrom Lynch.

Material și Metodă

Subiecții eligibili pentru cercetare provin din rândul pacienților care au suferit intervenții chirurgicale pentru cancer colonice și/sau rectale în Clinica Chirurgie IV a Spitalului Clinic C.F. Cluj-Napoca în intervalul ianuarie 2002-decembrie 2009.

Criterii de includere în studiu:

1. diagnostic de adenocarcinom colonic și/sau rectal confirmat histopatologic;
2. îndeplinirea a cel puțin unuia dintre criteriile Bethesda revizuite pentru testarea instabilității microsatelitare în tumorile maligne colorectale.

Criterii de excludere din studiu:

1. absența diagnosticului histopatologic de adenocarcinom colonic sau rectal;
2. cancerul colonic sau rectal dezvoltat pe fond de polipoză adenomatoasă familială;
3. cancerul colonic sau rectal dezvoltat pe fond de recto-

colită ulcero-hemoragică sau boală Crohn cu localizare colonică sau rectală.

Am obținut informațiile necesare pentru includerea pacienților în studiu în urma anamnezei, respectiv din evidența informatizată (bază de date personală), referitoare la pacienții diagnosticați și operați pentru cancere colonice sau rectale.

Pacienții eligibili au fost repartizați în două grupuri, în funcție de numărul de criterii Bethesda îndeplinite: grupul A - pacienți care îndeplineau un singur criteriu Bethesda, iar grupul B - pacienții care îndeplineau două sau mai multe criterii Bethesda.

Pentru ambele grupuri de pacienți am centralizat informațiile referitoare la următorii parametri: vârsta, sexul, istoricul familial de cancer colorectal sau de cancer extracolonic specific pentru sindromul Lynch, valoarea preoperatorie a antigenului carcino-embriionar (CEA), localizarea topografică a tumorii (hemicolon drept, respectiv hemicolon stâng sau rect), tumorile multiple (sincrone) colorectale sau extracolonic, tipul histopatologic al tumorii, gradingul histologic, stadializarea postoperatorie (stadializarea TNM), prezența embolilor tumorali limfatici, a embolilor tumorali venoși, a invaziei perineurale, a infiltratului intratumoral cu limfocite (TIL - Tumor Infiltrating Lymphocytes) și valoarea acestuia, a agregatelor limfoide la nivel peritumoral (a reacției de tip Crohn-like), a tumorilor metacrone.

În vederea efectuării colorațiilor imunohistochimice pentru evidențierea expresiei genelor hMLH1 respectiv hMSH2, pentru fiecare dintre pacienți am procurat cel puțin un bloc de parafină cu material histologic (țesut tumoral colonic și mucoasă colonică normală adiacentă tumorii), conform indicațiilor medicului specialist anatomopatolog care a reexaminat lamele cu secțiuni histologice provenite de la acești pacienți. În cazul pacienților cu cancere colorectale sincrone sau metacrone am procurat cel puțin un bloc de parafină de la fiecare dintre tumori.

Pentru realizarea colorațiilor imunohistochimice s-au folosit materiale și reactivi specifice (anticorpi anti proteina hMLH1, respectiv anti proteina hMSH2 și kitul de detectare a reacției antigen-anticorp NovoLink Max Polymer Detection System - Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK), iar citirea lamelor s-a efectuat în mod independent de către doi medici anatomopatologi. Prezența colorației nucleare la nivelul celulelor din epiteliul tumoral, respectiv din mucoasa colonică normală adiacentă acestuia a fost notată cu "+" (indiferent de intensitatea colorației) și semnifică prezența expresiei genetice pentru hMLH1 respectiv hMSH2. Absența colorației nucleare la nivelul celulelor din epiteliul tumoral (dar cu prezența în celulele mucoasei colonice normale adiacente acestuia) a fost notată cu "-" și semnifică lipsa expresiei genetice pentru hMLH1 respectiv hMSH2. Prezența colorației nucleare la nivelul celulelor epiteliale din mucoasa colonică normală adiacentă tumorii (obligatorie la toți pacienții) a fost considerată ca și colorație-martor de control.

Diferențele dintre parametrii examinați pentru cele două grupuri au fost investigate statistic utilizând programul OpenEpi, versiunea 2.3.1 și anume cu ajutorul testului χ^2 (chi

pătrat) cu corecția Yates (pentru număr de pacienți sub 10), respectiv prin testele de exactitate Fischer sau Mid-P (9). Pragul de semnificație statistică a fost considerat $p < 0.05$.

Rezultate

În perioada ianuarie 2002-decembrie 2009, am identificat un număr de 110 pacienți care au suferit intervenții chirurgicale pentru cancere colonice sau rectale și care au îndeplinit cel puțin unul dintre criteriile Bethesda revizuite pentru testarea instabilității microsatelitare.

Distribuția pacienților în cele două grupuri a fost următoarea: grupul A (un criteriu Bethesda) a inclus 57 de pacienți, iar grupul B (două sau mai multe criterii Bethesda) a inclus 53 de pacienți. Caracteristicile studiate comparativ între cele două grupuri de pacienți sunt ilustrate în *Tabelele 1 și 2*.

S-au constatat diferențe semnificative statistic între cele două grupuri sub aspectul vârstei pacienților la momentul diagnosticului ($\chi^2=62.91$, $p < 0.0000001$), al prezenței antecedentelor heredocolaterale de cancer ($\chi^2=5.73$, $p=0.01668$ - cu corecția Yates), al localizării topografice a tumorii pe hemicolonul drept ($\chi^2=14.89$, $p=0.0001$).

Nu există diferențe semnificative statistic între cele două grupuri de pacienți în ceea ce privește: repartitia pe sexe ($\chi^2=0.07687$, $p=0.7816$), valoarea preoperatorie a CEA

Tabelul 1. Caracteristicile clinico-patologice studiate comparativ la grupurile A și B

Caracteristica studiată	Nr. de pacienți în grupul A	Nr. de pacienți în grupul B
<i>Vârsta la data diagnosticului</i>		
- sub 50 de ani	2	41
- minimum 50 de ani	55	12
<i>Sex</i>		
- masculin	38	34
- feminin	19	19
<i>Antecedente familiale de cancer</i>		
- prezente	9	20
- absente	48	33
<i>Valoare preoperatorie a CEA</i>		
- sub 3 ng/ml	26	34
- minimum 3 ng/ml	31	19
<i>Cancere colorectale</i>		
- unice	52	52
- multiple sincrone	5	1
<i>Localizare topografică</i>		
- hemicolon drept	11	29
- hemicolon stâng sau rect	46	24
<i>Cancere sincrone colonice sau extracolonic</i>		
- prezente	11	13
- absente	46	40
<i>Tip histologic</i>		
- mucinos sau tip "inel cu pecete"	6	13
- altul	51	40
<i>Grading histologic</i>		
- G3 (slab diferențiat)	5	12
- Alt grading histologic	52	41
<i>Stadiu pT</i>		
- pT1 sau pT2	6	2
- pT3 sau pT4	51	51

Tabelul 2. Caracteristicile anatomo-patologice studiate comparativ la cele două grupuri de pacienți

Caracteristica studiată	Nr. de pacienți în grupul A	Nr. de pacienți în grupul B
Metastaze limfoganglionare		
- absente (pN0)	23	25
- prezente (pN1 sau pN2)	34	28
Metastaze la distanță		
- absente (pM0)	44	46
- prezente (pM1)	13	7
Invasie limfatică		
- absentă (L0)	19	21
- prezentă (L1)	38	32
Invasie venoasă		
- absentă (V0)	47	39
- prezentă (V1)	10	14
Invasie perineurală		
- absentă	37	37
- prezentă	20	16
Reacție Crohn like		
- absentă	34	33
- prezentă	23	20
Stadiu TNM		
- I sau II TNM	22	25
- III sau IV TNM	35	28
Apariția de tumori metacrone		
- nu	54	48
- da	3	5
TIL / 1000 celule tumorale		
- sub 20	51	42
- minimum 20	6	11

($\chi^2=3.806$, $p=0.051$), prezența cancerelor colorectale multiple sincrone ($\chi^2=1.366$, $p=0.2432$ – cu corecția Yates, test de exactitate Fischer: $p=0.2411$, test de exactitate Mid-P: $p=0.1375$), prezența cancerelor sincrone colonice și extra-colonice ($\chi^2=0.4404$, $p=0.5069$), tipul histologic mucinos sau

în “inel cu pecete” ($\chi^2=2.852$, $p=0.091$ – cu corecția Yates), gradingul tumoral G3 ($\chi^2=3.051$, $p=0.08$ – cu corecția Yates).

De asemenea, nu s-au constatat diferențe semnificative statistic între cele două grupuri în ceea ce privește stadiul pT ($\chi^2=0.9907$, $p=0.3196$ – cu corecția Yates, test de exactitate Fischer $p=0.3206$, test Mid-P: $p=0.1985$), prezența metastazelor limfoganglionare ($\chi^2=0.5192$, $p=0.4712$) sau a celor la distanță ($\chi^2=1.117$, $p=0.292$ – cu corecția Yates), prezența embolilor tumorali limfatici ($\chi^2=0.4695$, $p=0.4932$) sau venoși ($\chi^2=1.267$, $p=0.2612$), invazia perineurală ($\chi^2=0.2994$, $p=0.5843$), stadiul TNM ($\chi^2=0.8249$, $p=0.3638$), reacția Crohn-like ($\chi^2=0.07888$, $p=0.7788$), infiltrarea intratumorală cu limfocite (TIL) ($\chi^2=1.486$, $p=0.2233$ cu corecția Yates) sau apariția tumorilor metacrone ($\chi^2=0.2249$, $p=0.6353$ – cu corecția Yates, test de exactitate Fischer $p=0.636$, test Mid-P $p=0.431$).

În urma efectuării colorațiilor imunohistochimice, s-a constatat lipsa expresiei genetice a hMLH1 sau hMSH2 la un număr de 13 pacienți. În grupul A, la un pacient s-a constatat lipsa expresiei genetice pentru hMLH1, în timp ce în grupul B au fost identificați 12 pacienți la care colorațiile imunohistochimice au relevat lipsa expresiei genetice fie a genei hMLH1 (8 pacienți), fie a genei hMSH2 (4 pacienți). S-au constatat diferențe semnificative statistic între cele două grupuri studiate atât sub aspectul numărului pacienților la care s-a evidențiat imunohistochimic lipsa expresiei oricăreia dintre genele reparatoare studiate ($\chi^2=9.58$, $p=0.001967$ cu corecția Yates), cât și a numărului pacienților la care s-a evidențiat numai lipsa expresiei hMLH1 ($p=0.023$ la testul de exactitate Fischer, $p=0.012$ la testul de exactitate Mid-P). Nu există diferențe semnificative statistic între cele două grupuri studiate în ceea ce privește lipsa expresiei hMSH2 ($p=0.1014$ la testul de exactitate Fischer, $p=0.05072$ la testul de exactitate Mid-P).

În Tabelul 3 sunt ilustrate caracteristicile clinico-patologice

Tabelul 3. Caracteristicile clinico-patologice ale pacienților la care s-a evidențiat imunohistochimic lipsa expresiei genei hMLH1 sau hMSH2

Pacientul nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Apartenența la grupul A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apartenența la grupul B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipsa expresiei hMLH1	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Lipsa expresiei hMSH2	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Nr. criterii Bethesda îndeplinite	1	3	3	4	3	3	2	4	2	2	3	5	2
Nr. criterii Amsterdam II îndeplinite	0	5	5	5	4	4	3	4	3	3	3	5	0
Vârsta (ani)	56	61	40	34	44	36	38	42	45	49	44	44	47
Sexul	F	F	M	F	M	M	M	M	M	M	F	M	M
Istoric familial de cancer colorectal	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Cancer pe hemicolonul drept	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Mucinos sau “inel cu pecete”	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
Grading tumoral G3	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Cancere colorectale sincrone	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
TIL/1000 celule epiteliale > 20	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
Reacție Crohn-like	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
Stadiul pTNM	II A	II A	III C	II C	III C	III C	II C	II A	II B	III C	II A	II B	II B

Legenda: + semnifică prezența caracteristicii studiate la un anumit pacient; - semnifică absența caracteristicii studiate la un anumit pacient
M – sex masculin; F – sex feminin

ale pacienților la care colorațiile imuno-histochimice au evidențiat lipsa expresiei genetice pentru hMLH1 sau hMSH2.

Discuții

Instabilitatea microsatelitară reprezintă o caracteristică a tumorilor maligne colorectale apărute în cadrul sindromului Lynch, o formă de cancer colorectal ereditar caracterizată prin agregarea familială a cancerelor colorectale apărute la vârstă tânără (vârsta medie la debut este de 45 de ani), localizate predilect la nivelul colonului proximal (în 60-80% din cazuri proximal de flexura splenică a colonului), multiple (sincrone sau metacrone) (10,11,12). Riscul de a dezvolta un cancer colorectal pe parcursul vieții pentru pacienții cu sindrom Lynch este de circa 80%. Cancerelor colorectale apărute la pacienți cu HNPCC prezintă și alte trăsături definitorii cum ar fi tipul histologic agresiv (mucinoase, cu celule "în inel cu pecete" sau nediferențiate), prezența infiltrării intratumorale cu limfocite și a agregatelor limfoide la periferia tumorii (reacție Crohn-like). Datorită caracterului diploid al tumorilor și a prezenței limfo-citelor intra și peritumorale, au un prognostic favorabil, indiferent de stadiul TNM, comparativ cu cancerelor colorectale sporadice.

Analiza studiului s-a axat pe compararea principalilor parametri clinici și anatomo-patologici specifici pentru sindromul Lynch între cele două grupuri de pacienți, care prezentau tumori susceptibile de a prezenta instabilitate microsatelitară. Vârsta mai tânără la momentul diagnosticului, prezența antecedentelor heredocolaterale de cancer colorectal, localizarea topografică pe hemicolonul drept și lipsa expresiei genetice a genelor reparatoare (comparată global, precum și separat pentru hMLH1) au fost semnificativ mai frecvente în grupul cu minimum 2 criterii Bethesda îndeplinite, comparativ cu grupul cu un singur criteriu Bethesda.

Lipsa unei diferențe semnificative statistic între cele două grupuri studiate sub aspectul tipului histologic (mucinos sau cu celule «în inel cu pecete»), al gradului tumoral G3 și al expresiei genetice a hMSH2 poate fi consecința numărului relativ mic de pacienți incluși în fiecare grup, un număr mai mare de pacienți eligibili conducând probabil la diferențe semnificative și în ceea ce privește respectivii parametri specifici pentru sindromul Lynch.

Din punct de vedere imunohistochimic, este imposibilă diferențierea între cancerelor colorectale sporadice cu instabilitate microsatelitară înaltă (asociate cu lipsa expresiei hMLH1 prin hipermetilarea regiunii sale promotor, fenomen care nu caracterizează gena hMSH2) și sindroamele Lynch determinate de mutația moștenită la nivelul genei hMLH1 (circa 50%). Este explicația pentru sensibilitatea redusă a imunohistochimiei în depistarea mutației genetice moștenite a hMLH1. Cu toate acestea, în circa 70% din cancerelor colorectale sporadice cu instabilitate microsatelitară înaltă este prezentă mutația genei BRAF (V600E), modificare ce nu se constată în sindromul Lynch și nici în cancerelor colorectale sporadice fără instabilitate microsatelitară (13).

Utilizând metode de analiză statistică uni respectiv multi-variată s-a dovedit faptul că anumite caracteristici clinice se

asociază în mod preferențial cu mutația genelor hMLH1 sau hMSH2. Astfel diagnosticul de cancer colorectal stabilit la o vârstă tânără, satisfacerea tuturor criteriilor Amsterdam de diagnostic, prezența la un membru al familiei a cancerului endometrial sau de intestin subțire, a cancerelor multiple colorectale, ori a cancerului colorectal și endometrial reprezintă factori predictivi puternici pentru existența unei mutații moștenite la nivelul hMLH1 sau hMSH2 (14).

În studiul nostru, la 9 pacienți s-a constatat în urma colorațiilor imunohistochimice lipsa expresiei genei hMLH1, iar la 4 pacienți s-a constatat lipsa expresiei hMSH2. Coroborând rezultatele colorațiilor imunohistochimice cu caracteristicile clinico-patologice ale acestor pacienți, am identificat 3 pacienți potențial purtători a unei mutații moștenite a genei reparatoare hMSH2 (identificați în tabelul III prin numerele 3, 5 și 6), implicat 3 familii cu potențial sindrom Lynch datorat mutațiilor la nivelul acestei gene. De menționat că toți cei 3 pacienți prezentau cancer colonice aflate în stadiul III TNM. Pe de altă parte, cel de-al patrulea pacient cu tumoră hMSH2 negativă (deși nu prezenta istoric familial de cancer colorectal) ar putea fi primul membru din familie cu sindrom Lynch (cu atât mai mult cu cât prezenta o tumoră mucinoasă slab diferențiată histologic).

În ceea ce privește cei 9 pacienți la care s-a constatat absența expresiei genei hMLH1, ținând cont de posibilitatea inactivării acesteia prin hipermetilarea secvenței promotor, este mai dificil de precizat care dintre aceștia ar putea fi purtătorul unei mutații moștenite la nivelul acestei gene. În pofida acestui fapt, prezența la 4 dintre acești pacienți (numerele 2, 4, 8 și 12 din tabelul III) a unui număr ridicat de criterii Bethesda, respectiv Amsterdam, a istoricului familial încărcat de cancer colorectal, a altor caracteristici clinico-patologice sugestive (localizarea tumorală pe hemicolonul drept, histologia de tip mucinos, reacția Crohn-like sau TIL) constituie argumente solide în favoarea unei mutații moștenite la nivelul hMLH1. Acești 4 pacienți prezentau exclusiv cancer colonice aflate în stadiul II TNM.

Una dintre limitele studiului o constituie inaccesibilitatea efectuării colorațiilor imunohistochimice pentru testarea expresiei tuturor genelor reparatoare ale ADN potențial implicate în apariția sindromului Lynch. Este posibil ca un număr de cancer colorectale din cele două grupuri studiate să manifeste imunohistochimic lipsa expresiei genetice pentru alte gene reparatoare ale ADN (hMLH3, hMSH3, hMSH6, hPMS1 sau hPMS2), fapt care coroborat cu prezența la respectivii pacienți a caracteristicilor clinico-patologice specifice sindromului Lynch ne-ar permite identificarea și a altor pacienți cu potențial sindrom Lynch.

De asemenea, studiul nu are în vedere pacienții peste 50 de ani cu cancer colorectal sporadic, fără trăsături histologice sugestive pentru instabilitate microsatelitară, dar care pot prezenta instabilitate microsatelitară înaltă (și implicat mutații ale genelor reparatoare ale ADN) într-o proporție de circa 15%. Rămâne în discuție fezabilitatea efectuării colorațiilor imunohistochimice pentru toate formele sporadice de cancer colorectal, vizând depistarea mutațiilor genelor reparatoare ale ADN implicate în carcinogeneza colorectală.

Studiul de față este primul de acest gen publicat în România referitor la implicarea genelor reparatoare ale ADN în carcinogeneza colorectală. Am identificat 13 pacienți la care imunohistochimic s-a constatat lipsa expresiei uneia dintre genele hMLH1 sau hMSH2, din care 7 pacienți cu potențial sindrom Lynch (3 cu lipsa expresiei hMSH2 și 4 cu lipsa expresiei hMLH1), pornind de la un număr total de 110 pacienți cu cancere colorectale testate imunohistochimic pentru studierea expresiei genelor reparatoare hMLH1 respectiv hMSH2, a căror mutație moștenită este responsabilă de circa 90% din sindroamele Lynch.

Pentru confirmarea diagnosticului de sindrom Lynch la pacienții la care s-a obiectivat imunohistochimic lipsa expresiei unei gene reparatoare a ADN sunt necesare teste genetice, mult mai costisitoare. Este însă mult mai ieftin și fezabil de realizat o supraveghere oncologică atentă a acestui grup de risc și a membrilor familiilor de proveniență a acestor pacienți pentru depistarea într-un stadiu precoce a neoplaziilor colorectale sau extracolice specifice sindromului Lynch, fapt care are repercursiuni semnificative asupra prognosticului acestor pacienți.

Bibliografie selectivă

1. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkannen L, Mecklin JP et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993;260(5109):812-6.
2. Ionov Y, Peinado MA, 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.
3. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993;260(5109):816-9.
4. Wheeler JM, Bodmer WF, Mortensen NJ. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut*. 2000;47(1):148-53.
5. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*. 1994;263(5153):1625-9.
6. Pălii L, Barbăcar N, Timis T, Bendelic V, Hotineanu V. Instabilitatea Minisatelitica (IMS) a genelor HMLH1, HMSH2 în adenomii colorectali ereditari. *Chirurgia (Bucur)*. 2010;105 Supl.1:S122.
7. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):261-8.
8. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(1):96-104.
9. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Version 2.3.1. Available from: <http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>
10. Todor V, Chirila D, Tompa S. Familial colorectal cancer. The Lynch syndrome. *Chirurgia (Bucur)*. 1998;93(6):427-32.
11. Muresan F, Cazacu M, Mihailov A, Domsa I, Simescu R, Petre G. Sindrom Lynch sau cancer colo-rectal familial - Valoarea criteriilor Amsterdam II de diagnostic. *Chirurgia (Bucur)*. 2008;103 Supl.1:S114.
12. Ion D, Bolocan A, Stoian RV, Tibarna A, Tudor A, Serban MB. Sindrom HNPCC – Entitate subdiagnosticata sau ignorata. *Chirurgia (Bucur)*. 2010;105 Supl.1:S116.
13. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006;38(7):787-93. Epub 2006 Jun 25.
14. Wijnen JT, Vasen HEA, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A et al. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1998;339(8):511-8.