

## Inestabilidad microsatelital y pérdida de la heterocigocidad en lesiones neoplásicas y preneoplásicas gástricas

Juan Carlos Roa S<sup>1</sup>, Juan Carlos Araya O<sup>1</sup>,  
Miguel Angel Villaseca H<sup>1</sup>, Iván Roa E<sup>1</sup>, Pelayo Correa<sup>2</sup>

### *Microsatellite instability and allelic imbalance in neoplastic and preneoplastic gastric lesions*

**Background:** Gastric cancer is the leading cause of cancer deaths in the general population in Chile, with mortality rates as high as 33.7 per 105 in males in the IX region. A chain of genetic and morphological events precedes the intestinal type of gastric carcinoma. One of them is the called multifocal atrophic gastritis often associated with intestinal metaplasia. **Aim:** To study the frequency of microsatellite instability (MSI) and loss of heterocigosity (LOH) in neoplastic and preneoplastic lesions of gastric carcinoma, especially intestinal metaplasia. **Material and methods:** Ninety four gastric cancer biopsies were studied using laser capture microdissection, to obtain well defined cell populations from paraffin-embedded tissues: lymphocytes (control DNA), intestinal metaplasia and gastric cancer areas. Primer flanking microsatellite 15 highly polymorphic regions were used to study MSI and LOH. Radioactive PCR products were electrophoresed and exposed for autoradiography. **Results:** LOH was observed in 83% of gastric carcinomas and in 54% areas containing intestinal metaplasia. The most commonly altered regions were the CA repeat associated with the p53 gene and the 3p21 region. High grade MSI was observed in 11.7% of gastric cancer preparations and 17% of intestinal metaplasia associated to cancer with MSI-H phenotype. **Conclusions:** MSI and LOH were frequently observed in intestinal metaplasia glands in patients with gastric carcinoma. The frequency of MSI-H phenotype in gastric patients was slightly lower than the one described in sporadic colorectal cancer not associated to HNPCC. The high incidence of genetic lesions in intestinal metaplasia area, support the idea that intestinal metaplasia is a genetically highly unstable cell population (Rev Méd Chile 2003; 131: 1227-36).

**(Key Words:** Gastric mucosa; Neoplasm staging, Neoplasm structural genes, Metaplasia)

Recibido el 20 de enero, 2003. Aceptado en versión corregida el 2 de septiembre, 2003.

Trabajo financiado parcialmente por proyectos DIUFRO 140209 y FONDECYT 1020283.

<sup>1</sup>Departamento de Patología, Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

<sup>2</sup>Department of Pathology, Louisiana State University Health Science Center, New Orleans, LA, USA.

Correspondencia a: Dr. Juan Carlos Roa. Casilla 54-D,  
Temuco, Chile. Phone: 56-45-296528. Fax: 56-45-216273. E  
mail: jcroa@ufro.cl

El cáncer gástrico es la primera causa de muerte por cáncer en la población chilena con una tasa de mortalidad general de 19,5 por 10<sup>5</sup> y de 25,3 por 10<sup>5</sup> en hombres. En nuestra región la tasa de mortalidad general por esta neoplasia se eleva hasta los 24,8 por 10<sup>5</sup> habitantes y en los hombres alcanza las 33,7 muertes por 10<sup>5</sup>. Con estas cifras la probabilidad media que un chileno muera por cáncer de estómago es de alrededor de 3% transformando a esta enfermedad en un problema de salud pública<sup>1</sup>.

La secuencia de eventos genéticos, moleculares y morfológicos en el proceso de carcinogénesis gástrica ha sido extensamente estudiada. En 1965 Laurén describió dos tipos histológicos de cáncer gástrico: intestinal y difuso. El primero es también conocido como el tipo epidémico debido a su relativa alta incidencia en áreas con población de alto riesgo de tener cáncer gástrico<sup>2</sup>.

Posteriormente Correa, en 1975 y 1983, basado en observaciones epidemiológicas y morfológicas postuló a la gastritis crónica atrófica como un precursor de cáncer<sup>3,4</sup>. Actualmente se reconoce a la gastritis atrófica multifocal (MAG) como a una entidad nosológica, morfológicamente caracterizada por: atrofia metaplasia intestinal y eventualmente displasia<sup>5,6</sup>.

El cáncer de colon y recto fue la primera neoplasia en la que se generó una secuencia de eventos en etapas tanto genéticas como morfológicas para la aparición de una neoplasia<sup>7</sup>. Desde entonces el mismo concepto se ha aplicado a otras neoplasias. Tahara ha comunicado importantes hallazgos que permiten sugerir una cadena de eventos genético moleculares que se acoplan a la secuencia de fenómenos morfológicos sugerida por Correa<sup>3,4,8-10</sup>. Aun cuando este conocimiento ha permitido un mejor entendimiento de la carcinogénesis gástrica, muchos otros eventos permanecen aún por comprenderse, como la identificación de nuevos genes supresores de tumores, sus formas preferentes de inactivación y mecanismos de inestabilidad microsatelital asociados.

En este sentido el concepto de pérdida de la heterocigocidad (LOH) se encuentra ligado en forma directa con la inactivación de genes supresores de tumores, favoreciendo la proliferación neoplásica<sup>11</sup>. Existen estudios que muestran una asociación entre la presencia de LOH en genes

específicos y tasas de crecimiento<sup>12</sup>, estado clínico<sup>13</sup> y nivel de infiltración de los cánceres gástricos<sup>14</sup>. En el estómago el LOH ocurre en cerca de 30% de los casos informativos en la zona del gen APC, en 27-35% de los casos informativos en la zona del gen DCC<sup>13</sup>, considerado como un evento tardío dentro de la progresión maligna<sup>15</sup>, y de 30% de los casos informativos en la zona del gen retinoblastoma<sup>13,16</sup>. De otro modo el LOH en la zona cromosómica 5q21 (APC/MCC) es frecuente en los cánceres gástricos<sup>17</sup> y también está presente en la metaplasia intestinal y en las lesiones displásicas<sup>18</sup>.

La inestabilidad microsatelital (MSI) en *loci* cromosómicos asociados a importantes genes, es un evento frecuente de la progresión de los tumores malignos en los humanos. Un importante grupo de los carcinomas gástricos esporádicos presentan un alto índice de MSI que es la expresión de un estado de inestabilidad genética, producido por la inactivación del sistema reparador de ADN (*Mismatch Repair System*) el cual está compuesto por al menos 6 genes de los cuales los más importantes son MLH1, MSH2 y MSH6<sup>19,20</sup>. Esta inactivación ocurre más frecuentemente por mutación o hipermetilación del área promotora génica. Aunque la MSI en sí no tiene un efecto carcinogénico debido a que la mayoría de los microsatélites se encuentran en áreas no expresables de ADN, este defecto es un buen indicador del estado de estabilidad genética y reviste importancia cuando los microsatélites se encuentran formando parte de genes encargados de funciones celulares específicas como son TGFβ RII, BAX, E2F4 y β2 microglobulina<sup>20</sup>. La presencia de MSI en estos genes ocurre en casos con alto índice de MSI y por tanto también son utilizados como test de «*screening*»<sup>21-24</sup>.

A diferencia de la secuencia adenoma-carcinoma del cáncer de colon, en el estómago no parece ser frecuente la transformación de un adenoma en carcinoma<sup>25-28</sup>. Sin embargo, los estudios en gastritis crónica atrófica multifocal han demostrado inestabilidad genética en metaplasia intestinal y en la displasia gástrica<sup>25</sup>.

Muchos marcadores pueden ser utilizados para definir y distinguir diferentes grados de MSI<sup>29</sup>. En 1997 una conferencia del Instituto Nacional del Cáncer (USA) recomendó un panel de marcadores

para definir las categorías de inestabilidad satelital en el carcinoma de colon<sup>30,31</sup>. En esta misma conferencia algunos *loci* alternativos fueron propuestos para los estudios de carcinomas extracolónicos.

Nuestro objetivo fue estudiar la frecuencia de MSI y la presencia de pérdida de la heterocigocidad en cáncer gástrico y en la metaplasia intestinal de casos con gastritis atrófica multifocal asociadas a cáncer usando un novedoso método para la microdissección tisular.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

**Selección de la muestra:** Noventa y cuatro muestras de pacientes con cáncer gástrico obtenidas en la pieza quirúrgica de gastrectomía, fueron seleccionadas al azar para el estudio. Todos los casos provienen de los archivos del Departamento de Patología en la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Definimos como lesión preneoplásica gástrica a los cambios observados en la gastritis atrófica multifocal tales como atrofia, metaplasia intestinal y displasia. Secciones seriadas de 6 µm de espesor fueron cortadas desde el material fijado en tampón formalina y embebido en parafina usando técnicas para evitar la contaminación cruzada.

**Microdissección y extracción de DNA:** La microdissección fue efectuada usando un Pixel I (*Arcturus Engineering*) equipado con una fuente de bajo poder del láser con 30 micras de diámetro<sup>32,33</sup>. La microdissección por captura láser fue utilizada para disecar áreas de secciones teñidas con hematoxilina eosina no cubiertas utilizando una lámina de polímero termoplástico que cubre la superficie plana y rígida, ópticamente clara de una tapa plástica. Las tapas fueron inmediatamente utilizadas para cerrar tubos Eppendorf de 0,6 ml que contenían tampón de digestión. Todo el procedimiento fue monitorizado utilizando una cámara de video montada en un microscopio invertido para evaluar el procedimiento histológico antes y después de la adquisición del tejido (Figuras 1 y 2). Brevemente, el tejido recogido o disecado fue digerido con 50 a 100 µl de proteinasa K (1 mg/ml, en 50 mM de Tris-HCl tampón, pH 8, con 1 mM de EDTA, y 0,45% de Tween-20) a 52°C

durante la noche. La proteinasa K fue denaturada a 95°C por 15 min. Las soluciones de ADN fueron almacenadas a -20°C<sup>34</sup>.

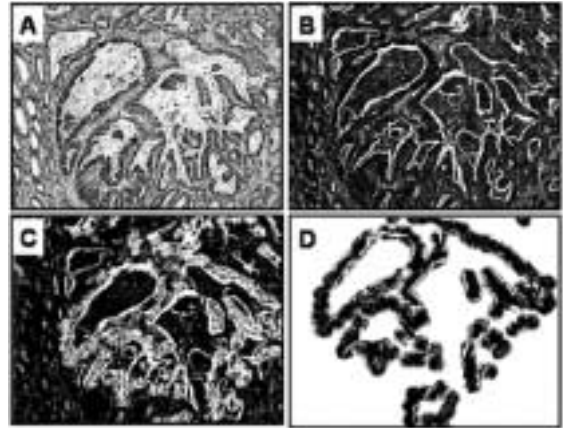


FIGURA 1. Panel de cuatro microfotografías mostrando el proceso de microdissección láser. (A) Adenocarcinoma Gástrico HE 40X usado para orientación general. (B) Sección sin cubreobjetos listo para ser colocado en el microdisector LASER. (C) Sección luego de la microdissección, mostrando las áreas faltantes. (D) Microfotografía que muestra material microdisecado en el dispositivo de captura.

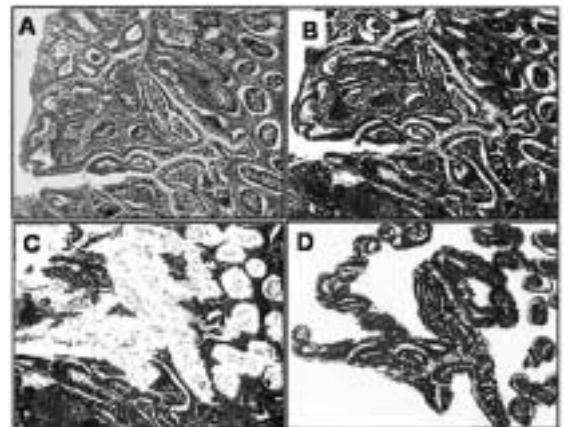


FIGURA 2. Panel de cuatro microfotografías LCM. (A) Metaplasia intestinal incompleta adyacente a cáncer gástrico HE X 40. (B) Sección sin cubreobjetos listo para ser colocado en el microdisector LASER. (C) Sección luego de la microdissección, mostrando las áreas faltantes. (D) Microfotografía que muestra material microdisecado en el dispositivo de captura obsérvese la buena delimitación de los bordes glandulares disecados.

**Marcadores de DNA:** La Tabla 1 muestra las regiones de microsatélites de tipo mononucleótido y dinucleótido utilizadas para el estudio, las cuales fueron flanqueadas por pares de iniciadores y utilizadas para los estudios de MSI y LOH. Los marcadores fueron escogidos en base a su proximidad a genes supresores de tumores conocidos y a áreas en las cuales estudios previos han demostrado la probable presencia de genes supresores de tumores, por su buen funcionamiento en material de archivo y además por el alto porcentaje de heterocigocidad de los marcadores lo que permite un alto índice de casos informativos.

**Análisis de PCR-MSI:** La reacción de polimerasa en cadena fue desarrollada utilizando 5 µl de ADN del resultado de la digestión en un volumen total de 15 µl. La mezcla de PCR fue preparada como sigue: iniciadores en una concentración de 0,5 mmol/l, las temperaturas de alineamiento fueron optimizadas para cada marcador. Para detectar MSI y LOH los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel denaturante de formamida-urea. Los ADN de las áreas de control, metaplasia intestinal y carcinoma fueron comparadas en bandas adyacentes. Los geles fueron fijados en una solución de ácido acético-metanol al 10% por 12 min y luego lavados por otros 12 min en agua deionizada. Los geles fueron luego secados al vacío a 80°C y expuestos 12 a 24 h a temperatura ambiente en autorradiografía<sup>34</sup>.

**Definición de MSI:** Cambios en cualquier longitud debido ya sea a inserciones o desapariciones de una unidad repetitiva en una región de un microsatélite dentro de una población celular (es decir, tumor o metaplasia intestinal cuando es comparado con tejido normal) (Figura 3)<sup>19,20</sup>. Los fenotipos de MSI fueron caracterizados como inestabilidad de alto grado (MSI-H) cuando 30% o más de los marcadores mostraba MSI, inestabilidad de bajo grado (MSI-L) cuando menos de 30% de los marcadores utilizados mostraba MSI, y estabilidad microsatelital (MSS) cuando ninguno de los marcadores estudiados mostraba MSI<sup>30</sup>.

**Definición de pérdida de la heterocigocidad (LOH):** Normalmente un DNA normal presenta 2 alelos. Cuando estos dos alelos son diferentes (heterocigotos) se evidencian dos bandas en la

**Tabla 1. MSI y LOH en 94 casos de carcinoma gástrico usando 15 microsatélites**

| Áreas de adenocarcinoma |       |       |
|-------------------------|-------|-------|
| Microsatélite           | LOH % | MSI % |
| D2S123                  | 7(6)  | 12    |
| D3S1067                 | 39    | 10    |
| D3S1262                 | 7     | 10    |
| D3S1286                 | 30    | 16    |
| D3S1478                 | 9     | 9     |
| D3S3640                 | 19    | 15    |
| D5S346                  | 12    | 15    |
| D12S347                 | 4     | 8     |
| D12S1638                | 18    | 10    |
| D13S175                 | 8     | 11    |
| D16S265                 | 6     | 13    |
| D17S250                 | 27    | 6     |
| D18S55                  | 14    | 5     |
| BAT26                   | 0     | 15    |
| BAT40                   | 0     | 9     |

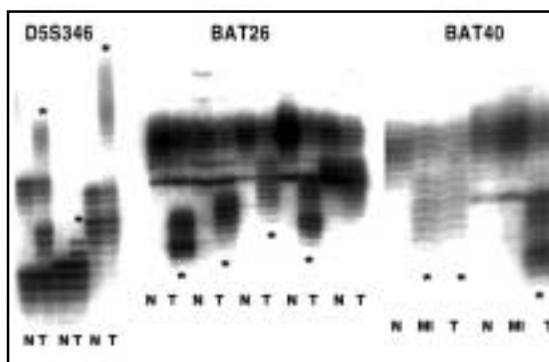


FIGURA 3. Placa autorradiográfica de gel de poliacrilamida mostrando MSI con los marcadores D5S346, BAT26 y BAT40. Los casos están ordenados en pares o tríos según corresponda (N=control normal del paciente; MI=Metaplasia intestinal adyacente al tumor; T=tumor). Los asteriscos muestran las áreas de inestabilidad microsatelital en comparación con los controles internos normales representados por bandas o grupos de bandas extras en las zonas superiores. En el experimento con BAT40 se observa una lesión idéntica en el área de MI y de T.

autorradiografía (Figura 4). Existe pérdida de la heterocigocidad cuando se observa la desaparición de uno de estos alelos en la lesión pre-neoplásica o neoplásica en comparación con la mucosa normal o el control normal adyacente<sup>20</sup>.

*Estadística:* Análisis de correlación cruzada entre la frecuencia de la pérdida de la secuencia de de LOH en las lesiones malignas y pre-malignas fueron usadas utilizando un chi cuadrado o prueba de Fisher. La hipótesis de que el evento sólo ocurre por azar fue analizado con la prueba binomial acumulativa. Se realizó además prueba de Cox Mantel para verificar diferencias en la supervivencia de los grupos en estudio.

RESULTADOS

Las características generales del grupo estudiado se detallan en la Tabla 2. El promedio de edad fue 63 años, correspondiendo dos tercios a pacientes de género masculino, y con 13% de casos menores de 50 años. La totalidad correspondió a adenocarcinomas, predominantemente con patrón tubular (73%) y pobremente diferenciados (52%). Casi la totalidad de los casos fueron tumores avanzados (96,8%), aproximadamente 2/3 de tipo intestinal y el 75% de los casos presentó metástasis ganglionares linfáticas al momento de la gastrectomía.

La microdissección por captura láser proveyó suficiente DNA en 100% de los casos estudiados. La intensidad de las bandas autorradiográficas concedieron una clara caracterización del alelotipo y de la MSI en 95% de los casos. La frecuencia de casos informativos fluctuó entre 78 y 96% dependiendo del marcador utilizado.

*Pérdida de la heterocigocidad (LOH).* Se observó LOH en al menos 1 locus estudiado en 83% de los carcinomas gástricos (78/94). Las regiones más frecuentemente alteradas fueron los microsatélites tipo dinucleótido asociado a los genes p53 y a la región cromosómica 3p21 (D3S1067 y D3S1286),

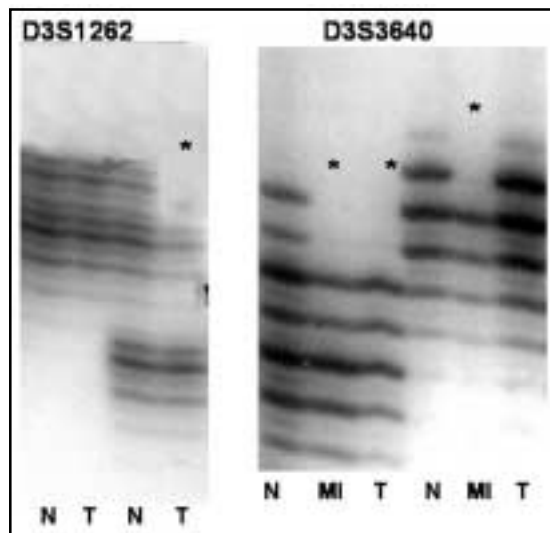


FIGURA 4. Placa autorradiográfica de gel de poliacrilamida mostrando LOH con los marcadores D3S1262 y D3S3640. Los casos están ordenados en pares o tríos según corresponda (N= control normal del paciente; MI= Metaplasia intestinal adyacente al tumor; T= tumor). Los asteriscos muestran los alelos o fragmentos de alelos perdidos en áreas de metaplasia intestinal o tumor en comparación con el control interno normal. Obsérvese en el experimento con D3S3640 la pérdida idéntica en las áreas de MI y T en uno de los casos y la pérdida alélica sólo en el área de MI en el segundo caso.

Tabla 2. Características generales del grupo estudiado

|                         |              |                       |                 |               |
|-------------------------|--------------|-----------------------|-----------------|---------------|
| Edad promedio           | 63 años      | <50 años 13%          | >50 años 87%    |               |
| Sexo                    | Hombre 67%   | Mujer 33%             |                 |               |
| Origen mapuche          | 27%          |                       |                 |               |
| Patrón histológico      | Tubular 73%  | Anillo de sello 12,5% | Papilar 11%     | Carcinoide 3% |
| Grado de diferenciación | Poco 58%     | Moderado 38%          | Bien 4%         |               |
| Linfadenectomía         | Positiva 75% | <3 ganglios 36%       | ≥3 ganglios 64% |               |
| Estadio                 | I 18%        | II 27%                | III 50%         | IV 5%         |
| Lauren                  | Difuso 36%   | Intestinal 59%        | Mixto 5%        |               |

**Tabla 3. Detalle de Inestabilidad Microsatelital casos de metaplasia intestinal adyacentes a carcinomas con MSI-H**

| Metaplasia Intestinal | Microsatélites |         |         |         |         |         |        |         |          |         |         |         |        |       | % MSI |        |
|-----------------------|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|----------|---------|---------|---------|--------|-------|-------|--------|
|                       | D2S123         | D3S1067 | D3S1262 | D3S1286 | D3S1478 | D3S3640 | D5S346 | D12S347 | D12S1638 | D13S175 | D16S265 | D17S250 | D18S55 | BAT26 |       | BAT 40 |
| 3                     | ni             | -       | -       | -       | -       | -       | -      | -       | -        | ni      | -       | -       | ni     | -     | -     | 0      |
| 8                     | -              | -       | -       | -       | -       | -       | -      | -       | LOH      | -       | -       | -       | -      | -     | -     | 0      |
| 13                    | LOH            | MSI     | -       | -       | -       | -       | -      | -       | -        | -       | -       | -       | -      | -     | -     | 7      |
| 21                    | -              | -       | -       | MSI     | -       | -       | -      | -       | -        | -       | -       | ni      | -      | -     | -     | 7      |
| 30                    | -              | LOH     | LOH     | LOH     | -       | -       | LOH    | -       | -        | LOH     | LOH     | -       | LOH    | -     | -     | 0      |
| 35                    | LOH            | LOH     | MSI     | -       | MSI     | MSI     | -      | MSI     | -        | -       | LOH     | MSI     | -      | MSI   | -     | 40     |
| 43                    | -              | -       | -       | LOH     | -       | -       | -      | -       | -        | MSI     | -       | -       | -      | -     | -     | 7      |
| 59                    | -              | MSI     | -       | -       | MSI     | MSI     | MSI    | -       | -        | -       | MSI     | -       | -      | MSI   | -     | 40     |
| 61                    | -              | -       | ni      | -       | -       | -       | -      | -       | -        | ni      | -       | -       | -      | -     | -     | 0      |
| 76                    | -              | -       | -       | -       | -       | -       | -      | -       | -        | -       | -       | MSI     | LOH    | -     | -     | 7      |
| 90                    | -              | LOH     | -       | -       | -       | -       | ni     | -       | -        | -       | -       | -       | -      | -     | -     | 0      |

LOH: pérdida de la heterocigocidad. ni: caso no informativo. MSI: Inestabilidad Microsatelital. -: normal caso informativo.

las que se encuentran cercanas a un gen supresor de tumores aún no identificados (Tabla 1).

El resto de los marcadores utilizados mostró una baja frecuencia de lesiones que fluctuó entre 5 y 20% (Tabla 1). Más aún, 22 de los 94 tumores gástricos con LOH mostraron esta alteración en 3 o más marcadores de DNA.

Siete de trece casos de metaplasia intestinal mostraron LOH en una o más regiones de microsatélites estudiadas (54%) (prueba exacta de Fisher, con  $p > 0,05$  cuando fue comparado con la frecuencia global de LOH en áreas de cáncer gástrico) (Tabla 3). Interesantemente, una de las zonas de metaplasia mostró una alta frecuencia de LOH, con pérdida alélica en 8 de 15 marcadores de ADN estudiados. La región más frecuentemente alterada correspondió a D3S1067 (3 de 11 casos), seguidos por las regiones D2S123, D3S1286, D16S265 y D18S55 (Tabla 3).

El análisis de LOH en metaplasia intestinal y sus respectivos tumores mostraron la siguiente correlación: cinco de las seis metaplasias intestinales con LOH mostraron una concordancia absoluta con sus respectivos tumores. En cambio, 2 casos de metaplasia intestinal con LOH mostraron una concordancia parcial con LOH observado en sus

**Tabla 4. Categorización de grado de inestabilidad microsatelital de carcinomas gástricos y áreas de metaplasia intestinal asociadas**

|       | Metaplasia | Adenocarcinoma |
|-------|------------|----------------|
| MSI-H | 16,6%      | 11,7%          |
| MSI-L | 41,6%      | 31,9%          |
| MSS   | 41,8%      | 56,4%          |

respectivos tumores (en un caso el tumor no presentaba lesión y en el otro el alelo comprometido era el otro).

*Inestabilidad microsatelital (MSI).* Los resultados del análisis de MSI en tumores y metaplasia intestinal se muestra en las Tablas 1 y 3. Todas aquellas muestras positivas para LOH e MSI fueron repetidas en duplicados para descartar artefactos de PCR.

La MSI se observó en 41 de los 94 cánceres (44%), 11 casos (11,7%) mostraron un fenotipo de MSI-H, 30 (31,9%) casos fueron MSI-L y el restante 56,4% no mostró errores de replicación con los marcadores utilizados (MSS) (Tabla 4). Los marca-

dores que expresaron la más alta frecuencia de MSI fueron BAT26 (15 casos) y D3S1286, D3S3640, D5S346 y D16S265. Todos los marcadores utilizados mostraron algún grado de MSI en los casos de cáncer examinados.

Siete de los once casos de metaplasia intestinal asociadas a cáncer con fenotipo de MSI-H mostraron MSI en una o más regiones del ADN (63% prueba exacta de Fisher  $p > 0,05$  comparada con la frecuencia global de MSI de áreas con cáncer gástrico). Además 2 casos de metaplasia intestinal mostraron un fenotipo de inestabilidad de alto grado con MSI en 7 regiones microsatelitales, ambos con MSI en el marcador BAT26.

Se observó una marcada tendencia a mejor sobrevida en aquellos pacientes con fenotipo MSI-H en comparación con los grupos con MSS y MSI-L ( $p=0,09$ ).

#### DISCUSIÓN

La microdissección por captura láser (LCM) es un método que trabaja con visualización del tejido, permitiendo una selección cuidadosa y específica de diferentes áreas, tales como glándulas, tumor, etc. Todos los casos mostraron una amplificación del ADN seleccionado y disecado en forma adecuada, con una resolución y bandeado autorradiográfico de buena calidad. De otro modo, la microdissección permitió una caracterización de las alteraciones del ADN en áreas de metaplasia intestinal y cáncer gástrico cuidadosamente seleccionadas, descartando la posibilidad de contaminación del ADN por áreas tumorales, infiltrados inflamatorios y células estromales normales adyacentes.

Recientemente se ha descrito que los estudios mediante PCR con escasa cantidad de ADN, particularmente con LCM pueden presentar algunos artefactos que pueden simular lesiones genéticas<sup>35</sup>. En nuestro estudio se utilizó siempre una cantidad mínima de 500 células por experimento y todos los resultados positivos fueron confirmados en duplicado para garantizar su reproducibilidad.

Se ha establecido que el fenotipo MSI-H es consecuencia de un estado de inestabilidad genética derivada de la inactivación de alguno de los genes del sistema reparador de ADN genómico (MMR)<sup>29,36-38</sup>. El proceso de inactivación puede

producirse básicamente por tres mecanismos: delección, mutación o metilación alélica. Sin embargo, parece ser que los últimos dos son los más importantes<sup>20</sup>, hecho que fue inicialmente descrito en pacientes con cáncer hereditario colorrectal no poliposo (HNPCC)<sup>36,39</sup>, tumores en individuos jóvenes y cánceres colorrectales sincrónicos. Posteriormente esta condición se ha encontrado en algunos subgrupos de cánceres gástricos y de endometrio<sup>40-42</sup>. La frecuencia de MSI-H en cáncer gástrico ha sido extremadamente variable dependiendo de la cantidad y tipo de marcadores utilizados, así como también de los criterios empleados para definir la MSI, fluctuando entre 3 y 46%<sup>43</sup>. Sin embargo, este fenómeno ha sido poco estudiado en lesiones preneoplásicas como la metaplasia intestinal. En nuestros casos la frecuencia de inestabilidad de alto grado (MSI-H) e inestabilidad de bajo grado (MSI-L) en los carcinomas gástricos fue de 11,7% y 31,9%, respectivamente, equivalente a 11 casos y 32 casos de cáncer gástrico, respectivamente.

En general nosotros encontramos MSI frecuentemente ya sea en los cánceres gástricos o en las áreas de metaplasia intestinal asociadas. Sin embargo, la frecuencia de MSI-H observada fue más baja que la descrita en cánceres de colon esporádicos no HNPCC, donde comúnmente entre 15 y 20% de los tumores muestran un fenotipo MSI-H<sup>36</sup>.

El factor medioambiental debe ser considerado en la discusión del cáncer gástrico con fenotipo de MSI de alta y baja frecuencia. Este tumor ha mostrado una clara relación con factores medioambientales tales como el directo contacto de los constituyentes de la dieta con la mucosa gástrica y la infección por el *Helicobacter pylori*. En el primer caso la estrecha relación del alto contenido de nitritos y nitratos propios de áreas agrícolas con altos índices de fertilización pueden explicar fenotipos de hipermetilación génica en genes críticos para el control de reparación de ADN (MMR) y control de replicación celular. En el segundo, esta bacteria es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica que es capaz de explicar el daño sobre el ADN derivado de radicales libres, conduciendo a una MSI en los locus de las regiones microsatélites, independiente de la eficiencia del sistema MMR. Este mecanismo de daño del ADN es probablemente no específico, y puede ser una causa

potencial de inactivación del gen, permitiendo un aumento en la frecuencia de mutaciones en los trectos cortos repetitivos en el ADN que codifica la porción expresada de estos genes.

Las más altas frecuencias de inestabilidad microsateletal encontradas en las áreas de cáncer gástrico correspondieron a áreas relacionadas al gen supresor de tumores p53, y a una región en el cromosoma 3 que posiblemente contiene un gen supresor de tumores frecuentemente afectados en cáncer pulmonar<sup>44</sup>. Es a este nivel donde la inestabilidad microsateletal cobra importancia ya que la inactivación por mutación (inserción o desaparición de bases que definen la MSI) de estos eventuales genes supresores favorece claramente la aparición de neoplasias.

El BAT-26 es un microsateélite compuesto por poliadeninas dentro del gen hMSH2, que ha sido propuesto como un marcador de búsqueda para la detección de MSI-H<sup>45,46</sup>. En nuestra serie BAT26 se expresó en todos los casos que presentaban MSI-H, teniendo de esta manera 100% de sensibilidad, sin embargo, se expresó también en 3 casos con MSI-L lo que le otorga un 96% de especificidad y 79% de valor predictivo positivo para detección de casos con alto grado de MSI.

Existe numerosa evidencia que asocia mejor pronóstico a aquellos casos con MSI-H tanto en cáncer gástrico como en otros tumores malignos<sup>47,48</sup>, esto probablemente debido a su mayor asociación con tumores mejores diferenciados<sup>49</sup>. En nuestra serie este hecho se mantuvo, pero probablemente una población de estudio levemente mayor habría entregado diferencias significativas ( $p=0,09$ ).

Nosotros estudiamos LOH en 15 *loci* en 94 casos de cáncer gástrico invasivo de Chile. En 72 de los 83 casos evaluables, debido a que los 11 casos con MSI-H no pueden ser evaluados para

este efecto, porque pueden ser interpretados como pérdidas alélicas, migraciones alélicas producto del alto grado de inestabilidad<sup>30</sup>. Una o más áreas del LOH fueron detectadas con una media de 1,7 por tumor. Nosotros determinamos que ciertas anomalías moleculares incluyendo LOH en la zona de los genes p53 y en los cromosomas 3, 5 y 12 están frecuentemente presentes en el cáncer gástrico. La comparación de estas anomalías y las encontradas en la metaplasia intestinal muestran una heterogeneidad similar a la que es vista en el estudio de MSI. Estos hallazgos enfatizan la inestabilidad genética ya descrita en lesiones neoplásicas y preneoplásicas de la mucosa gástrica, con lesiones multifocales y multiclonales en la mucosa gástrica<sup>25</sup>.

La alta incidencia de lesiones genéticas (inestabilidad microsateletal) y LOH en áreas de metaplasia intestinal asociadas a cáncer, incluso en dos casos más altas que las mostradas en las áreas de carcinoma, señala que la metaplasia intestinal es una población celular genética y altamente inestable. La discordancia entre el cáncer gástrico y sus respectivas metaplasias intestinales apoyan la idea que durante el comienzo y durante todo el proceso neoplásico hay diferentes poblaciones que van adquiriendo diferentes alteraciones genéticas<sup>50,51</sup>. Estas alteraciones microsateletales y desbalances alélicos son adquiridos durante la división celular de una sola célula transformada, la cual experimentaría una expansión clonal y adquiriría una ventaja proliferativa por sobre el resto del tejido o del órgano. Otras sucesivas transformaciones genéticas y fenotípicas concederían la aparición de una neoplasia maligna<sup>51</sup>. El significado de la MSI en la metaplasia intestinal sostiene en el principio que en el estómago, durante el desarrollo del cáncer hay inestabilidad genética que favorece el proceso tumorigénico<sup>25</sup>.

#### REFERENCIAS

1. MEDINA E, KAEMPFER AM. Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations. *Rev Méd Chil* 2001; 129: 1195-202.
2. LAURÉN P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called Intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Path Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.
3. CORREA P, HAENZSEL W, CUELLO C, TANNENBAUM S, ARCHER M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975: 58-60.
4. CORREA P. Chronic atrophic gastritis as precursor of cancer. In: Sherlock P, Morson BC, Barbara L, Veronesi U, editors. *Precancerous lesions of the*



- gastrointestinal tract*. New York: Raven Press; 1983; p. 145-53.
5. CORREA P. Human Gastric Carcinogenesis: A Multi-step and Multifactorial Process. First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-40.
  6. CORREA P, SHIAO YH. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 1941s-1943s.
  7. HAMILTON SR. Molecular genetics of colorectal carcinoma. *Cancer* 1992; 70(5 Suppl): 1216-21.
  8. CORREA P. The gastric precancerous process. *Cancer Surv* 1983; 2: 437-50.
  9. TAHARA E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19: 484-8.
  10. TAHARA E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer* 1995; 75: 1410-17.
  11. FEARON E. Tumor suppressor genes. In: Vogelstein Bert KK, editor. *The genetic basis of cancer*. Second Edition ed. New York: Mc Graw Hill 2002; 197-206.
  12. CHOI SW, PARK SW, LEE KY, KIM KM, CHUNG YJ, RHYU MG. Fractional allelic loss in gastric carcinoma correlates with growth patterns. *Oncogene* 1998; 17: 2655-9.
  13. FANG DC, JASS JR, WANG DX. Loss of heterozygosity and loss of expression of the DCC gene in gastric cancer. *J Clin Pathol* 1998; 51: 593-6.
  14. NISHIZUKA S, TAMURA G, TERASHIMA M, SATODATE R. Loss of heterozygosity during the development and progression of differentiated adenocarcinoma of the stomach. *J Pathol* 1998; 185: 38-43.
  15. UCHINO S, TSUDA H, NOGUCHI M, YOKOTA J, TERADA M, SAITO T ET AL. Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 3099-102.
  16. CHO JH, NOGUCHI M, OCHIAI A, HIROHASHI S. Loss of heterozygosity of multiple tumor suppressor genes in human gastric cancers by polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1996; 74: 835-41.
  17. TAMURA G, MAESAWA C, SUZUKI Y, OGASAWARA S, TERASHIMA M, SAITO K ET AL. Primary gastric carcinoma cells frequently lose heterozygosity at the APC and MCC genetic loci. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 1015-8.
  18. SANZ-ORTEGA J, SANZ-ESPONERA J, CALDES T, GÓMEZ DE LA CONCHA E, SOBEL ME, MERINO MJ. LOH at the APC/MCC gene (5Q21) in gastric cancer and preneoplastic lesions. Prognostic implications. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 1206-10.
  19. BOLAND R. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)*. New York: Mac Graw-Hill 2002.
  20. CAHILL DLC. Basic concepts in genetics. In: Vogelstein B KK, editor. *The genetic basis of human cancer*. New York: Mc Graw-Hill 2002; 129-130.
  21. CHUNG YJ, PARK SW, SONG JM, LEE KY, SEO EJ, CHOI SW ET AL. Evidence of genetic progression in human gastric carcinomas with microsatellite instability. *Oncogene* 1997; 15: 1719-26.
  22. WOO DK, LEE WA, KIM YI, KIM WH. Microsatellite instability and alteration of E2F-4 gene in adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the stomach. *Pathol Int* 2000; 50: 690-5.
  23. CARETHERS JM, PHAM TT. Mutations of transforming growth factor beta 1 type II receptor, BAX, and insulin-like growth factor II receptor genes in microsatellite unstable cell lines. *In Vivo* 2000; 14: 13-20.
  24. ABE T, OUYANG H, MIGITA T, KATO Y, KIMURA M, SHIIBA K ET AL. The somatic mutation frequency of the transforming growth factor beta receptor type II gene varies widely among different cancers with microsatellite instability. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22: 474-7.
  25. SEMBA S, YOKOZAKI H, YAMAMOTO S, YASUI W, TAHARA E. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer* 1996; 77: 1620-27.
  26. MAESAWA C, TAMURA G, SUZUKI Y, OGASAWARA S, SAKATA K, KASHIWABA M ET AL. The sequential accumulation of genetic alterations characteristic of the colorectal adenoma-carcinoma sequence does not occur between gastric adenoma and adenocarcinoma [see comments]. *J Pathol* 1995; 176: 249-58.
  27. TAMURA G. Molecular pathogenesis of adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. *Pathol Int* 1996; 46: 834-41.
  28. TAMURA G, SAKATA K, NISHIZUKA S, MAESAWA C, SUZUKI Y, TERASHIMA M ET AL. Allelotype of adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. *J Pathol* 1996; 180: 371-7.
  29. SPEICHER M. Microsatellite instability in human cancer. *Oncol Res* 1995; 7: 267-75.
  30. BOLAND CR, THIBODEAU SN, HAMILTON SR, SIDRANSKY D, ESHLEMAN JR, BURT RW 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.
31. BOCKER T, DIERMANN J, FRIEDL W, GEBERT J, HOLINSKI-FEDER E, KARNER-HANUSCH J ET AL. Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res* 1997; 57: 4739-43.
  32. EMMERT-BUCK M, BONNER R, SMITH P, CHUAQUI R, ZHUANG Z, GOLDSTEIN S ET AL. Laser Capture Microdissection. *Science* 1996; 274: 998-1001.
  33. SIMONE N, BONNER R, GILLESPIE J, EMMERT-BUCK M, LIOTTA L. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trend Genet* 1998; 14: 253-94.
  34. SCHNEIDER BG, PULITZER DR, BROWN RD, PRIHODA TJ, BOSTWICK DG, SALDIVAR V ET AL. Allelic imbalance in gastric cancer: an affected site on chromosome arm 3p. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 13: 263-71.
  35. SIEBEN NL, TER HAAR NT, CORNELISSE CJ, FLEUREN GJ, CLETON-JANSEN AM. PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells. *Hum Pathol* 2000; 31: 1414-9.
  36. THIBODEAU S, FRENCH A, ROCHE P, CUNNINGHAM J, TESTER D, LINDOR N ET AL. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair system. *Cancer Res* 1996; 56: 4836-40.
  37. THIBODEAU SN, FRENCH AJ, CUNNINGHAM JM, TESTER D, BURGART LJ, ROCHE PC ET AL. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998; 58: 1713-8.
  38. LOEB L. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 5059-63.
  39. POTOCNIK U, GLAVAC D, GOLOUH R, RAVNIK-GLAVAC M. Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary non-polyposis colorectal cancer screening. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 126: 85-96.
  40. ESTELLER M, LEVINE R, BAYLIN SB, ELLENSON LH, HERMAN JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 1998; 17: 2413-7.
  41. FLEISHER AS, ESTELLER M, WANG S, TAMURA G, SUZUKI H, YIN J ET AL. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 1090-5.
  42. LEUNG SY, YUEN ST, CHUNG LP, CHU KM, CHAN AS, HO JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 159-64.
  43. HAYDEN J, MARTIN I, CAWKWELL L, QUIRKE P. The role of microsatellite instability in gastric carcinoma. *Gut* 1998; 42: 300-3.
  44. PROTOPOPOV A, KASHUBA V, ZABAROVSKA VI, MURAVENKO OV, LERMAN MI, KLEIN G ET AL. An integrated physical and gene map of the 3.5-Mb chromosome 3p21.3 (AP20) region implicated in major human epithelial malignancies. *Cancer Res* 2003; 63: 404-12.
  45. HOANG J, COTTU P, THUILLE B, SALMON R, THOMAS G, HAMELIN R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 300-3.
  46. ZHOU X, HOANG J, LI Y, SERUCA R, CARNEIRO F, SOBRINHO-SIMÕES M ET AL. Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 101-7.
  47. CHOI SW, CHOI JR, CHUNG YJ, KIM KM, RHYU MG. Prognostic implications of microsatellite genotypes in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 89: 378-83.
  48. MICHAEL-ROBINSON JM, REID LE, PURDIE DM, BIEMER-HUTTMANN AE, WALSH MD, PANDEYA N ET AL. Proliferation, apoptosis, and survival in high-level microsatellite instability sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2347-56.
  49. ARTUNEDO PE P, MORENO AZCOITA M, ALONSO A, FERNÁNDEZ-PERALTA A, GONZÁLEZ-AGUILERA JJ. Prognostic significance of high microsatellite instability in a Spanish series of gastric adenocarcinomas. *Anticancer Res* 2000; 20: 4009-14.
  50. NAKASHIMA H, INOUE H, HONDA M, SHIBUTA K, ARINAGA S, MORI M ET AL. The heterogeneity of microsatellite instability in multiple gastric cancers. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 653-6.
  51. MAO L, LEE D, TOCKMAN M, EROZAN Y, ASKIN F, SIDRANSKY D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9871-5.