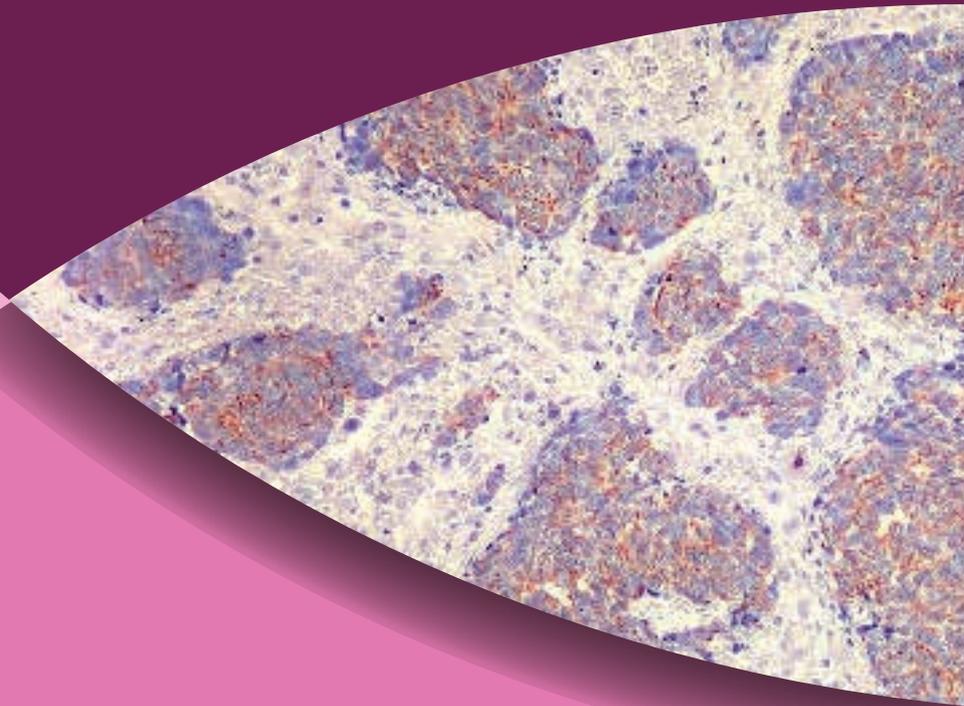


Instabilidade de Microssatélites (MSI) e Disfunção dos Genes de Reparo (dMMR)



Genes de Reparo e sua função

A renovação celular é um processo contínuo que ocorre em todos os seres vivos e é responsável pela homeostase tissular, regeneração e manutenção da estrutura e função do organismo. Esse processo de renovação celular é pautado em duas partes: a morte e a replicação celular.

Embora responsável pela manutenção do organismo, a replicação celular depende da replicação do DNA, num processo que pode acarretar erros de replicação por incorporação errada de bases, como A-G, ou slippages (derrapagens), resultando em loopings de inserção/deleção ou de substituição de pares de bases e levando a mutações pontuais ou da grelha de leitura (alteração do tripleto das bases - sequências de 3 nucleotídeos). No final, o resultado dessas mutações dependerá do grau da alteração, podendo ser silenciosas, causar pequenas alterações ou provocar doenças.

Contudo, nosso organismo lança mão de um processo de reparação dos erros de replicação que os reconhece e os corrige, o chamado “sistema de reparo de mal pareamento do DNA” ou MMR - Mismatch Repair, codificado pelos genes: MLH1, MSH6, MLH2, PMS2, dentre outros que em conjunto são chamados Genes de Reparo.

Os genes de reparo codificam 4 proteínas homônimas que atuam como heterodímeros: MLH1-PMS2 e MSH2-MSH6. Desse modo, mutações ou perda de função desses genes resultam na perda de expressão das proteínas e, conseqüentemente, à deficiência do processo de reparo (dMMR).

A PMS2 e MSH6 se ligam a MLH1 e MSH2, respectivamente, contudo, MSH2 e MLH1 podem se ligar a outras proteínas de reparo. Assim, uma alteração em MLH1 e/ou MSH2 causará degradação proteolítica, diferentemente das alterações em PMS2 e/ou MSH6, visto que MSH6 pode ser substituída por MSH3 na ligação com MSH2 e PMS2 poderá ser substituída pela PMS1 ou MLH3 na ligação com MLH1.

Há basicamente três mecanismos que levam a deficiências nos genes MMR: hipermetilação somática, mutações hereditárias e mutações somáticas. Deleções no gene EPCAM (que inativam um alelo específico do MSH2) ou a metilação do promotor do MLH1 (mutação esporádica, não germinativa) são exemplos de mutações atribuídas à dMMR.

Microssatélites

Microssatélites (MS) são sequências curtas e repetidas, em tandem, do DNA que possuem de 1 a 6 pares de base. Essas regiões encontram-se distribuídas de maneira aleatória e, apesar de na maioria das vezes estarem próximas a regiões codificantes, podem se localizar próximas às não codificantes. Por variar de indivíduo para indivíduo, o número de repetições dos MS acaba por ser considerado como uma identidade genética.

Durante muito tempo acreditava-se que essas repetições faziam parte das regiões não codificantes do DNA e que por isso não tinham importância em relação às sequências codificantes, mas, posteriormente, os MS passaram a ser associados a diversas funções e a processos carcinogênicos.

Instabilidade de Microssatélites

A alta propensão dos MS para mutações durante a replicação (polimorfismo) implica que o sistema de reparo (MMR) esteja íntegro para que suas correções possam ser realizadas. A ausência ou deficiência da função de reparo do DNA, mais precisamente a inativação das proteínas por alterações nos genes MMR, resulta em contrações ou expansões dos microssatélites. Essa condição é chamada de Instabilidade de Microssatélites - MSI - Microsatellite Instability.

A identificação de MSI pode auxiliar no diagnóstico da Síndrome de Lynch e dos vários tipos de carcinomas a ela associados, além de definir informações prognósticas e de predição de tratamento. Sabe-se, por exemplo, que a presença de MSI significa um melhor prognóstico no Carcinoma colorretal (CCR). Por outro lado, indivíduos com alta taxa de MSI não respondem bem a quimioterápicos à base de Fluorouracil.

Síndrome de Lynch e Tumores Associados

A Síndrome de Lynch é caracterizada por uma mutação hereditária (não esporádica) que leva à deficiência no mecanismo MMR e, conseqüentemente, à MSI. Sabe-se que a maioria dos pacientes com a síndrome apresenta mutação nos genes MLH1 e MSH2 (30 e 40% respectivamente), entretanto, essas mutações podem ocorrer também no MSH6, PMS2 e EPCAM.

A síndrome é considerada o fator de risco hereditário mais comum para CCR e está presente em 3% dos casos, mas também está associada a diversos outros tumores, como: endometrial, gástrico, urotelial, de ovário, de intestino delgado, de glândulas sebáceas e do sistema nervoso central. Em relação ao CCR, a síndrome de Lynch pode aumentar em cerca de 80% o risco de desenvolvimento, de modo que quando o indivíduo é diagnosticado com CCR, principalmente antes dos 50 anos de idade, a síndrome de Lynch é a principal suspeita.

Carcinoma Colorretal

O câncer colorretal (CCR) é um dos tipos de carcinoma mais incidentes no mundo, no Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 é de 41.010 novos casos diagnosticados.

Afeta um número ligeiramente maior de homens que mulheres e é mais comum em pessoas com mais de 50 anos de idade, porém, nos últimos 25 anos a incidência em pacientes mais jovens vem aumentando. Apesar de sua gravidade, é considerado curável e tratável quando diagnosticada precocemente.

O CCR pode ser somático (esporádico) ou hereditário, que representa 10 a 15% de todos os casos. Nesses casos há duas condições associadas ao seu desenvolvimento: a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), representando apenas 1% dos casos hereditários, e a síndrome de Câncer Colorretal Hereditário Não Poliposo (HNPCC), também classificada como Síndrome de Lynch por sua identificação em tumores extra-colônicos.

Aproximadamente 12% dos CCRs apresentam MSI esporádica sendo a mais comum a hipermetilação do promotor MLH1, onde 60% destes apresentam a mutação BRAF V600E. Já na síndrome de Lynch, o BRAF não apresenta mutações.

O desenvolvimento do CCR, na maioria das vezes, se dá por um pólipó na mucosa do cólon ou reto. Apesar dos pólipos serem comumente detectados por colonoscopia também na faixa etária de 50 anos, menos de 10% evoluem para carcinoma, mas, quando ocorre essa progressão, o processo pode levar de 10 a 20 anos.

A identificação de MSI por PCR ou imuno-histoquímica é utilizada para fins prognósticos no CCR e apresenta altos índices de especificidade. Para a identificação de outros carcinomas associados à síndrome de Lynch, embora a especificidade seja menor, o teste de MSI também é utilizado.

Carcinomas Extra-colônicos

Como mencionado, a síndrome de Lynch pode levar ao desenvolvimento não apenas do CCR, mas de muitos outros tipos de tumores extra-colônicos, dada sua principal característica, a presença de MSI. Mas apesar de esta ser uma característica genética presente em todos os tumores dMMR, vem sendo observada a repetição de sequências em loci específicos, que os diferenciam uns dos outros.

Alguns cânceres ginecológicos também apresentam a característica de mutação nos genes MMR. O câncer de ovário é a segunda neoplasia ginecológica mais comum, 95% é derivada das células epiteliais, os 5% restantes são oriundos de células germinativas e estromais. Embora o fator genético mais associado seja a presença de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, altos índices de mutações nos MS (MSI-High /MSI-H) estão presentes em cerca de 13% dos casos de câncer de ovário. Nos cânceres de endométrio, 20 a 30% apresentam MSI/dMMR sendo a maioria por metilação esporádica do MLH1, não existindo nesses casos correlação com a mutação BRAF V600E, porém, 2 a 5% desses cânceres são relacionados a Síndrome de Lynch. É importante ressaltar que há um risco de 40 a 60% dos pacientes com Lynch desenvolverem carcinomas endometrióides (incluindo carcinoma endometrial e carcinoma endometrióide do ovário).

Fenótipos MSI-H/dMMR são identificados também em alguns pacientes com câncer de próstata, de bexiga urinária, tireoide e até mesmo em leucemias. As descobertas em relação a quais genes estão afetados e quais loci apresentam mutações, permitem avaliações prognósticas e predição de tratamento com terapias personalizadas e específicas para cada tipo de tumor.

Detecção da Deficiência do Sistema de Reparação do DNA (dMMR)

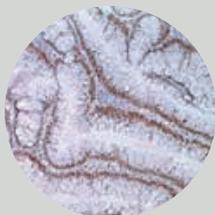
A instabilidade de microssatélites e a perda de expressão das proteínas de reparo são os marcadores utilizados para a identificação da dMMR. Os métodos utilizados para sua detecção são, respectivamente, o PCR ou NGS e a Imuno-histoquímica. Os testes são complementares e indicados para a identificação do MSI e MMR no amplo espectro dos cânceres associados a Síndrome de Lynch.

Determinação da Expressão Proteica dos Genes de Reparo - Imuno-Histoquímica

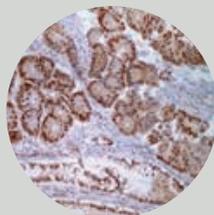
O método de imuno-histoquímica (IHC) utiliza o mecanismo antígeno-anticorpo para a ligação de um anticorpo marcado com coloração que se liga (ou não) a determinada estrutura, em geral, uma proteína. (para mais informações veja nosso material sobre imuno-histoquímica).

Na determinação da dMMR, são utilizados anticorpos que devem se ligar às proteínas de reparo, codificadas pelos respectivos genes (**MLH1**, **MSH2**, **MSH6** e **PMS2**). A ausência de marcação (ligação) para uma ou mais proteínas determina a presença de disfunção dos genes de reparo.

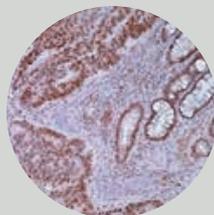
A - MLH1



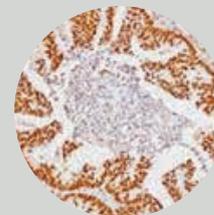
B - MSH2



C - PMS2



D - MSH2



Determinação de Instabilidade de Microssatélites - PCR ou NGS

A MSI é determinada por teste molecular de microssatélites específicos. Estes testes podem ser realizados com PCR (Polymerase Chain Reaction) ou NGS (Next-Generation Sequence). Para estes exames são necessários a comparação entre o teste do tecido normal e do tecido tumoral, pois, conforme dito anteriormente, os MS variam de indivíduo para indivíduo, mas deveriam ser coincidentes entre o tecido normal e o tumoral.

A utilização do teste molecular é indicada no caso de resultados indeterminados na Imuno-histoquímica, incluindo discordância, dificuldade de interpretação ou perda da expressão de apenas um heterodímero (apenas MSH1 ou apenas PMS2).

Para fins clínicos, de diagnóstico e de pesquisa, foram definidos painéis de referência e critérios para definição dos fenótipos MSI (Instabilidade de Microssatélites) e MSS (Estabilidade de Microssatélites).

Pesquisa por PCR

O painel principal consiste em: 2 mononucleotídeos (BAT25, BAT26) e 3 dinucleotídeos (D5S346, D2S123, D17S250), outros 19 loci alternativos também podem ser considerados. Outro painel com 5 mononucleotídeos (BAT26, BAT26, NR-21, NR-24, NR-27) pode ser considerado como um padrão para realização. Ambos os painéis vêm sendo amplamente utilizados na identificação de MSI. A classificação utilizada é:

- **MSI-H (microsatellite instability-high):** 2 ou mais loci do painel principal (5 regiões) ou >30% no painel ampliado;
- **MSI-L (microsatellite instability-Low):** <2 loci do painel principal ou <30% no painel ampliado.

Pesquisa por NGS

A pesquisa por NGS é uma alternativa ao PCR, com a principal vantagem da determinação do TMB (Tumoral Mutacional Burden - Carga Mutacional Tumoral).

Embora seja um exame de maior custo, o NGS tem a vantagem de pesquisar uma grande quantidade de genes alvo com grande velocidade.

Prognóstico e Predição de Tratamento, PDL1 e TMB

A classificação morfológica ainda é o principal determinante do prognóstico e do tratamento do CCR. Contudo, principalmente nos estágios mais precoces (estágio II comparado ao estágio II), a presença de dMMR/MSI está associada a um melhor prognóstico da doença.

Embora exista a recomendação de que todos os pacientes com CCR recebam tratamento com quimioterapia por 5-Fluorouracil, pacientes com CCR com MSI parecem não se beneficiar desse protocolo.

O fator preditivo mais importante até o momento parece ser a resposta á inibidores do PD-L1. Pacientes com MSI/dMMR se beneficiam de drogas como o pembrolizumabe ou o nivolumab associado ao ipilimumab.

Neste sentido, a avaliação da expressão do PD-L1 por imuno-histoquímica pode auxiliar na predição do tratamento com inibidores do PD-1/PD-L1.

CÓDIGO	EXAME	MATERIAL
IHQ	Painel de imuno-histoquímica pequeno - até 5 marcadores	Bloco de Parafina
IMS	Instabilidade de microssatélites	Bloco de Parafina Sangue Total
PDL1	Imuno-histoquímica para PD-L1 (SP263)	Bloco de Parafina
BRAG	Pesquisa da mutação V600E do gene BRAF	Bloco de Parafina
COLONM	Câncer colorretal análise de duplicações e deleções	Sangue Total
EGPCAM	Estudo do gene EPCAM	Sangue Total
EMCAPF	Estudo molecular para câncer de pâncreas familiar	Sangue Total
ESPC	Estudo de síndromes de predisposição ao câncer	Sangue Total
GMLH1	Estudo do gene MLH1	Sangue Total
GMSH2	Estudo do gene MSH2	Sangue Total
LYNCHM	Estudo de deleções e duplicações dos genes MLH1, MSH2 e EPCAM (Síndrome de Lynch)	Sangue Total
MLH1	Estudo molecular do gene MLH1	Sangue Total
MLPCH	Análise de duplicações/deleções para câncer hereditário	Sangue Total
MSH2	Estudo molecular da síndrome de LYNCH (MSH2)	Sangue Total
MSH6	Estudo molecular da síndrome de LYNCH (MSH6)	Sangue Total
PCOLON	Painel para câncer colorretal - NGS e MLPA	Sangue Total
PMPLY	Painel molecular para LYNCH	Sangue Total
PPOST	Painel molecular para estudo do câncer de próstata hereditário	Sangue Total

Referências

- LACEY M. MSI Testing and IHC disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/white-papers/msi-testing-and-ihc.html>. Acesso em: Out 2020.
- AHMED M. et al. Colon cancer: A clinician's Perspective in 2019. *Gastroenterology Res.* 2020 Feb; 13 (1): 1-10.
- LI K. et al. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int.* 2020 Jan, 13; 20: 16.
- Medex Consulting Dr Prudence Scott. A review of the current testing methodologies for the detection of mismatch repair deficiency in tumours. 2020 Jan.
- SANDA, Martin G. et al. Clinically localized prostate cancer: AUA/ASTRO/SUO guideline. *American Urological Association.* 2017.
- ROBERTS J. et al. PD-L1 Expression Patterns in Microsatellite Instability-High Intestinal Adenocarcinoma Subtypes. *Am J Clin Pathol.* 2019 Sept, 152 (3): 384-91
- MAGI-GALLUZZI, C. Prostate cancer: diagnostic criteria and role of immunohistochemistry. *Modern Pathology*, 31, S12-S21; 2018
- LUCHINI C. et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol.* 2019 Aug, 1:30 (8): 1232-43.
- KOK M, CHALABI M, HAANEN, J. How I treat MSI cancers with advanced disease. *ESMO Open.* 2019 May, 21:4 (2): e000511
- OLIVEIRA AF, BRETES L, FURTADO I. Review of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Metastatic dMMR/MSI-H. *Colorectal Cancer.* *Front Oncol.* 2019 May, 9: 396.
- MORIHIRO T. et al PD-L1 expression combined with microsatellite instability/CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a useful prognostic biomarker in gastric cancer. *Sci Rep.* 2019 Mar, 9 (1): 4633
- GUPTA R, SINHA S, PAUL RN. The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer.* 2018 Jul, 42 (6): 548-59
- LE DT, et al. Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017 Jul; 28; 357(6349): 409-413.
- WANG Y, et al. Differences in microsatellite instability profiles between Endometrioid and colorectal cancers. A potential cause for false-negative results? *J Mol Diagn.* 2017 Jan; 19 (1): 57-64.
- KAWAKAMI H, ZANAN A, SINICROPE FA. MSI testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2015 July; 16 (7): 30.
- LEE JH et al. Association between IHC and MSI testing to identify mismatch repair-deficient patients with ovarian cancer. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014 Apr; 18 (4): 229-35.
- LOSSO GM et al. Instabilidade de microssatélite - MSI nos marcadores (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) no câncer de reto.
- ABCD Arq Bras Cir Dig. 2012; 25 (4): 240-244.
- CAP - POET REPORT. Prognostic Uses of MSI Testing. 2011 May