



■ Artículo original

Prevalencia de expresión de genes MLH1 y MSH2 en pólipos serrados colorrectales y su correlación morfológica y citoarquitectural

Redrobán L,¹ Reyes MS,¹ Montalvo N.²

1 Postgrado de Anatomía Patológica, Universidad Central del Ecuador. Quito-Ecuador.

2 Servicio de Patología, Hospital Metropolitano. Quito-Ecuador.

Recibido el 18 de Julio de 2011; aceptado el 17 de octubre de 2011.

■ Resumen

Introducción: Los pólipos serrados del colon comprenden un grupo heterogéneo de lesiones. Estas lesiones han sido consideradas como precursoras de cáncer y parte de una vía alterna de carcinogénesis colorrectal asociada a inestabilidad microsatelital.

Objetivo: Determinar la prevalencia de expresión de MLH1 y MSH2 en pólipos serrados colorrectales y establecer correlación con características citoarquitecturales y morfológicas.

Métodos: Se realizó un estudio descriptivo de 164 pólipos serrados colorrectales. Se evaluaron sus características morfológicas, citoarquitecturales y la expresión por inmunohistoquímica de los ge-

Palabras clave:
Pólipos, pólipos serrados, cáncer colo-rectal, genes, carcinogénesis, Ecuador.

■ Abstract

Introduction: Serrated polyps of the large intestine comprise a diverse group of lesions of the colonic mucosa that includes hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas and traditional serrated adenomas. These lesions have been considered precursors of colorectal carcinogenesis associated with microsatellite instability.

Objective: To determine the prevalence of the MLH1 and MSH2 mutations in serrated polyps and to correlate with morphological and cytoarchitectural characteristics.

Methods: A descriptive study of 164 serrated colorectal polyps was performed. Tissue microarray technique was used to analyze their morphological

Keywords:
Polyps, colorectal neoplasms, serrated polyps, genes, carcinogenesis, Ecuador.

nes MLH1 y MSH2 en las diferentes regiones de las criptas colónicas.

Resultados: Se incluyeron: 159 pólipos hiperplásicos, dos adenomas sésiles serrados y tres adenomas serrados tradicionales. No existió diferencia significativa del grado de expresión para MLH1 y MSH2 entre pólipos hiperplásicos y adenomas serrados. Además la expresividad fue disminuyendo desde la base hacia la superficie de la cripta, donde fue negativa. Este hallazgo no fue criterio suficiente de inestabilidad microsatelital.

Conclusiones: La prevalencia de la expresión de MLH1 y MSH2 fue similar en pólipos hiperplásicos y adenomas serrados. No se encontró correlación con características cito-arquitecturales y morfológicas.

and cytoarchitectural features and immunohistochemical expression of the MLH1 and MSH2 mutated genes in different regions of the colonic crypts.

Results: One-hundred and fifty-nine hyperplastic polyps, 2 sessile serrated adenomas and 3 traditional serrated adenomas were included. There was no significant difference in the immunohistochemical expression between hyperplastic polyps and serrated adenomas for MLH1 and MSH2. Moreover, the degree of expression decreased from the base toward the surface of the crypt where it was negative. This finding was not a sufficient to qualify for microsatellite instability.

Conclusions: The prevalence of the MLH1 and MSH2 mutated genes were similar between hyperplastic polyps and serrated adenomas. No correlation was found with morphological and cytoarchitectural characteristics.

■ Introducción

El desarrollo normal de la mucosa colónica se basa en la interacción compleja de varios compartimentos histológicos: criptas, lámina propia y muscular de la mucosa. Una cripta colónica está constituida por tres regiones histológicas: una región basal o proliferativa, un estrato superficial o diferenciado y una región intermedia dispuesta en medio de las dos anteriores, cuyo comportamiento está mediado por vías de señalización génica intra y extracelular. En condiciones fisiológicas normales, la maduración, la diferenciación y la renovación del epitelio de la cripta colónica es gradual desde la base hacia la superficie. En ciertas condiciones existen patrones anormales de proliferación y diferenciación celular que pueden inducir cambios en el fenotipo de la mucosa colónica, dando origen a lesiones benignas reversibles (pólipos hiperplásicos) o malignas irreversibles (carcinoma).^{1,2}

Los pólipos de la mucosa colorectal son un conjunto de lesiones tumorales comunes en la edad adulta. Son clasificados por sus características histológicas en pólipos no neoplásicos (pólipo hiperplásico o metaplásico), que carecen de

potencial maligno y pólipos neoplásicos (adenoma convencional) considerados lesiones pre-malignas, implicadas en la secuencia adenoma-carcinoma de la carcinogénesis colónica. El término pólipo serrado se aplica a un grupo heterogéneo de lesiones cuya característica histológica común es la arquitectura serrada que adopta el epitelio colorrectal. Este grupo incluye: pólipo hiperplásico (PH), adenoma sésil serrado (ASS) y adenoma serrado tradicional (AST).³⁻⁷

En las dos últimas décadas el estudio de lesiones serradas ha ganado gran relevancia, al punto de llegar a considerar a los pólipos serrados como lesiones premalignas dentro del espectro de una vía alterna de la carcinogénesis colorrectal: la "vía serrada" asociada a inestabilidad micro-satelital (IM). Entre las alteraciones genéticas y moleculares identificadas tenemos: mutación o hipermetilación en los genes BRAF, KRAS, APC, p53 y en el sistema *Mismatch Repair* (MMR), grupo de genes que corrige errores durante la replicación del ADN.⁸⁻¹² El sistema MMR está constituido básicamente por cuatro genes: MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 cuyas mutaciones, especialmente de MLH1 y MSH2, ocasionan inestabilidad de micro-satélites (IM). Para

algunos autores existe controversia con respecto a la presencia o no de IM en pólipos serrados, sobre todo en pólipos hiperplásicos.¹³⁻¹⁹

■ Objetivo

Determinar la prevalencia de expresión de MLH1 y MSH2 en pólipos serrados colorrectales y establecer correlación con características cito-arquitecturales y morfológicas.

■ Métodos

Se revisaron los informes de histopatología del Servicio de Patología del Hospital Metropolitano de Quito, Ecuador, de especímenes obtenidos por colonoscopia, de pacientes adultos con edades entre 20 y 70 años, de ambos sexos, durante el período comprendido de enero a diciembre de 2009. Su localización fue dividida en cinco regiones: ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente y recto-sigmoides. Seleccionamos aquellos casos con diagnóstico de pólipo hiperplásico, adenoma sésil serrado y adenoma serrado tradicional. Se excluyeron los casos de adenomas puros (tubular, vellosos, tubo-vellosos), pólipos hiperplásicos incipientes (menores de 3 mm), pacientes con antecedentes de poliposis familiar, adenocarcinoma colorrectal, enfermedad inflamatoria intestinal e individuos menores de 20 años y mayores de 70 años. Se eliminaron todas aquellas muestras en las que se detectaron fallas de técnica de inmunohistoquímica o agotamiento de tejido. Todas las biopsias fueron fijadas en formol y embebidas en parafina, posteriormente cortadas a 4 µm de espesor

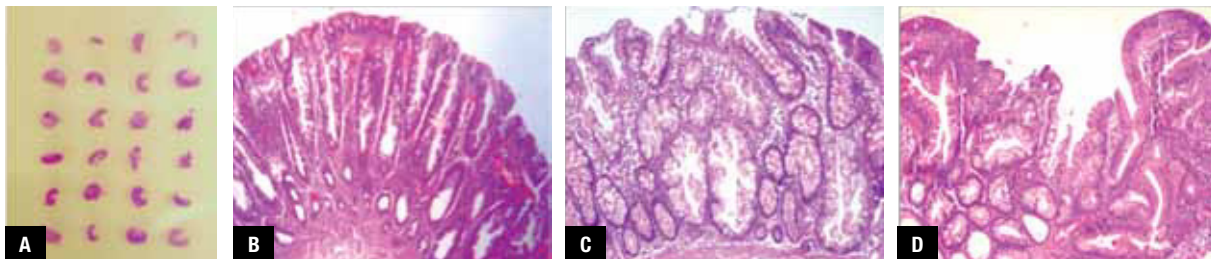
y finalmente teñidas con hematoxilina/eosina. Se revisaron las laminillas de los casos seleccionados para confirmar el diagnóstico histopatológico de acuerdo a los criterios actualmente aceptados.⁶ Seleccionamos los pólipos serrados distribuidos indistintamente a lo largo del colon y recto-sigmoides. Finalmente elaboramos manualmente los micro-arreglos tisulares (**Figura 1**).^{20,21}

Se realizó un estudio epidemiológico descriptivo de conjunto, con la finalidad de establecer la prevalencia de expresión de genes del sistema MMR en pólipos serrados colorrectales. La información del presente estudio fue recopilada en un formulario específico creado para el efecto, a partir del cual se creó una base de datos en Microsoft Excel para su posterior limpieza y análisis en Epi-Info 2000.

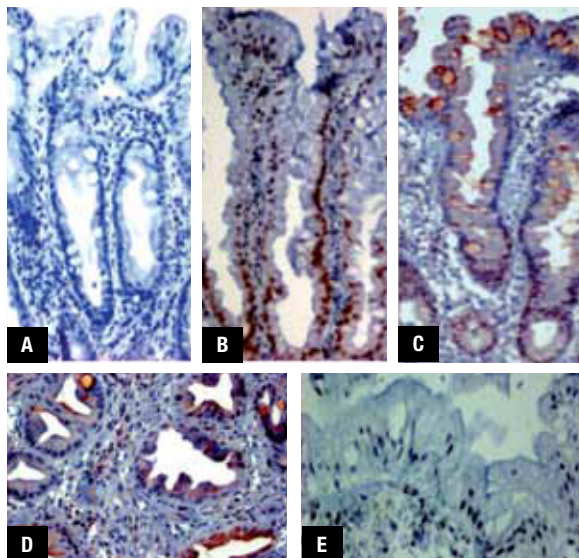
Técnica de Inmunohistoquímica. En secciones de 4 µm de micro-arreglo tisular se realizó técnica de inmunohistoquímica aplicando los anticuerpos MLH1 y MSH2 (Cell Marque 6600 Sierra College Blvd. Rocklin, CA 95677 USA), siguiendo métodos estandarizados. Las células estromales, población linfocítica y mucosa colónica normal sirvieron de controles positivos internos para evaluar la expresión normal de estos genes. Las lesiones polipoides mostraron expresión nuclear normal, pérdida parcial o total (**Figura 2**).

Análisis estadístico. El cálculo de la muestra se planteó para universo infinito y considerando la condición cualitativa de la variable de estudio, empleando la siguiente fórmula: $n = pxqz2/e2$. Donde: p = probabilidad de ocurrencia (21%) = 0.21¹⁴ q = probabilidad de no ocurrencia (79%) =

■ **Figura 1.** a) Micro-arreglo Tisular H/E b) Pólipo hiperplásico: arquitectura serrada y criptas orientadas perpendicularmente a la muscular de la mucosa, HE x4. c) Adenoma Sésil Serrado: dilatación o ramificación de las criptas de la base con células calciformes ectópicas, HE x10. d) Adenoma Serrado Tradicional: arquitectura vellosa y serrada, criptas ectópicas con citoplasma amplio y eosinófilo, HE x10.



■ **Figura 2.** a) Pérdida de expresión nuclear del gen MLH1 en la totalidad de un PH (x10). b) Expresión nuclear para MLH1 decreciente desde la base hacia la superficie en un PH (x4). c) Expresión nuclear para MSH2 decreciente desde la base hacia la superficie en un PH (x4). d) Expresión nuclear variable para MLH1 en el tercio basal de un AST (x40). e) Patrones combinados de expresión para MLH1, en el estrato superficial de un PH (x10). Control interno presente en todos los casos.



0.79, $z =$ nivel de significación (95%) = 1.96, $e =$ error de inferencia (8%) = 0.08. Reemplazando: $n = 0.21 \times 0.79 \times 1.96^2 / 0.08^2 = 129$. El tamaño mínimo requerido fue de 129 muestras. Las variables cuantitativas se expresaron en promedios y desviaciones estándar y las cualitativas en frecuencias simples y porcentajes. El grado de relación entre las características citoarquitecturales de los pólipos y la presencia de inestabilidad microsatelital se hizo empleando *Chi cuadrada*, en tanto que el grado de correlación se estableció empleando Coeficiente de Contingencia de Pearson. La prevalencia de inestabilidad se expresó en porcentaje acompañada de su correspondiente intervalo de confianza a 95%. Las diferencias de prevalencia de expresividad se establecieron empleando *t* de diferencia de proporciones para grupos no independientes. Para todas las pruebas diferenciales se aceptó como válido un nivel de significación de 95% ($\alpha = 0.05$).

■ Resultados

Se estudiaron un total de 164 pólipos serrados provenientes de igual número de pacientes: 159 pólipos hiperplásicos (PH), dos adenomas sésiles serrados (ASS) y tres adenomas serrados tradicionales (AST). La edad promedio de los pacientes fue de 54.8 ± 9 años (rango: 24 a 69 años), con 52.4% ($n = 86$) de hombres.

En cuanto a las características endoscópicas de los pólipos, 63.4% ($n = 104$) fueron sésiles. Al analizar su localización, predominaron los ubicados en recto-sigmoides (62.2%). En cuanto al número de pólipos encontrados, la mediana fue de dos (rango: 1 a 15). El diámetro mayor de los pólipos estudiados fue de 4.3 mm (rango: 3 mm a 25 mm). Al analizar el tipo histológico de pólipo, 97% ($n = 159$) fueron pólipos hiperplásicos y los restantes fueron adenomas serrados (2 ASS y 3 AST).

Cuando se realizó la determinación de la expresión de genes MLH1 y MSH2, se detectaron fallas de técnica (1.8% y 3%, respectivamente), así como agotamiento de tejido (12.8% y 17.7%, respectivamente) y estos casos fueron excluidos del análisis. La prevalencia de expresión de MLH1 y MSH2, por tipo histológico se detalla en la **Tabla 1**. Únicamente 2 PH mostraron pérdida de expresión nuclear en toda la lesión para el gen MLH1. La prevalencia de expresión por tipo de marcador MLH1 y MSH2, por zona histológica, se presentan en la **Tabla 2**.

■ Discusión

El presente estudio trata de determinar la prevalencia de expresión de genes del sistema MMR en 164 biopsias de lesiones polipoides serradas colorrectales, por técnica de inmunohistoquímica de los genes MLH1 y MSH2, cuya función alterada o deficiente se ha propuesto como vía alterna de histogénesis en pólipos serrados (hiperplásicos y adenomas serrados) colorrectales. Existe controversia sobre la presencia o no de expresión nuclear en pólipos serrados.²²⁻²⁵

Este es el primer estudio realizado en Ecuador, que investiga el comportamiento de las lesiones serradas aplicando esta técnica. En nuestra muestra, predominaron los hombres, dato semejante a otras series, a pesar de que no se describe asociación de riesgo por género.²⁶⁻²⁹ En cuanto a las características

■ **Tabla 1.** Expresión por tipo histológico de pólipo serrado.

Tipo histológico	MARCADOR n (%)	
	MLH1 (n = 140)	MSH2 (n = 130)
Pólipo hiperplásico (PH)	135 (95)	125 (96.1)
Adenoma séstil serrado (ASS)	2 (1.4)	2 (1.5)
Adenoma serrado tradicional (AST)	3 (2.1)	3 (2.3)

endoscópicas de los pólipos analizados, la morfología predominante fue la séstil, hallazgo similar a los resultados de otros estudios.³⁰⁻³⁵ De igual forma, prevalecieron los pólipos ubicados en el recto-sigmoides.³⁶⁻³⁹ Al valorar el grado de expresión nuclear de los anticuerpos se observó franca variación según la región histológica, pero no por el tipo de pólipo. Únicamente en dos pólipos hiperplásicos se observó la pérdida de expresión para MLH1 en toda la lesión (**Figura 2a**). Algunas series describen pérdida de expresión de MLH1 exclusivamente en adenomas séstiles serrados, mientras que otras mencionan pérdida de expresión en PH y ASS localizados en el colon derecho.⁴⁰⁻⁴² Llamó la atención la constante expresión nuclear en las células de la base de las criptas para MLH1 en 98.6% y para MSH2 en 100% de los casos. Dicha expresión fue disminuyendo de intensidad al aproximarse a la superficie de la cripta donde es negativa, hallazgos idénticos a los descritos previamente (**Figuras 2b a 2d**). Esto último, estaría asociado a alteraciones en el ciclo y proliferación celular o por acumulación de señales inhibitorias de apoptosis, específicamente descritas en pólipos serrados. Sin embargo, esta pérdida superficial de expresión no es suficiente para establecer inestabilidad microsatelital.⁴³ Una observación inédita, fue identificar en un mismo pólipo patrones combinados de expresión: parcelas de epitelio superficial con predominio de positividad débil que alternan con otras negativas y viceversa (**Figura 2e**).

Los datos que proporciona este estudio revelan que en la población estudiada no existe pérdida significativa de expresión de genes MMR en pólipos serrados. La prevalencia de ausencia de expresión en pólipos serrados (n = 140) para el gen MLH1 fue de 1.4%. Este hallazgo establece que la IM no participa en la histogénesis de las lesiones polipoides serradas colorectales. No existió diferencia

■ **Tabla 2.** Prevalencia de expresión nuclear por tipo de marcador y zona histológica.

Zona histológica	Marcador - Prevalencia % (IC 95%)	
	MLH1 (n = 140)	MSH2 (n = 130)
Cripta (Base)	98.6 (96.6 - 100)	100 (NC)
Intermedia	96.4 (99.3 - 99.5)	96.2 (92.9 - 99.4)
Cripta (Superficie)	24.3 (17.2 - 31.4)	51.5 (42.9-60.1)

NC = Intervalo de confianza no calculable

Se considera como no calculable un intervalo de confianza cuando uno de los límites del mismo supera 100%, esto probablemente debido a un efecto del número sobre su fórmula general de cálculo $IC = p \pm z \sqrt{\frac{pq}{n}}$ o cuando la característica se presenta en 100% de la población estudiada.

significativa de expresividad entre pólipos hiperplásicos y adenomas serrados (ASS y AST). El estrato superficial de lesiones serradas es heterogéneo con alternancia de expresión nuclear para genes de IM. La pérdida de expresión nuclear limitada a esta región del pólipo serrado, no es criterio suficiente de inestabilidad micro-satelital.

■ Conclusión

La prevalencia de la expresión de MLH1 y MSH2 fue similar en los pólipos hiperplásicos y los adenomas serrados. Dicha expresión fue disminuyendo desde la base hacia la superficie de la cripta, donde fue negativa. Este hallazgo no fue criterio suficiente de inestabilidad micro-satelital.

■ Agradecimiento:

A la Dra. Joanne Young PhD, Jefe del Laboratorio de Investigación de Cáncer Familiar. Instituto de Investigación Médica Queensland, Australia por compartir sus hallazgos. A María Eugenia Mejía y César Vaca (tecnólogos) por su valioso apoyo técnico.

Referencias

1. Tolakovic E, Gomez J, Driman D, et al. Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA). *Am J Surg Pathol* 2008;32:21-29.
2. Tanaka T. Colorectal Carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinogen* 2009;8:1-19.
3. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2010;138:2088-2100.
4. Aust D, Barreton G. Serrated polyps of the colon and the rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenoma, traditional serrated adenoma and mixed polyps) - proposal for diagnostic criteria. *Virchow Arch* 2010;10:1-7.

5. Fenoglio C, Noffsinger A, Stemmermann G, et al. *Gastrointestinal Pathology*. 3^{ra} Ed, Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
6. Snover DC, Batts KP. Serrated colorectal neoplasia. *Surg Pathol Clin* 2010;3:207-240.
7. Harvey N, Ruzkiewicz A. Serrated neoplasia of the colorectum. *World J Gastroenterology* 2007;13:3792-3798.
8. Perucho M. Microsatellite Instability: the mutator that mutates the others mutator. *Nat Med* 1996;2:630-631.
9. Redrobán L, Montalvo N. Inestabilidad microsatelital en neoplasias colorectales. *Rev Metro Ciencia* 2009;18:103-109.
10. Liang J, Alrawi S, Tan D. Nomenclature, molecular genetics and clinical significance of the precursor lesions in the serrated polyp pathway of colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2008;1:317-324.
11. Watson A, Jankowski J. Hyperplastic polyps, serrated adenomas, and the serrated polyp neoplasia pathway. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2007;3:3-9.
12. Yashiro M, Laghi L, Saito K, et al. Serrated adenomas have a pattern of genetic alterations that distinguishes them from other colorectal polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2253-2256.
13. Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancer with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Nat Cancer Inst* 2001;93:1307-1313.
14. Jass JR, Young J, Leggett B. Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancer of the colorectum. *Histopathology* 2000;37:295-301.
15. Iino H, Jass JR, Simms LA, et al. DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol* 1999;52:5-9.
16. O'Brain V, Brown R. Signaling cell cycle arrest and cell death through MMR system. *Carcinogenesis* 2006;27:682-692.
17. Chan T, Zhao W, Leung S. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res* 2003;15:4878-4881.
18. Yashiro M, Laghi L, Saito K, et al. Serrated adenoma have a pattern of genetic alterations that distinguishes them from other colorectal polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2253-2256.
19. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: Opportunities and limitations. *Lab Invest* 2001;81:1331-1339.
20. Parsons MA, Grabsch H. How to make tissue microarrays. *Diagn Histopathol* 2009;15:142-149.
21. Srivastava A, Redston M, Farraye F, et al. Hyperplastic/Serrated polyposis in inflammatory bowel disease. *Am J Surg Pathol* 2008;32:296-303.
22. Longacre TA, Fenoglio-Preiser C. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas: A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1990;14:524-537.
23. Dong SM, Lee EJ, Jeon ES, Park CK, Kim KM. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Mod Pathol* 2005;18:170-178.
24. Sandmeier D, Benhattar J, Martin P, Bouzourene H. Serrated polyps of the large intestine: a molecular study comparing sessile serrated adenomas and hyperplastic polyps. *Histopathology*. 2009;55:206-213.
25. Yantiss RK, Oh KY, Chen YT, et al. "Filiiform" serrated adenomas. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1238-1245.
26. O'Brien MJ, Yang S, Clebanoff JL, et al. Hiperplastic (serrated) polyps of the colorectum. *Am J Surg Pathol* 2004;28:423 - 434.
27. De la Chapelle A. Microsatellite instability. *N Engl J Med* 2003;349:3-4
28. Jass JR, Young J, Leggett BA. Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum. *Histopathology* 2000;37:295-301.
29. Abdel-Rahman WM. Genomic instability and carcinogenesis: An update. *Current Genomics* 2008;9:535-541.
30. Farris AB, Misdradi J, Srivastava A, et al. Sessile serrated adenoma. *Am J Surg Pathol* 2008;32:30-35.
31. Bokhary R. Serrated colonic polyps in a teaching hospital in Saudi Arabia: Prevalence and review of classification. *Saudi J Gastroenterol* 2009;15:243-248.
32. Wynter C, Leggett B, Young J, et al. Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. *Gut* 2004;53:573-580.
33. Talbot I, Price A, Salto-Tellez M. Biopsy pathology in colorectal disease. 2nd Ed, Hodder Headline; 2007.
34. Suehiro Y, Hinoda Y. Genetic and epigenetic changes in aberrant crypt foci and serrated polyps. *Cancer Sci* 2008;99:1071-1076.
35. Noffsinger A. Serrated polyps and colorectal cancer: New pathway to malignancy. *Annu Rev Pathol* 2008;4:343-364.
36. Minno P, Baker K, Goswami R, et al. Extensive DNA methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis. *Gut* 2006;55:1467-1474.
37. Morimoto L, Newcomb P, Ulrich C, et al. Risk factor for hyperplastic and adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1012-1018.
38. Longacre T, Fenoglio-Preiser C. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas: A distinct Form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1990;14:524-537.
39. Liang J, Alrawi S, Tan D. Nomenclature, molecular genetics and clinical significance of the precursor lesions in the serrated polyp pathway of colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2008;1:317-324.
40. Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: Structure, function and evolution. *Mol Biol Evol* 2004;21:991-1007.
41. Dong SM, Lee EJ, Jeon ES, et al. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Mod Pathol* 2005;18:170-178.
42. Bigler J, Ulrich CM, Kawashima T, et al. DNA repair polymorphisms and risk of colorectal adenomas or hyperplastic polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2501-2508.
43. Vakiani E, Yantiss R. Pathologic features and biologic importance of colorectal serrated polyps. *Adv Anat Pathol* 2009;16:79-91.