



**Universidad de Concepción  
Facultad Farmacia**

**IMPLEMENTACIÓN DE ANÁLISIS DE  
MICROSATÉLITES COMO TÉCNICA ASOCIADA AL  
DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE LYNCH.**

**POR MARTÍN IVÁN SALGADO SENN**

Trabajo de Investigación de Internado en Sector Salud presentado a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico.

Profesora guía/Patrocinante: BQ. Susana Andrea Pineda Contreras.  
Laboratorio de Patología Molecular, Unidad de Anatomía Patológica,  
HGGB. Laboratorio de Diagnóstico Clínico Molecular-UDEC, Facultad de  
Medicina Universidad de Concepción.

Diciembre, 2021  
Concepción, Chile

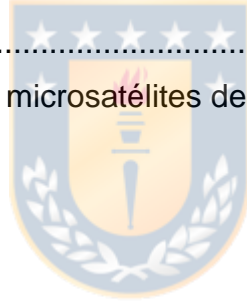
Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
2.1. Síndrome de Lynch .....	13
2.2. Diagnóstico del Síndrome de Lynch.....	14
2.3. Inmunohistoquímica (IHQ).....	17
2.4. Análisis de inestabilidad de microsatélite .....	18
2.5. Análisis de la mutación BRAF V600E y ensayos de metilación .....	19
2.6. Ensayos de secuenciación somáticos y/o germinales.....	20
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	24
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	27
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVOS .....	28
6.1 Objetivo general .....	28
6.2 Objetivos específicos .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
7.1 Revisión bibliográfica de los artículos relevantes sobre el síndrome de Lynch y su diagnóstico.....	29
7.2 Evaluación de recursos necesarios para la implementación del análisis de microsatélites. ....	30
7.3 Evaluación de recursos disponibles en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB. ....	31
7.4 Evaluación de costos de los reactivos no disponibles en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB. ....	32
7.5 Aspectos éticos y de bioseguridad .....	32
RESULTADOS .....	34

8.1. Revisión de las técnicas comúnmente utilizadas para el estudio de los microsatélites.....	34
8.2. Evaluación de recursos necesarios para la implementación del análisis de microsatélites por electroforesis capilar. ....	36
8.3. Evaluación de recursos disponibles en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB para la implementación del análisis de microsatélites por electroforesis capilar. ....	38
8.4. Evaluación de costos de los reactivos no disponibles en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB. ....	39
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES .....	50
PROYECCIONES.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	52
ANEXOS.....	57
Anexo 1: Marcadores de microsatélites del panel de Bethesda.....	57



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I:</b> Principales ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas para el análisis de fragmentos de microsatélites. (Baudrin, L. G. y col., 2018) (Janavicius, R. y col., 2010) (Deschoolmeester, V. y col., 2006). .....	35
<b>Tabla II:</b> Recursos necesarios para la implementación del análisis de microsatélites según la etapa de la metodología. ....	37
<b>Tabla III:</b> Disponibilidad de recursos en el laboratorio de Patología Molecular HGGB según los recursos necesarios para la implementación del análisis de microsatélites. ....	38
<b>Tabla IV:</b> Costos estimados de los recursos no disponibles en el laboratorio de Patología Molecular según la empresa cotizada. ....	39
<b>Tabla V:</b> Kit de detección de MSI ofrecido por la empresa Thermofisher. ....	41
<b>Tabla VI:</b> Ensayo de detección de MSI Idylla ofrecido por la empresa Biocartis. ....	42

## RESUMEN

El síndrome de Lynch es un trastorno autosómico dominante que predispone al cáncer de colon, producto de mutaciones en la línea germinal de los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*, involucrados en la reparación del ADN. Una característica clave es la presencia de inestabilidad de microsatélite presente en el tumor. Para determinar si frente a la sospecha del síndrome es necesario realizar un estudio genético basado en secuenciación, el análisis de la inestabilidad de microsatélite y la inmunohistoquímica se vuelven dos técnicas relevantes en el diagnóstico para un tamizaje precoz de sujetos portadores de estas mutaciones. Actualmente, la Unidad de Anatomía Patológica del HGGB realiza solo la inmunohistoquímica, la cual no permite determinar en un 100% si se trata de un caso de síndrome de Lynch. Nos planteamos como hipótesis que un PCR convencional para realizar el análisis de microsatélites permitiría mejorar la pesquisa de pacientes con sospecha de Síndrome de Lynch en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB. Se analizará la viabilidad de la implementación mediante la determinación de los recursos necesarios y los disponibles, seguido de un análisis de costos para los recursos no disponibles por el laboratorio. De esta forma se busca contribuir a futuro en la implementación del análisis de microsatélite para aportar en el diagnóstico del síndrome de Lynch a nivel local.

## ABSTRACT

Lynch syndrome is an autosomal dominant disorder that predisposes to colon cancer due to germline mutations in genes MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2, all of which are involved in DNA repair. A fundamental characteristic is the presence of microsatellite instability in the tumor. In order to determine if a genetic study based on sequencing is necessary in view of the suspicion of the syndrome, the analysis of microsatellite instability and immunohistochemistry become two relevant techniques in the diagnosis for an early screening of subjects carrying these mutations. Currently, the HGGB Pathological Anatomy Unit only performs immunohistochemical analysis, which is not a 100% accurate in the detection of Lynch syndrome. The hypothesis of this project claims that a conventional PCR to perform microsatellite analysis would improve the screening of patients with suspected of Lynch Syndrome in the HGGB Molecular Pathology laboratory. The viability of the implementation will be analyzed through the determination of the necessary and available resources, followed by a cost analysis for the non-available resources in the laboratory. In this way, we hope to contribute to the future of microsatellite analysis implementation to support the diagnosis of Lynch syndrome in the local area.

## INTRODUCCIÓN

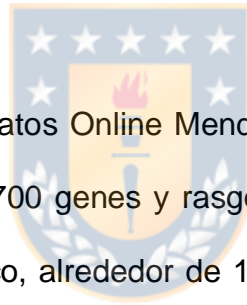
Las enfermedades hereditarias corresponden al conjunto de enfermedades genéticas en donde existen alteraciones de uno o más genes, cuya principal característica es la transmisión de generación en generación a través del ADN. Para que una enfermedad sea considerada hereditaria, el gen alterado debe encontrarse presente en las células de la línea germinal del individuo afectado. Podemos encontrar cuatro clasificaciones generales de enfermedades hereditarias (Jorde y col., 2016):

- Enfermedades monogénicas: Son aquellas enfermedades causadas por la alteración en la secuencia de un solo gen y que se caracterizan por transmitirse siguiendo las leyes de Mendel.
- Enfermedades multifactoriales o poligénicas: Son aquellas enfermedades producidas por la combinación entre múltiples alteraciones en varios genes y los factores ambientales.
- Enfermedades cromosomales: Son aquellas enfermedades en donde existe una alteración numérica o estructural de los cromosomas. Una anomalía numérica ocurre cuando existe una o más copias adicionales al cromosoma generando trisomías o tetrasomías, o bien cuando falta un cromosoma generando una monosomía. Por su parte, una



anomalía estructural ocurre cuando una parte del cromosoma se une incorrectamente con otro producto de una translocación, o bien cuando existe una deleción o una duplicación de una parte del cromosoma.

- Enfermedades mitocondriales: Son aquellas enfermedades en donde existe una alteración producto de mutaciones en el ADN mitocondrial que generan la deficiencia de una o más proteínas mitocondriales, involucradas en procesos metabólicos.



Actualmente, la base de datos Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) contiene alrededor de 25.700 genes y rasgos de los cuales, más de 24.000 son de carácter autosómico, alrededor de 1300 ligados al cromosoma X, 63 ligados al cromosoma Y y 71 localizados en el ADN mitocondrial, en donde la mayoría de estos rasgos se caracterizan por conllevar al posible desarrollo de enfermedades hereditarias. Además, se ha descrito que la mayoría de los síndromes hereditarios se caracterizan por heredarse de manera autosómica dominante, lo que significa una probabilidad de herencia de un 50% hacia la descendencia. (Garber y col., 2005).

El riesgo que implica la transmisión de una enfermedad hereditaria desde los progenitores puede comprometer la calidad de vida de la descendencia

predisponiendo a distintas condiciones que pueden causar graves discapacidades tanto físicas como intelectuales, las cuales pueden condicionar una mortalidad precoz debido al curso progresivo de una determinada enfermedad. (Jackson y col., 2018). Por ejemplo, la predisposición genética al cáncer se puede transmitir entre miembros familiares producto de mutaciones en genes de la línea germinal, por lo que, entre las características que pueden indicar la sospecha de un caso de cáncer por causa hereditaria en una persona se pueden encontrar: la presencia de un mismo cáncer en varios miembros de una familia (en especial si se trata de familiares de primer o segundo grado), casos de cáncer a edad temprana, casos de más de un tipo de cáncer en la misma persona, cáncer bilateral o casos de cáncer poco comunes (Lindor y col., 2008).

Se estima que entre un 5-10% de las causas de cáncer son de origen hereditario, destacando los cánceres de mamas, ovarios y colon como los principales órganos comúnmente afectados por síndromes de alta penetrancia asociados a neoplasia. (Nagy y col., 2004).

En el caso del cáncer colorrectal (CCR), neoplasia maligna cuyo origen ocurre dentro de las paredes del intestino grueso, su etiología se caracteriza

por la transformación del epitelio normal de la mucosa a un epitelio hiperproliferativo, en donde las células pierden su organización estructural generando criptas aberrantes cuya evolución da paso a la formación de adenomas con la capacidad de invadir la submucosa y diseminarse a lo largo del colon generando el carcinoma. (Terzić y col., 2010). En el año 2020 en Chile, el CCR fue el tercer tumor maligno más frecuente con una tasa bruta de incidencia de 27,5 por 100.000 habitantes y la cuarta causa de muerte por neoplasia con una tasa bruta de mortalidad de 11,4 por 100.000 habitantes en población chilena entre 15– 75 años. (GLOBOCAN, 2020).



Entre los factores de riesgo no modificables de una persona podemos encontrar la genética, la edad, el sexo y la historia familiar. Por otra parte, los factores de riesgo asociados a CCR son el consumo excesivo de alcohol, el tabaquismo, la inactividad física, la malnutrición y el consumo elevado de carnes rojas (Hagggar y col., 2009). Del mismo modo, se ha determinado que ciertas enfermedades como la obesidad, la diabetes tipo 2 y la enfermedad inflamatoria intestinal también son factores relevantes que pueden coexistir e interactuar aumentando el riesgo de CCR. (Brenner y col., 2014).

De acuerdo al origen del CCR, se ha determinado que el 75% de los casos de CCR suele ser de origen esporádico, mientras que un 15-20% se asocia a

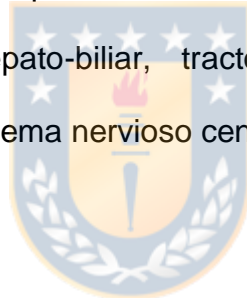
un componente familiar no establecido claramente. Sin embargo, entre un 5-10% de los casos se relaciona a una predisposición hereditaria conocida y que sigue un patrón mendeliano. (MINSAL, 2013).

Para el CCR hereditario se realizó una clasificación según su riesgo, sus características clínicas y la base etiológica genética. Así, podemos encontrar diversas condiciones patológicas dentro del espectro de enfermedades hereditarias asociadas a cáncer de colon, las cuales se pueden dividir en 2 grupos según el tipo de poliposis presente: (Jasperson y col., 2010).

- Poliposis adenomatosa: En este grupo podemos encontrar al cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP) o Síndrome de Lynch y a la poliposis adenomatosa familiar (PAF) como los principales trastornos más frecuentes, seguido de otras patologías menos frecuentes como la poliposis adenomatosa asociada a *MUTYH* y la poliposis adenomatosa familiar atenuada (PAFA).
- Poliposis hamartomatosa: Dentro de este grupo menos frecuente podemos encontrar al síndrome de Peutz-Jeghers y la poliposis juvenil como sus principales protagonistas asociados a un mayor riesgo de CCR, seguido del síndrome de Cowden y el síndrome de Bannayan–Riley–Ruvalcaba los cuales son bastante raros e inusuales.

## 2.1. Síndrome de Lynch

El cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) o síndrome de Lynch corresponde al síndrome más frecuente asociado a cáncer de colon hereditario, representando entre un 2-4% de sus casos. Las personas con este síndrome poseen un mayor riesgo a desarrollar principalmente cáncer colorrectal (50-80%) y cáncer endometrial (40-60%), seguido de otros tipos menos frecuentes como el cáncer de ovario, estómago, tracto hepato-biliar, tracto urinario superior, páncreas, intestino delgado y sistema nervioso central. (Jasperson y col., 2010).



El término “no polipósico” fue establecido a modo de diferenciar al síndrome de Lynch de la PAF, la que se caracteriza por presentar múltiples adenomas en comparación al síndrome de Lynch, el cual presenta una ausencia de un número significativo de pólipos. Además, los tumores en pacientes con síndrome de Lynch se caracterizan por presentarse a una edad temprana cercana a los 45 años y de preferencia en el colon proximal. (Lynch, 2017).

Una de las características del síndrome de Lynch es su penetrancia incompleta, lo cual significa que no todas las personas que presentan la mutación desarrollan necesariamente el fenotipo asociado al síndrome. Por otra parte, el síndrome posee un patrón de herencia autosómico dominante, el cual involucra alteraciones germinales en los genes involucrados en el sistema de reparación del ADN (MMR), como el gen *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Los genes *MLH1* y *MSH2* representan alrededor del 90% de las mutaciones identificadas en el síndrome de Lynch, mientras que el resto es atribuible a los genes *MSH6* y *PMS2*. (Lynch y col., 2003). Adicionalmente, se ha establecido que en algunos casos de síndrome de Lynch existen deleciones en el gen *EPCAM* que pueden causar el silenciamiento del gen *MSH2*, asociando a este gen con un aumento en el riesgo de cáncer de colon. (Kempers y col., 2011).

## **2.2. Diagnóstico del Síndrome de Lynch.**

Para realizar un estudio diagnóstico de enfermedades hereditarias en un laboratorio se requiere idealmente de un área especializada en biología molecular, la cual tendrá la misión de identificar de manera precoz a sujetos portadores de mutaciones con el fin de diagnosticar y prevenir la evolución de la patología.

Como primer paso en el tamizaje de pacientes con sospecha del síndrome de Lynch, se han postulado dos principales criterios para determinar quién se beneficiaría de la consejería y los exámenes genéticos:

- El criterio de Ámsterdam (Vasen y col., 1999): Criterio el cual se basa en los antecedentes familiares.
- El criterio de Bethesda (Laghi y col., 2004): Criterio el cual es específico para personas que ya fueron diagnosticadas con cáncer colorrectal.



#### A. Criterios de Ámsterdam.

- Al menos tres parientes con algún cáncer relacionado con el síndrome de Lynch, en donde uno de ellos sea un familiar de primer grado (padres, hermanos o hijos) de los otros dos parientes.
- Al menos dos generaciones sucesivas deben estar afectadas.
- El cáncer se presentó en al menos uno de estos familiares antes de los 50 años de edad.
- Se debe excluir el diagnóstico de Poliposis Adenomatosa Familiar en casos de CCR.

## B. Criterios de Bethesda.

- La persona era menor de 50 años cuando fue diagnosticada con cáncer colorrectal.
- La persona tiene o ha tenido un segundo cáncer colorrectal u otro cáncer que está relacionado con el síndrome de Lynch.
- La persona es menor de 60 años y el cáncer tiene ciertas características asociadas al síndrome de Lynch cuando se analiza microscópicamente.
- La persona tiene un familiar de primer grado (padres, hermanos o hijos) menor de 50 años el cual ha sido diagnosticado con cáncer colorrectal u otro cáncer relacionado con el síndrome de Lynch.
- La persona tiene dos o más familiares de primer o segundo grado (tías, tíos, abuelos, sobrinas, sobrinos y primos) que tuvieron cáncer colorrectal u otro cáncer relacionado con el síndrome de Lynch a cualquier edad.

Una vez que se han establecido los criterios con los que cumple un paciente se procede a realizar las pruebas dirigidas al diagnóstico del síndrome de Lynch. Para ello, se dispone de 4 pruebas principales que pueden llevar a la identificación de pacientes con sospecha del síndrome: (Yurgelun y col., 2018).



- Inmunohistoquímica (IHQ).
- Análisis de inestabilidad de microsatélite.
- Análisis de la mutación BRAF V600E.
- Ensayos de secuenciación somáticos y/o germinales.

Estas pruebas se caracterizan por tener distinto grado de sensibilidad, especificidad y complejidad de la técnica, por lo cual cada una será abarcada brevemente a continuación:



### 2.3. Inmunohistoquímica (IHQ)

Una de las técnicas mayormente disponibles en los laboratorios corresponde a la inmunohistoquímica, la cual es empleada para detectar la expresión de proteínas involucradas en el proceso de reparación de ADN que se encuentran defectuosas en consecuencia de un gen que presenta una variante patogénica. Existen anticuerpos específicos que permiten la detección de las proteínas expresadas por los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*, y dependiendo de la pérdida de expresión de estas, se sospecharía de un caso de síndrome de Lynch. Los tumores que posean ausencia de tinción en cualquiera de estas proteínas se le

considera como una disfunción subyacente a fallas en la maquinaria asociada a los genes MMR. (Yurgelun y col., 2018). A pesar de resultar un método fácil, económico de emplear y ampliamente disponible, la IHQ se caracteriza por tener una sensibilidad cercana a un 90%, debido a que no se detecta la disfunción de otros genes, como también puede detectar la expresión de proteínas que no poseen capacidad funcional. (Rossi y col., 2017). Esto hace que la técnica no permita establecer en definitiva que se trata de un caso de síndrome de Lynch.

#### **2.4. Análisis de inestabilidad de microsatélite**



Los microsatélites corresponden a múltiples repeticiones de nucleótidos en regiones determinadas del ADN. Durante el proceso de replicación, estas regiones son susceptibles a errores, los cuales son corregidos por un sistema de reparación. Al verse afectado este sistema, se desencadenará un aumento de regiones con microsatélites en las células, pudiendo ser analizadas mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguido de un análisis de fragmentos por distintos métodos. Para esto, el National Cancer Institute (NCI) recomienda el uso del panel Bethesda que incluye 5 marcadores de microsatélite: dos de tipo mononucleotidos: BAT 25, BAT 26; y tres de tipo dinucleotidos:

D2S123, D17S250 y D5S346. (Boland y col., 1998). Se establece como alta inestabilidad microsatelital cuando dos o más marcadores resultan ser inestables, baja inestabilidad microsatelital cuando un marcador resulta inestable y un nivel estable cuando ningún marcador muestra inestabilidad. (Rossi y col., 2017). Así, la prueba de análisis nos permitirá determinar si existe un alto nivel de inestabilidad microsatelital (IMS) en el tejido tumoral, lo cual resulta característico en tumores del síndrome de Lynch. (Lynch y col., 2003).



## **2.5. Análisis de la mutación BRAF V600E y ensayos de metilación**

La inestabilidad de microsatélite no es exclusiva del síndrome de Lynch debido a que se han registrado casos de CCR esporádicos con IMS causada por la hipermetilación de la región promotora del gen *MLH1*, generando la inactivación del sistema de reparación. (Jasperson y col., 2010). Es por eso que resulta necesario incluir el test de BRAF a modo de un diagnóstico diferencial en la investigación del síndrome de Lynch, para analizar la presencia de la mutación V600E en el gen *BRAF* asociada a la hipermetilación del gen promotor. (Loughrey y col., 2007). Un resultado positivo para el test realizado por PCR en tiempo real nos

permitirá establecer que el cáncer colorrectal tiene un origen esporádico y no tiene relación a mutaciones en los genes MMR asociados al síndrome de Lynch.

Sin embargo, existen otras técnicas bastante utilizadas dada su alta sensibilidad que permiten de igual manera analizar la metilación del gen *MLH1* tales como MethyLight, un método sódico-bisulfito dependiente y basado en fluorescencia, o la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples específica de metilación (MS-MLPA), ambas realizadas por PCR en tiempo real y que permiten detectar y cuantificar sensiblemente la metilación del ADN (Perez-Carbonel y col., 2010).

## **2.6. Ensayos de secuenciación somáticos y/o germinales**

Cuando el sujeto muestra una alta IMS o una pérdida de expresión en las proteínas, se puede dar paso al estudio genético confirmatorio para el diagnóstico del síndrome, el cual verificará con certeza si existe la presencia de una mutación en algún gen MMR que pueda ponerlo en riesgo, tanto a él como a sus familiares, a desarrollar el síndrome de Lynch. La opción más recomendada para el estudio genético es la

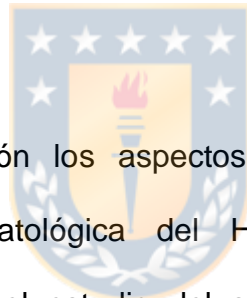
realización de pruebas basadas en secuenciación masiva de próxima generación y que incluyen paneles multigénicos los cuales, permitirán el análisis de múltiples genes relacionados con fenotipos clínicos iguales o similares. Aquellos genes incluidos en el panel se seleccionan según su grado de penetrancia (alta, moderada y baja/desconocida), el cual considera el riesgo asociado a desarrollar cáncer de por vida. Así, un panel dirigido al diagnóstico del síndrome de Lynch debe incluir a los 4 genes principales implicados (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*) y al gen *EPCAM*. Sin embargo, debido a la gran variabilidad en las historias familiares como también la necesidad de un diagnóstico diferencial, se torna necesario incluir adicionalmente en los paneles genes tales como *APC*, *MYH*, *SMAD4*, *STK11*, *BRCA*, *P53*, *ATM* y otros que puedan asociarse a CCR. (Lynch, 2017).

Para realizar este tipo de ensayos, la Sociedad Americana de Oncología Clínica establece que se debe requerir de la derivación de la persona a un asesoramiento genético adicional dada la complejidad del manejo de paciente y sus familiares. (Robson y col., 2015). Esto debe ser llevado a cabo por un equipo de profesionales y de manera multidisciplinaria para una correcta estratificación de riesgo del caso, evaluación de la necesidad de realizar estudios moleculares y elaboración de una

estrategia de contención y prevención que abarque todo tipo de riesgo asociado a la condición y los aspectos psicosociales. Para ello, se debe disponer de un consentimiento informado en donde el paciente asegura que ha recibido un asesoramiento genético previo al examen a modo de apoyo en el manejo, la prevención y vigilancia adecuada de la patología, en donde se le puede informar sobre: las mutaciones analizadas y el riesgo de estas, patrones de herencia y el riesgo para la descendencia, el potencial de la información sobre los posibles resultados, el uso de los resultados para el manejo médico de la persona y sus familiares, aspectos técnicos, costos y los beneficios de la prueba, riesgos y limitaciones que puede conllevar su realización así como las implicancias que podría tener en la salud física y mental del sujeto y sus familiares, (Hall y col., 2014).

Un estudio chileno demuestra que, de estas cuatro técnicas diagnósticas para el síndrome de Lynch, la implementación de la inestabilidad de microsatélites y la inmunohistoquímica resultan ser herramientas de gran ayuda para seleccionar eficazmente a pacientes con alta probabilidad de ser portadores de mutaciones asociadas al síndrome de Lynch que requieran de un estudio genético más profundo. Además, destaca la ventaja de la IMS por sobre la IHQ al momento de evaluar la función de las proteínas

independientemente de su función. (Wielandt y col., 2012). Por otra parte, algunos autores catalogan a la IHQ como la técnica preferida, mientras que otros autores prefieren la combinación de IHQ con PCR y pruebas de metilación, dadas las ventajas y desventajas de cada técnica. Es por eso que, hasta la fecha no existe cierta preferencia universal aceptada en cuanto a una técnica frente a la otra y su uso combinado parece ser la alternativa óptima para maximizar la sensibilidad de detección de MSI. (Dedeurwaerdere y col., 2021).



Tomando en consideración los aspectos mencionados, actualmente, la unidad de Anatomía patológica del HGGB pone a disposición la inmunohistoquímica para el estudio del síndrome de Lynch, pero no se cuenta con una técnica adicional para apoyar el diagnóstico por lo que la implementación del análisis de microsatélite resultaría ideal como una técnica de apoyo al diagnóstico para fomentar la prevención y el manejo del síndrome de Lynch en pacientes y familiares de riesgo.

## PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El síndrome de Lynch puede llegar a ser un gran desafío al momento de diagnosticarlo debido a su falta de características específicas. El algoritmo establecido para el diagnóstico del síndrome se compone desde una recopilación de antecedentes familiares para evaluar si cumple con alguno de los criterios de Ámsterdam o Bethesda, seguido del tamizaje de la población de riesgo mediante la realización de pruebas sencillas como la inmunohistoquímica y el análisis de microsatélites, para finalmente derivar al paciente a un estudio genético más profundo basado en secuenciación, el cual se caracteriza por implicar un mayor costo dada su mayor complejidad. Por ende, su derivación debe ser siempre y cuando se estime conveniente.

Hoy en día, Chile no dispone de una cantidad significativa de laboratorios que se encuentren capacitados y certificados para ofrecer los servicios necesarios para el estudio de las enfermedades genéticas. Además, dadas las políticas públicas establecidas por el sistema de salud actual del país, no existe una garantía disponible para todas las personas ni tampoco que cubra todas las enfermedades genéticas en cuanto al acceso al diagnóstico, tratamiento y protección financiera. Sumado a lo anterior, la falta de



estrategias y protocolos estandarizados sobre el manejo de las distintas enfermedades genéticas, el alto costo que implica realizar algunas pruebas moleculares y la situación económica del paciente para costearse los exámenes de forma particular, son factores que conllevan a que una persona con una enfermedad genética no cuente con una cobertura para un diagnóstico adecuado a su condición.

Es por esto que resulta de gran importancia la necesidad de ampliar las barreras del diagnóstico poniendo a disposición un mayor número de pruebas costo-efectivas, dirigidas principalmente a las personas de riesgo, a modo de aumentar la pesquisa de enfermedades genéticas ante su sospecha clínica en pacientes y familiares de mayor riesgo para así, poder derivarlos al estudio genético de secuenciación siempre cuando sea necesario.

Actualmente la sección de Anatomía Patológica del HGGB realiza solo la prueba de Inmunohistoquímica, mientras que la sección de Patología Molecular realiza solo el test de BRAF para el estudio del síndrome de Lynch, lo cual demuestra la relevancia que tendría la implementación del análisis de microsatélites a modo de apoyo en el diagnóstico para el estudio del síndrome.

Existen estudios donde se señala que tanto la inmunohistoquímica como el análisis de microsatélites resultan ser técnicas sencillas y que no implican un costo elevado para su implementación. Además, señalan que se tratan de dos técnicas complementarias al momento de tomar la decisión clínica en cuanto al diagnóstico del síndrome de Lynch ya que, al aplicarlas en conjunto, aumentarían en un 5-10% la probabilidad de detectar a un paciente que requiera de un estudio genético.

Por su parte, la implementación de una técnica debe considerar el cumplimiento de ciertos criterios básicos como lo son: una fácil implementación con los recursos técnicos e infraestructura disponible; un costo económico accesible para el laboratorio en donde se busca implementar; una alta sensibilidad y especificidad para lo que se quiere detectar, por lo que un laboratorio clínico buscará siempre la mejor opción que esté al alcance de los recursos con los que dispone.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué técnica molecular se podría implementar en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB para mejorar la pesquisa de pacientes con sospecha de Síndrome de Lynch?



La implementación de una PCR convencional para el análisis de microsatélites permitiría mejorar la pesquisa de pacientes con sospecha de Síndrome de Lynch en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB.

## OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la factibilidad de implementar una técnica en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB basada en una PCR convencional que permita el análisis de microsatélite asociado al diagnóstico del síndrome de Lynch.

### 6.2 Objetivos específicos

- i. Revisar las técnicas moleculares empleadas actualmente para el análisis de la inestabilidad de microsatélite asociado al síndrome de Lynch.
- ii. Identificar los recursos necesarios para la implementación de la técnica para el análisis de microsatélite y evaluar su disponibilidad en el laboratorio de Patología Molecular.
- iii. Realizar un análisis de costos de los recursos no disponibles en el laboratorio para la implementación de la técnica que permita el análisis de microsatélite.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio retrospectivo, transversal y no experimental realizado en la Universidad de Concepción en donde se evaluó la viabilidad de implementar una técnica para el diagnóstico del síndrome de Lynch mediante la evaluación de recursos e infraestructura con la que dispone el laboratorio de Patología Molecular del HGGB.

### 7.1 Revisión bibliográfica de los artículos relevantes sobre el síndrome de Lynch y su diagnóstico

Este trabajo se realizó a partir de la revisión de los artículos más relevantes del síndrome de Lynch, los cuales fueron recolectados a partir de una búsqueda bibliográfica en la principal base de datos médicos de la National Library of Medicine (NLM) disponible en internet: Pubmed y en el motor de búsqueda de Google especializado en literatura académica: Google scholar, así como también en fuentes bibliográficas de ámbito nacional como la Guía Clínica para el Cáncer colorrectal del Ministerio de la Salud (MINSAL) y artículos publicados en la revista médica de la Clínica Las Condes. Para realizar la búsqueda de los distintos artículos se utilizaron como filtro de

búsqueda las palabras claves: “Enfermedades hereditarias”, “Cáncer colorrectal”, “Síndrome de Lynch”, “Cáncer colorrectal no polipósico”, “Diagnóstico”, “Inestabilidad microsatélite” e “Inmunohistoquímica”.

Los artículos incluidos en este trabajo se seleccionaron en base a su factor de impacto y al año de publicación de estos, privilegiando siempre aquellos que cumplan con un mayor factor de impacto y que hayan sido publicados lo más recientemente posible. Del total de publicaciones encontradas, se procedió a seleccionar las más adecuadas mediante la lectura del resumen y la conclusión para analizar la idea y los aspectos principales de cada una para luego, excluir a los artículos que se escapaban del propósito de la revisión y realizar la lectura más profunda de los artículos pertinentes.

## **7.2 Evaluación de recursos necesarios para la implementación del análisis de microsatélites.**

Se buscó establecer los recursos necesarios para la implementación de la técnica mediante la construcción de un listado en donde se detallen los principales materiales, reactivos e implementos que son necesarios para el propósito de la revisión. A modo de una mayor organización, la construcción de dicho listado se realizó por secciones en base a las tres principales etapas

del proceso que involucra la metodología de la técnica que se busca implementar, incluyendo:

- Amplificación por PCR
- Revelación de los productos PCR
- Análisis de datos

### **7.3 Evaluación de recursos disponibles en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB.**

Una vez establecidos los recursos que son necesarios para la implementación de la técnica, se procedió a la evaluación de los recursos disponibles, estableciendo en un listado con la misma clasificación planteada en la sección anterior, los principales materiales, equipos y reactivos con los que dispone el laboratorio de Patología Molecular HGGB. Para ello, se agendó una reunión con la profesional encargada para identificar con qué recursos cuenta el laboratorio, seguido de una comparación con los recursos necesarios para la implementación de la técnica, a modo de evaluar cuáles serían los recursos óptimos para una mejor adecuación de la técnica para cumplir con el propósito de la revisión.

#### **7.4 Evaluación de costos de los reactivos no disponibles en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB.**

Si el laboratorio no contaba con algún reactivo necesario para la implementación de la técnica, se procedió a realizar una cotización con distintas empresas con el fin de establecer el monto estimado adicional que conllevará la implementación de la técnica para el análisis de microsatélites. De esta manera, se realizó el contacto con las empresas que se encarguen de la distribución de reactivos comúnmente utilizados en el área de biología molecular para establecer el valor de cada reactivo que se requiera comprar.



Para comparar los valores entre las distintas empresas se procedió a construir una tabla en donde se detalle el precio de cada reactivo no disponible y el precio total que conllevaría realizar la compra en cada empresa en donde se cotice.

#### **7.5 Aspectos éticos y de bioseguridad**

Al tratarse solo de una revisión bibliográfica, no se procedió a realizar un trabajo que involucre el trato con pacientes, la manipulación de muestras tumorales ni la generación de residuos biológicos, por lo que no se requirió de algún documento o certificado del comité de ética y bioética de la



Universidad de Concepción para respaldar el proyecto. Además, no se requirió del uso de equipos de protección personal ni de implementos para cumplir con las normativas de bioseguridad ya que no se procedió a trabajar experimentalmente en un laboratorio.



## RESULTADOS

### **8.1. Revisión de las técnicas comúnmente utilizadas para el estudio de los microsatélites.**

Para estudiar la relación entre los microsatélites y su predisposición al cáncer hereditario se debe recurrir a los distintos métodos moleculares disponibles hoy en día. Dicha metodología molecular utilizada para el análisis consta principalmente de dos etapas (Deschoolmeester, V. y col., 2006):

- 1) La amplificación de marcadores de microsatélites con métodos basados en PCR, ya sea mediante un análisis multiplex de marcadores con el uso de paneles genéticos o mediante el análisis individual de cada marcador.
- 2) El análisis de la longitud de los fragmentos amplificados por métodos que permitan la detección de MSI.


Dentro de las técnicas comúnmente utilizadas para el análisis de fragmentos amplificados se destacan principalmente cuatro (Baudrin, L. G. y col., 2018):

- a) Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).
- b) Electroforesis capilar (CE).
- c) Cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (dHPLC).

d) Análisis de fusión de alta resolución (HRM).

A continuación, en la tabla I se describen las principales ventajas y desventajas de cada una de las técnicas mencionadas:

**Tabla I:** Principales ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas para el análisis de fragmentos de microsátélites. (Baudrin, L. G. y col., 2018) (Janavicius, R. y col., 2010) (Deschoolmeester, V. y col., 2006).

Técnica para análisis de fragmentos	Ventajas	Desventajas
Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajo costo.</li> <li>- Sencillo de implementar en un laboratorio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lento.</li> <li>- Laborioso.</li> <li>- Alto consumo de recursos.</li> <li>- Requiere mayor cantidad de muestra.</li> <li>- Riesgoso (por uso de autoradiografía, tinciones con plata o bromuro de etidio).</li> <li>- Baja precisión en análisis de fragmentos.</li> </ul>
Electroforesis capilar	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápido.</li> <li>- Automatizado.</li> <li>- Análisis multiplex de fragmentos.</li> <li>- Alta sensibilidad y especificidad.</li> <li>- Fácil análisis de datos.</li> <li>- Múltiples aplicaciones.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Implica un mayor costo para su implementación.</li> <li>- Requiere de analistas calificados para la correcta interpretación de las variaciones en la distribución de la longitud del fragmento.</li> </ul>

<p>Cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (dHPLC)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta sensibilidad.</li> <li>- Específico.</li> <li>- Libre de picos tartamudeos en el cromatograma entregado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Implica un mayor costo para su implementación.</li> <li>- Laborioso.</li> <li>- Poca evidencia en cuanto a su aplicación para análisis de MSI.</li> <li>- Múltiples temperaturas de fusión de los amplicones.</li> </ul>
<p>Análisis de fusión de alta resolución (HRM)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápido</li> <li>- Alta sensibilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permite la detección, pero no la identificación del MSI.</li> <li>- Poca evidencia en cuanto a su aplicación para análisis de MSI.</li> </ul>


Al tomar en cuenta cada una de las ventajas y desventajas asociadas a cada técnica, podemos comenzar a considerar a la electroforesis capilar como la técnica más adecuada para realizar el análisis de fragmentos amplificados dada la mayor cantidad de beneficios en comparación a los inconvenientes que podría presentar la metodología al momento de pensar en implementarla en el laboratorio.

## **8.2. Evaluación de recursos necesarios para la implementación del análisis de microsatélites por electroforesis capilar.**

Cuando pensamos en la factibilidad y viabilidad que tendría la implementación de la electroforesis capilar hay que tomar en consideración

varios factores, desde el número de etapas de las cuales consta la técnica, los recursos e infraestructura necesarias para la implementación, evaluar con qué recursos cuenta el laboratorio y cuál es el costo adicional que implicaría implementar la técnica. A continuación, en la tabla II se describen los principales recursos que se deben considerar para la implementación de la técnica, según la etapa de la metodología de electroforesis capilar.

**Tabla II:** Recursos necesarios para la implementación del análisis de microsatélites según la etapa de la metodología.

Etapa de la metodología	Equipo necesario	Reactivos necesarios
Amplificación por PCR	 Termociclador	Partidores de microsatélite (Anexo 1)
		dNTPs
		MgCl <sub>2</sub>
		Taq ADN Polimerasa
		Buffer de amplificación
		Partidores de microsatélite marcados
		Kit de amplificación para partidores marcados
		Kit de purificación
Electroforesis Capilar	Equipo de electroforesis capilar ABI310	Capilares
		Buffer de corrida
		Polímeros
		Matriz de estandarización

		Marcador de tamaño
Análisis de datos	Computador	Software de análisis genético

### 8.3. Evaluación de recursos disponibles en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB para la implementación del análisis de microsatélites por electroforesis capilar.

Un aspecto importante que se debe tomar en consideración al momento de evaluar el costo-beneficio de una técnica que se busca implementar es la cantidad de recursos con los que dispone el laboratorio. A continuación, en la tabla III se muestran los principales recursos con los que dispone el laboratorio de Patología Molecular HGGB para realizar la implementación de la electroforesis capilar para el análisis de microsatélites.

**Tabla III:** Disponibilidad de recursos en el laboratorio de Patología Molecular HGGB según los recursos necesarios para la implementación del análisis de microsatélites.

Recursos necesarios	Disponible/No disponible
Termociclador	Disponible
Partidores de microsatélite (Anexo 1)	No disponible
dNTPs	Disponible
MgCl <sub>2</sub>	Disponible
Taq ADN Polimerasa	Disponible
Buffer de amplificación	Disponible
Partidores de microsatélite marcados	No disponible

Kit de amplificación para partidores marcados	No disponible
Kit de purificación	No disponible
Equipo de electroforesis capilar ABI310	Disponible
Capilares	Disponible
Buffer de corrida	Disponible
Polímeros	No disponible
Matriz de estandarización	No disponible
Marcador de tamaño	No disponible
Software de análisis genético	Disponible

#### 8.4. Evaluación de costos de los reactivos no disponibles en el laboratorio de Patología Molecular del HGGB.

Al realizar la evaluación de costos de los recursos no disponibles se busca evaluar si efectivamente resultaría benéfico para el laboratorio realizar la implementación de la técnica en cuestión o en definitiva, evaluar la existencia de una mejor opción en base a lo que realmente dispone el laboratorio a fin de abaratar costos y no realizar una inversión errónea o inadecuada. A continuación, en la tabla IV se muestra el monto aproximado que implicaría la implementación de la técnica según los recursos no disponibles en el laboratorio.

**Tabla IV:** Costos estimados de los recursos no disponibles en el laboratorio de Patología Molecular según la empresa cotizada.

Reactivo no disponible	Número de catálogo	Empresa	Cantidad	Costo aproximado o (CLP)	Costo por reacción
------------------------	--------------------	---------	----------	--------------------------	--------------------

					n
Partidores de microsatélite	-	Integrated DNA technologies (IDT)	25nmol (1000 reacciones)	4.000 – 6.000 (x10)	60
Partidores de microsatélite marcados	-	Integrated DNA technologies (IDT)	25nmol (1000 reacciones)	95.000 (x10)	950
Kit de amplificación partidores marcados: AmpliTaq Gold 360 Master Mix	439888 1	Thermofisher	5 mL (200 reacciones)	313.488	1.568
Kit de purificación: Hi-di Formamide	440145 7	Thermofisher	5 mL (0,2mL x muestra)	26.558	1.062
Matríz de estandarización : DS-33 Matrix Standard Set	431815 9	Thermofisher	10 runs	373.023	37.302
Marcador de tamaño: GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0	440839 9	Thermofisher	800 reacciones	465.116	582
Polímero: POP-4™ Polymer	402838	Thermofisher	5 mL (500 muestras)	353.488	707



Monto total aproximado	2.541.673	42.231
------------------------	-----------	--------

Nota: Los reactivos cotizados son los específicos para realizar el ensayo por electroforesis capilar. Los reactivos y materiales comunes de laboratorio no se consideraron en la evaluación de costos.

Cabe considerar que las empresas suelen ofrecer distintas alternativas como puede ser un Kit de reacción que contenga todo lo necesario para realizar el análisis de interés. En la tabla V se muestra un kit ofrecido por la empresa Thermofisher destinado para realizar ensayos de detección de inestabilidad de microsatélites en los genes asociados al síndrome de Lynch.

**Tabla V:** Kit de detección de MSI ofrecido por la empresa Thermofisher.

Nombre del kit	TrueMark MSI Assay
Número de catálogo	A45295
Costo (CLP)	2.232.558
Tamaño de la unidad	100 reacciones
Costo por reacción (CLP)	2.232
Técnica utilizada	PCR multiplex y análisis de fragmentos por CE.
Contenido del kit	TrueMark MSI Primer mix TrueMark MSI Master mix TrueMark MSI Assay Amplification Control TrueMark MSI Assay No-Template Control
Equipo compatible	Applied Biosystems™ 3500/3500xL Genetic Analyzer Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer

Software de análisis (incluido en el kit sin costo adicional)	Applied Biosystems™ TrueMark™ MSI Analysis Software
------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------

Por otra parte, en la tabla VI se muestra un panel diagnóstico in vitro ofrecido por la empresa Biocartis para la detección cualitativa de 7 biomarcadores para la identificación de cánceres con inestabilidad Microsatelital (MSI), mediante una metodología análoga a la descrita para el estudio de MSI en síndrome de Lynch.

**Tabla VI:** Ensayo de detección de MSI Idylla ofrecido por la empresa Biocartis.

Nombre del Kit	Idylla MSI Mutation Test
Código	A0100/6
Costo (CLP)	2.313.360
Costo por reacción (CLP)	385.560
Cantidad	6 muestras

Así, los kits diseñados por las distintas empresas se convierten en una fácil solución cuando se necesita una detección rápida, pero es necesario analizar los costos que implica cada kit para verificar si es conveniente la adquisición de este.

## DISCUSIÓN

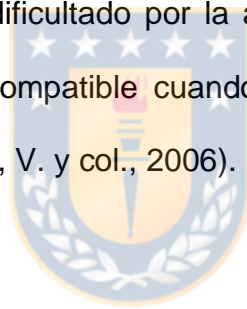
Los estudios genéticos permiten explorar múltiples mutaciones específicas las cuales son capaces de generar distintas afecciones patológicas que pueden afectar a familias completas. Sin embargo, frente a las otras demandas de salud presentes en la población, hoy en Chile el derecho a la salud para las personas con enfermedades genéticas se encuentra en una constante escasez, dejando a muchos pacientes con condiciones genéticas en una situación bastante vulnerable, sin acceso a tratamiento ni una estructura legal que garantice su cobertura financiera. (Encina G. y col, 2019).

El HNPCC o síndrome de Lynch es una enfermedad genética que se caracteriza por presentar cierta complejidad al momento de diagnosticarlo, por lo que es necesario el cumplimiento de ciertos criterios clínicos para poder derivar al paciente al respectivo ensayo genético. La forma de estudio del síndrome puede realizarse desde 3 ámbitos distintos: a) el estudio directo de los genes mediante secuenciación; b) estudiando la presencia o ausencia de las proteínas codificadas mediante la inmunohistoquímica; o c) Analizando los microsatélites (que son la diana en donde actúan las proteínas involucradas en

la reparación) mediante métodos basados en PCR. (Cerretelli, G. y col., 2020). Sin embargo, como la secuenciación es el examen confirmatorio, pero se caracteriza por ser un método complejo y de alto costo, se opta por realizar un screening previo dirigido a los pacientes que presentan una gran probabilidad de ser portadores de mutaciones asociadas al síndrome de Lynch. Así, la inmunohistoquímica y el análisis de microsatélites se realizan como pruebas previas para verificar si es necesario el envío a secuenciar de la muestra del paciente. Por lo general, la IHQ se encuentra implementada en gran parte de los laboratorios dada su sencillez. Esta prueba permite la detección de MSI de manera indirecta, pero con una precisión que puede verse afectada por distintos factores, por lo que los métodos basados en PCR se consideran aún como una técnica complementaria de apoyo al diagnóstico del síndrome para mejorar la pesquisa de pacientes de riesgo. (Dedeurwaerdere y col., 2021).

De esta manera, una de las formas de evidenciar una alteración en los genes asociados al sistema reparador del ADN es estudiando la presencia de inestabilidad en los marcadores de microsatélites presentes en el genoma, mediante un análisis multiplex por PCR de distintos marcadores asociados al síndrome, seguido del análisis de los fragmentos obtenidos. Dentro de las cuatro técnicas encontradas para realizar el análisis de fragmentos, la electroforesis capilar se caracteriza por ser la técnica más adecuada para realizar el análisis de fragmentos en el laboratorio, dado que permitiría realizar

el estudio de la inestabilidad con un alto nivel de sensibilidad y especificidad y de manera más automatizada y segura, en comparación al análisis de fragmentos por electroforesis en gel de poliacrilamida que se hacía antiguamente, el cual implicaba un mayor requerimiento de muestra, recursos y tiempo, junto con una mayor exposición por parte del personal de laboratorio a radiación o a reactivos potencialmente peligrosos como bromuro de etidio o plata. (Baudrin, L. G. y col., 2018). Además, la electroforesis PAGE incluye una serie de pasos en el desarrollo de la metodología, mientras que el análisis de resultado a veces se ve dificultado por la aparición de bandas que alteran la precisión, lo cual no es compatible cuando se evalúa el rendimiento de una técnica. (Deschoolmeester, V. y col., 2006).



La electroforesis capilar corresponde a una técnica de separación basada en la migración diferencial de moléculas a través de un capilar de sílice de diámetro pequeño, de acuerdo a la relación masa/carga y mediante la aplicación de una diferencia de potencial en cada extremo del capilar. Para el caso de la separación de fragmentos de ADN amplificados por PCR, cada fragmento debe encontrarse ligado a un marcador fluorescente diferente, el cual será excitado con un láser incluido dentro del equipo de electroforesis, generando diferentes longitudes de onda las cuales serán detectadas por el equipo y transmitida al software específico del análisis para la interpretación de los resultados. (Magaña, J. y col., 2009). Hoy en día, la PCR multiplex fluorescente y la

electroforesis capilar (CE) se utilizan en conjunto para detectar el estado de MSI en las cadenas moleculares de ADN en tejidos normales y tejidos tumorales del mismo paciente y es considerada la técnica estándar de oro basada en PCR debido a sus características de alta sensibilidad, eficiencia y resultados de análisis confiables en el análisis de MSI asociados a tumores. (Li, K. y col., 2020). De esta manera, existe una mayor cantidad de estudios en donde se evidencia que los distintos autores han utilizado este método por sobre otros para realizar el análisis de microsatélite, otorgándole una mayor validez al momento de comparar a la electroforesis capilar con otras técnicas como dHPLC o HRM las cuales, si bien permiten en sí realizar el análisis de fragmentos, aún no existe suficiente evidencia que sustente su aplicación en esta materia. (Baudrin, L. G. y col., 2018).

En cuanto a la evaluación de los recursos para la implementación de la electroforesis capilar, podemos decir que el laboratorio de Patología Molecular cuenta con gran parte de los recursos que son necesarios para llevar a cabo la técnica, por lo cual, no se requiere de una gran inversión en equipos e instrumentación, en comparación a la implementación que implicarían de otras técnicas como dHPLC. Por su parte, los recursos que no se encuentran disponibles en el laboratorio serían netamente ciertos reactivos que son necesarios para llevar a cabo los respectivos análisis de PCR y de la electroforesis y que se encuentran fácilmente disponibles en el comercio.

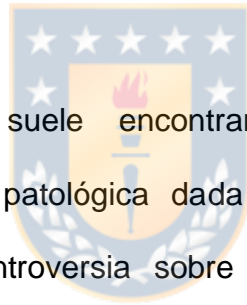
Al realizar la evaluación de costos con las distintas empresas nos damos cuenta de que la implementación del análisis de microsatélites mediante PCR/electroforesis capilar implicaría una inversión total aproximada de 2.541.673 millones de pesos chilenos, mientras que el costo por reacción para cada muestra que se quisiera procesar sería aproximadamente de 42.231. Como es de esperar, el equipo utilizado para llevar a cabo el análisis suele ser el componente más costoso al momento de pensar en implementar una técnica, por lo que, idealmente se debe considerar la técnica que implique la menor inversión posible por parte del laboratorio. Considerando lo anterior podemos decir que el valor neto de la inversión total se torna un monto relativamente accesible dado que, como el laboratorio ya cuenta con un equipo secuenciador ABI310 Genetic Analyzer, se sustenta la idea de buscar la técnica más costo-efectiva para el laboratorio ya que esto ayuda en gran medida a abaratar grandes costos. Si pensamos en la implementación de dHPLC, la sección de Patología molecular del laboratorio actualmente no cuenta con un equipo de cromatografía ya que no es utilizado comúnmente en el área. De esta manera, además de implicar un mayor costo por el equipo, implicaría una demora en la gestión para conseguir el equipo, lo cual no se correlacionaría con el objetivo del proyecto de una implementación rápida y a corto plazo.

Al realizar la comparación de los costos con un kit comercial para realizar ensayos de MSI ofrecido por la empresa Thermofisher, se observa que este

último posee un valor relativamente similar a la evaluación de costos realizada en este proyecto. Sin embargo, dicho kit solo cuenta con los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de amplificación como tal, es decir, no incluye algunos de los reactivos adicionales que son requeridos para realizar el ensayo, tales como la matriz de estandarización, el kit de purificación o el marcador de tamaño, por lo cual implicaría una inversión adicional al precio del kit. Por otra parte, dicho kit solo puede ser utilizado en los equipos Abi 3500/3500xL Genetic Analyzer y ABI SeqStudio Genetic Analyzer por lo que, si se pensara en optar por esta opción, habría que considerar también la inversión adicional que implicaría el equipo compatible con el kit, escapándose así del alcance económico del laboratorio y del objetivo del proyecto. Por otro lado, el kit Idylla ofrecido por la empresa Biocartis corresponde a un kit para la detección de inestabilidad en microsatélites que utiliza una metodología análoga a la cual se busca implementar en este proyecto y cuyo valor es similar al kit ofrecido por Thermofisher. Sin embargo, Idylla MSI Assay incluye 7 marcadores tumorales distintos a los del panel de Bethesda y además, utiliza un equipo distinto al que posee el laboratorio, por ende, la inversión en este kit no sería factible al no incluir marcadores de los genes de interés asociados al síndrome de Lynch. Sin embargo, esta última opción podría considerarse a modo de proyección para futuros análisis que se quisiesen implementar en el laboratorio.



A manera de contextualizar, tomando en cuenta el bajo valor predictivo de los criterios de Amsterdam y Bethesda, la complejidad de la implementación de la secuenciación genética en un laboratorio y el alto costo que esta última implica tanto para el paciente que debe realizarse el estudio como para el laboratorio que debe llevar a cabo el ensayo, se sustenta la idea de disponer de métodos eficaces capaces de apoyar la pesquisa precoz de familias que puedan presentar la enfermedad, para poder así derivarlas al estudio genético siempre y cuando se considere oportuno.



La inmunohistoquímica suele encontrarse implementada en cualquier laboratorio de anatomía patológica dada su sencillez y accesibilidad. No obstante, aún existe controversia sobre si la sustitución del análisis de microsatélites por la inmunohistoquímica. Es por esto que algunas instituciones optan por considerar como prueba de cribado inicial tanto al análisis de IMS por PCR como a la IHQ y se refieren a ambos métodos como pruebas complementarias en el cribado del síndrome de Lynch. (Dedeurwaerdere y col., 2021). De esta manera, resulta interesante hablar de los microsatélites como marcadores de utilidad clínica capaces de identificar IMS asociado a la predisposición a cáncer hereditario, mediante técnicas sencillas de realizar y sin la necesidad de implicar un gran costo en sus implementaciones dentro del laboratorio, capacidad de aumentar la efectividad en la identificación de familiares afectados.

## CONCLUSIONES

- La implementación del análisis de microsatélites en el laboratorio de Patología Molecular HGGB es factible tanto técnica como financieramente.
- El hecho de contar con un equipo de electroforesis capilar permite ahorrar grandes costos y tiempos al momento de determinar cuál es la técnica óptima de implementar a corto plazo.
- Los kits comerciales no siempre resultan ser la mejor opción, por lo que es importante evaluar las distintas alternativas disponibles en el mercado antes de realizar una implementación.

## PROYECCIONES

- El análisis múltiple de fragmentos de manera simultánea y empleando una mínima cantidad de muestra y reactivos permitirá establecer con mayor certeza qué paciente y familiar de riesgo se beneficiaría de un estudio genético junto con el respectivo asesoramiento para establecer el tratamiento y seguimiento acorde a cada caso.
- La implementación del análisis de microsatélites permitiría establecer una estadística más aproximada sobre la incidencia de síndrome de Lynch en la población de estudio.
- Además, la implementación permitiría determinar las mutaciones más frecuentes en la zona, contribuyendo a la investigación clínica de variantes patogénicas asociadas al Síndrome de Lynch.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Baudrin, L. G., Deleuze, J. F., & How-Kit, A. (2018). Molecular and Computational Methods for the Detection of Microsatellite Instability in Cancer. *Frontiers in oncology*, 8, 621.
2. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, RodriguezBigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998) 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.* 58:5248-57.
3. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet.* 2014 Apr 26;383(9927):1490-1502.
4. Cerretelli, G., Ager, A., Arends, M. J., & Frayling, I. M. (2020). Molecular pathology of Lynch syndrome. *The Journal of pathology*, 250(5), 518-531.
5. Dedeurwaerdere, F., Claes, K. B., Van Dorpe, J., Rottiers, I., Van der Meulen, J., Breyne, J., ... & Martens, G. (2021). Comparison of microsatellite instability detection by immunohistochemistry and molecular techniques in colorectal and endometrial cancer. *Scientific Reports*, 11(1), 1-15.

6. Deschoolmeester, V., Baay, M., Wuyts, W., Marck, E. V., Pelckmans, P., Lardon, F., & Vermorken, J. B. (2006). Comparison of three commonly used PCR-based techniques to analyze MSI status in sporadic colorectal cancer. *Journal of clinical laboratory analysis*, 20(2), 52-61.
7. Encina, G., Castillo-Laborde, C., Lecaros, J. A., Dubois-Camacho, K., Calderón, J. F., Aguilera, X., ... & Repetto, G. M. (2019). Rare diseases in Chile: challenges and recommendations in universal health coverage context. *Orphanet journal of rare diseases*, 14(1), 1-8.
8. Garber, J. E., & Offit, K. (2005). Hereditary cancer predisposition syndromes. *Journal of clinical oncology*, 23(2), 276-292.
9. GLOBOCAN, International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. 2020, <http://globocan.iarc.fr>
10. Hagggar, F. A., & Boushey, R. P. (2009). Epidemiología del cáncer colorrectal: incidencia, mortalidad, supervivencia y factores de riesgo. *Clínicas en cirugía de colon y recto*, 22(4), 191.
11. Hall, M. J., Forman, A. D., Pilarski, R., Wiesner, G., & Giri, V. N. (2014). Gene panel testing for inherited cancer risk. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 12(9), 1339-1346.
12. Jackson, M., Marks, L., May, G. H., & Wilson, J. B. (2018). The genetic basis of disease. *Essays in biochemistry*, 62(5), 643-723.

13. Janavicius, R., Matiukaite, D., Jakubauskas, A., & Griskevicius, L. (2010). Microsatellite instability detection by high-resolution melting analysis. *Clinical chemistry*, 56(11), 1750-1757.
14. Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044-2058.
15. Jorde, L., Carey, J. and Bamshad, M., (2016). *Genética Médica*. Barcelona: Elsevier España.
16. Kempers, M. J., Kuiper, R. P., Ockeloen, C. W., Chappuis, P. O., Hutter, P., Rahner, N., ... & Ligtenberg, M. J. (2011). Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletionpositive Lynch syndrome: a cohort study. *The lancet oncology*, 12(1), 49-55.
17. Laghi L, Bianchi P, Roncalli M, Malesci A. Re: Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Sep 15;96(18):1402-3; author reply 1403-4.
18. Li, K., Luo, H., Huang, L., Luo, H., & Zhu, X. (2020). Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer cell international*, 20(1), 1-13.
19. Lindor, N. M., McMaster, M. L., Lindor, C. J., & Greene, M. H. (2008). Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes. *JNCI monographs*, 2008(38), 3-93.

20. Loughrey, M. B., Waring, P. M., Tan, A., Trivett, M., Kovalenko, S., Beshay, V., ... & Dobrovic, A. (2007). Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Familial cancer*, 6(3), 301-310.
21. Lynch, H. T., & De la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(10), 919-932.
22. Lynch, P. M. (2017). HISTORIA DEL CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO (HNPCC). *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(4), 512-523.
23. Magaña, J. J., Arenas-Sordo, M. D. L. L., & Gómez, R. (2009). La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Revista médica de Chile*, 137(7), 946-956.
24. Minsal. Guía Clínica AUGÉ CÁNCER COLORRECTAL en personas de 15 años y más. 2013.
25. Nagy, R., Sweet, K., & Eng, C. (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*, 23(38), 6445-6470. Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114.
26. Pérez-Carbonell, L., Alenda, C., Payá, A., Castillejo, A., Barberá, V. M., Guillén, C., ... & Jover, R. (2010). Methylation analysis of MLH1 improves the selection of patients for genetic testing in Lynch syndrome. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(4), 498-504.

27. Robson, M. E., Bradbury, A. R., Arun, B., Domchek, S. M., Ford, J. M., Hampel, H. L., ... & Lindor, N. M. (2015). American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*, 33(31), 3660-3667.
28. Rossi, B. M., Vaccaro, C., & Kronberg, U. (2017). SINDROMES HEREDITARIOS QUE PREDISPONEN AL DESARROLLO DEL CANCER COLORRECTAL. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(4), 617-626.
29. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1453-6.
30. Wielandt, A. M., Zárate, A. J., Hurtado, C., Orellana, P., Álvarez, K., Pinto, E., ... & LópezKöstner, F. (2012). Síndrome de Lynch: selección de pacientes para el estudio genético mediante análisis de inestabilidad microsatelital e inmunohistoquímica. *Revista médica de Chile*, 140(9), 1132-1139.
31. Yurgelun, M. B., & Hampel, H. (2018). Recent advances in lynch syndrome: diagnosis, treatment, and cancer prevention. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 38, 101-109.



## ANEXOS

### **Anexo 1: Marcadores de microsatélites del panel de Bethesda.**

El panel de referencia recomendado por el National Cancer Institute (NCI) para realizar el análisis de microsatélites para casos de cáncer colorrectal corresponde al panel de Bethesda, el cual incluye 5 marcadores de microsatélites: dos de tipo mononucleótidos: BAT-25, BAT-26; y tres de tipo dinucleótidos: D2S123, D17S250 y D5S346. Sus secuencias de muestran en la siguiente tabla:

Marcador	Secuencia del partidior	Forward/Reverse
BAT-25	5'-TCG-CCT-CCA-AGA-ATG-TAA-GT-3'	F
	5'-TCT-GGA-TTT-TAA-CTA-TGG-CTC-3'	R
BAT-26	5'-TGA-CTA-CTT-TTG-ACT-TCA-GCC-3'	F
	5'-AAC-CAT-TCA-ACA-TTT-TTA-ACC-3'	R
D2S123	5'-AAA-CAG-GAT-GCC-TGC-CTT-TA-3'	F
	5'-GGA-CTT-TCC-ACC-TAT-GGG-AC-3'	R
D5S346	5'-ACT-CAC-TCT-AGT-GAT-AAA-TCG-GG-3'	F
	5'-AGC-AGA-TAA-GAC-AAG-TAT-TAC-TAG-3'	R
D17S250	5'-GGA-AGA-ATC-AAA-TAG-ACA-AT-3'	F
	5'-GCT-GGC-CAT-ATA-TAT-ATT-TAA-ACC-3'	R