

Inestabilidad de Microsatélites como marcador biológico para la administración de Pembrolizumab

Microsatellites instability as a biological marker for the administration of Pembrolizumab

Fernández-Galindo Martha Alejandra¹, Moreno-Ortiz José Miguel¹, Contreras-Gutiérrez José Alfredo², Martínez-Félix Jesús Israel³, Misael Guerrero-Valdez⁴, Beltrán-Ontiveros Saúl Armando^{2*}

1. Instituto de Genética Humana "Dr. Enrique Corona Rivera". Doctorado en Genética Humana. Departamento de Biología Molecular y Genómica. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.
2. Coordinación de Investigación, Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud.
3. Médico Adscrito al servicio de anestesiología, Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud-Hospital Civil de Culiacán.
4. Médico Adscrito al servicio de Ginecología y Obstetricia, Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud-Hospital Civil de Culiacán.

***Autor de correspondencia:** Dr. Saúl Armando Beltrán-Ontiveros

Coordinación de investigación del Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud. UAS

Dirección: Eustaquio Buelna 91, Col. Burócrata, Código Postal: 80030 Culiacán Rosales, Sinaloa. México.

Teléfono: 667 3068465 saul.beltran@uas.edu.mx

DOI <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v12.n2.008>

Recibido 16 de enero 2022, aceptado 26 de marzo 2022

RESUMEN

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN repetidas en tándem, distribuidas dentro del genoma, los cuales son propensos a errores en la replicación. El sistema Mismatch Repair (MMR), se encarga de identificar, señalar y reparar bases mal emparejadas, principalmente en secuencias repetitivas de ADN. La inactivación de cualquiera de los genes que codifican para las proteínas MMR puede provocar cambios en la longitud de los microsatélites causando un fenotipo hipermutable conocido como inestabilidad de microsatélites (MSI), vía de tumorigénesis bien establecida relacionada con la aparición, progresión y pronóstico de diversas neoplasias malignas. Debido a la gran cantidad de mutaciones somáticas, los tumores MSI tienen mayor sensibilidad a la inmunoterapia. La FDA ha aprobado un anticuerpo monoclonal como tratamiento para pacientes pediátricos y adultos con tumores sólidos MSI, el cual ha demostrado una actividad antitumoral sólida y duradera y un perfil de seguridad manejable contra varias neoplasias malignas avanzadas.

Palabras clave: Microsatélites, marcador biológico, Pembrolizumab

ABSTRACT

Microsatellites are short tandem repeating DNA sequences, distributed within the genome, that are prone to replication errors. The mismatch repair system (MMR) is responsible for identifying, signaling, and repairing mismatched bases, primarily in repetitive DNA sequences. Inactivation of any of the genes that encode MMR proteins can cause changes in the length of the microsatellites, and like a consequence a hypermutable phenotype known as microsatellite instability (MSI), a well-established tumorigenesis pathway related to the appearance, progression, and prognosis of various malignant neoplasms. Due to the large number of somatic mutations, MSI tumors are more sensitive to immunotherapy. The FDA has approved a monoclonal antibody as a treatment for pediatric and adult patients with MSI solid tumors, which has demonstrated robust and long-lasting antitumor activity and a manageable safety profile against various advanced malignancies.

Keywords: Microsatellites, biological marker, Pembrolizumab

MSI y sistema MMR

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN repetidas en tándem, distribuidas ampliamente dentro del genoma tanto en regiones codificantes como no codificantes; su naturaleza

repetitiva los hace especialmente propensos a errores de replicación¹ que, normalmente, son reparados por el sistema de reparación de errores de apareamiento del ADN o sistema *Mismatch Repair* (MMR)^{2,3}, encargado de identificar,

señalar y reparar bases mal emparejadas, principalmente en secuencias repetitivas de ADN^{2,4,5,6}.

El sistema MMR se constituye por diversas proteínas: MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1, PMS2 y Exo1; responsables de la vigilancia de la replicación correcta del ADN. Estas proteínas forman complejos heterodímeros funcionales mediante combinaciones específicas que reparan el daño del ADN. Durante la replicación normal del ADN, el MMR competente detectará los errores de emparejamiento del ADN mediante los heterodímeros MSH2/MSH6 y MSH2/MSH3; es decir, estas son responsables de la detección inicial de los errores de replicación. Posteriormente, se reclutan MLH1/PMS2 para la escisión del nucleótido o fragmento que no coincida y para la re-síntesis de una nueva hebra corregida^{2,5,7}. Sin embargo, la desregulación del MMR limitará la capacidad de las células para corregir los errores que normalmente ocurren durante la replicación de secuencias repetitivas del ADN, causando un fenotipo mutante conocido como inestabilidad de microsatélites (MSI)^{8,9}.

La inactivación de cualquiera de los genes que codifican para las proteínas MMR, ya sea por variantes en la región codificante, por cambios epigenéticos (como metilación del promotor) o,

por reordenamientos cromosómicos que conducen a la pérdida de la heterocigosidad, puede provocar MSI^{5,10}.

MSI en la vía de tumorigénesis

La MSI se define como un cambio en la longitud de los microsatélites causado por la inserción o deleción de una unidad repetitiva; es una vía de tumorigénesis bien establecida, implicada en la aparición, progresión y pronóstico de diversas neoplasias malignas^{7,11}. A pesar de que el cáncer colorrectal (CCR) es la entidad oncológica relacionada por excelencia con la MSI, donde se encuentra presente en 15-20% de los casos^{12,13}, no es la única, también está presente en diversos tipos de cáncer. Recientemente se analizó la MSI en 18 tipos de cáncer, encontrando inestabilidad en 14 de ellos¹⁴, incluidos 3,8,13,15,16,17,18.

Los análisis de MSI y sus alteraciones moleculares relacionadas en cáncer son cada vez más relevantes en entornos clínicos ya que brindan información sobre las opciones terapéuticas, el pronóstico del cáncer y la evaluación del riesgo de cáncer familiar⁸. La detección de MSI se determina mediante el uso de iniciadores específicos marcados con fluorescencia y realizando una PCR multiplex. Posteriormente los fragmentos amplificados se identifican mediante electroforesis capilar^{1,8}.

Con el fin de clasificar la MSI, en 1997, el NCI propuso el uso de un panel de 5 marcadores microsatélites, conocido como panel Bethesda, el cual constaba de dos repeticiones de mononucleótidos (BAT25 y BAT26) y tres repeticiones de dinucleótidos (D5S346, D2S123 y D17S250)^{1,3,8}. El panel Bethesda, se sigue utilizando actualmente, sin embargo, tiene ciertas limitaciones como la necesidad de analizar tejido sano y tejido tumoral, ya que se tiene que comparar la longitud de cada marcador en ambos tejidos; y la utilización de marcadores dinucleótidos, que disminuyen la sensibilidad y especificidad de la prueba, ya que se ha visto que los marcadores mononucleótidos son más sensibles y específicos^{19,20}. En 2002, Suraweera *et al.*, propusieron un panel multiplex constituido por cinco marcadores mononucleotidos cuasimonómorficos (NR-21, NR-22, NR-24, BAT-25 y BAT-26), denominado panel Pentaplex, el cual es más específico y permite el análisis de MSI sin la necesidad de utilizar tejido no tumoral^{20,21,22,23,24}.

Un alto nivel de MSI (MSI-H) se asocia con aumento de la tasa de mutación³, confiriendo un estado hipermutable a las células^{1,25}. Debido a la gran cantidad de mutaciones somáticas, los tumores MSI-H expresan altos niveles de neoantígenos, lo que confiere susceptibilidad a la inmunoterapia²⁶. Diversos estudios han demostrado mejor pronóstico para los cánceres MSI-H en comparación con aquellos MSI-L o

MSS, ya que presentan mejor respuesta inmune antitumoral y mejor capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales; así como mayor sensibilidad a terapias con anticuerpos monoclonales^{3,7,27}.

Respuesta inmunitaria en cáncer

Las células del sistema inmunitario atacan células que producen antígenos anormales, por lo que se ha propuesto que las células T pueden reconocer y atacar mayormente células de tumores con MSI-H. Las células T juegan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria frente a las neoplasias. Las células T tienen receptores inhibidores que se encargan de regularlas negativamente al unirse con sus ligandos específicos; son puntos de control inmunológico que mediante un mecanismo de retroalimentación negativa limita la fase efectora, la expansión clonal y la función de las células T²⁸.

La proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), también conocida como CD279 y sus ligandos, el ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1) y 2 (PD-L2) juegan un papel crucial en la regulación de la respuesta inmune (29,30). PD-1 es un receptor transmembranal, que funge como punto de control inmunitario modulando las respuestas inmunes^{31,32}; se une a PD-L1 y PD-L2, que también son proteínas transmembrana. PD1 se expresa principalmente en los linfocitos T (LT) CD4+ y CD8+ ac-

tivadas, linfocitos B (LB), natural killer (NK), macrófagos y células dendríticas. PD-L1 se expresa en múltiples tipos celulares, constitutivamente en LT, LB y células dendríticas. PD-L2 se restringe a macrófagos y células dendríticas (28,30).

Las células neoplásicas expresan PD-L1 y PD-L2, que al unirse con PD-1 de las células T provoca su inactivación^{28,30}, mecanismo que les permite evadir al sistema inmune. PD-1, PD-L1 y PD-L2 se expresan de forma anormal en células tumorales y en los linfocitos que se encuentran en el microambiente tumoral²⁹. La expresión de PD-1 y sus ligandos en las células tumorales desempeñan un papel en la evasión inmune, mediando la inhibición de la respuesta inmune antitumoral para permitir que los tumores crezcan sin control³³. La unión de PD-1 con PD-L1/PD-L2 induce fosforilación del dominio de inhibición tirosina del inmunorreceptor citoplasmático de PD-1 que va a reclutar la fosfatasa SHP2. Después SHP2 desfosforila el receptor de células T, lo que lleva a una reducción de la muerte de las células diana³⁰. El bloqueo de PD1 evita la interacción entre PD-1 de las células T y PD-L1 de las células tumorales, reactivando la inmunidad antitumoral mediada por células T²⁸. El bloqueo de la vía de PD-1 puede hacer que los tumores sean vulnerables a la vigilancia inmunitaria³³.

Importancia de pembrolizumab en tumores que presentan MSI-H

Pembrolizumab es un anticuerpo IgG4 kappa monoclonal humanizado²⁸ altamente selectivo²⁹, dirigido específicamente a un punto de control inmunitario, (PD-1) bloqueando directamente la interacción con sus ligandos (PD-L1 y PD-L2)³³, liberando la inhibición de la respuesta inmune mediada por esta vía, incluida la respuesta inmune antitumoral. El bloqueo de este punto de control inmunológico ha resultado en respuestas clínicas favorables en pacientes con múltiples tipos de cáncer²⁶. La FDA aprobó el uso de pembrolizumab como tratamiento para pacientes pediátricos y adultos con tumores sólidos basándose en dos características genéticas específicas: siendo una de ellas la MSI-H^{13,34,35}. Esta es la primera vez en que se aprueba un tratamiento oncológico basándose únicamente en la presencia o ausencia de un biomarcador común, en lugar del origen primario del cáncer. Actualmente está aprobado en más de 80 países para el tratamiento de tumores sólidos con inestabilidad de microsatélites o deficiencia de MMR²⁶.

El pembrolizumab ha demostrado una actividad antitumoral sólida y duradera y un perfil de seguridad manejable contra varias neoplasias malignas avanzadas^{36,37,38}. Los pacientes con tumores MSI-H que responden a pembrolizumab desarrollan una rápida expansión clonal de cé-

lulas T específicas de neoantígeno; estos clones fueron reactivos a los neoantígenos encontrados en los tumores de los pacientes, reforzando así la respuesta inmunitaria contra las células cancerosas, lo que puede desacelerar el crecimiento tumoral, disminuir el tamaño y mejorar la supervivencia libre de progresión¹⁸. Los análisis de MSI y sus alteraciones moleculares relacionadas en cánceres son cada vez más relevantes en entornos clínicos ya que brindan información sobre las opciones terapéuticas, el pronóstico del cáncer y la evaluación del riesgo de cáncer familiar⁸. Por lo tanto, MSI tiene el potencial de convertirse en un predictor clave para evaluar el grado de malignidad, la eficacia y el pronóstico de los tumores. Además, los patrones de MSI podrían proporcionar información para la implementación de nuevas estrategias de tratamiento individualizadas⁷.

Referencias

1. Yuza K, Nagahashi M, Watanabe S, Takabe K, Wakai T. Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget*. 2017;8(67):112103-112115. Published 2017 Dec 1. doi:10.18632/oncotarget.22783
2. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De'Angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*. 2018;89(9-S):97-101. Published 2018 Dec 17. doi:10.23750/abm.v89i9-S.7960
3. Kim DG, An JY, Kim H, Shin SJ, Choi S, Seo WJ, et al. Clinical Implications of Microsatellite Instability in Early Gastric Cancer. *J Gastric Cancer*. 2019;19(4):427-437. doi:10.5230/jgc.2019.19.e38
4. Jiricny J. Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a012633. Published 2013 Apr 1. doi:10.1101/cshperspect.a012633
5. Ratti M, Lampis A, Hahne JC, Passalacqua R, Valeri N. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(22):4151-4162. doi:10.1007/s00018-018-2906-9
6. Yuza K, Nagahashi M, Watanabe S, Takabe K, Wakai T. Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget*. 2017;8(67):112103-112115. Published 2017 Dec 1. doi:10.18632/oncotarget.22783
7. Yang G, Zheng RY, Jin ZS. Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(12):2891-2899. doi:10.1007/s00432-019-03053-4
8. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, Turner EH, Pritchard CC. Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clin Chem*. 2014;60(9):1192-1199. doi:10.1373/clinchem.2014.223677
9. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol*. 2015;89(6):899-921. doi:10.1007/s00204-015-1474-0

10. Choi YY, Bae JM, An JY, Kwong IG, Cho I, Shin HB, et al. Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer? A systematic review with meta-analysis. *J Surg Oncol.* 2014;110(2):129-135. doi:10.1002/jso.23618
11. Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C, Gonzalez D, Hulkki-Wilson S, Eltahir Z, et al. Mismatch Repair Deficiency, Microsatellite Instability, and Survival: An Exploratory Analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) Trial. *JAMA Oncol.* 2017;3(9):1197-1203. doi:10.1001/jamaoncol.2016.6762
12. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3380-3387. doi:10.1200/JCO.2009.27.0652
13. Yan L, Zhang W. Precision medicine becomes reality-tumor type-agnostic therapy. *Cancer Commun (Lond).* 2018;38(1):6. Published 2018 Mar 31. doi:10.1186/s40880-018-0274-3
14. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types [published correction appears in *Nat Med.* 2017 Oct 6;23(10):1241] [published correction appears in *Nat Med.* 2018 Apr 10;24(4):525]. *Nat Med.* 2016;22(11):1342-1350. doi:10.1038/nm.4191
15. Seo HM, Chang YS, Joo SH, Kim YW, Park YK, Hong SW, et al. Clinicopathologic characteristics and outcomes of gastric cancers with the MSI-H phenotype. *J Surg Oncol.* 2009;99(3):143-147. doi:10.1002/jso.21220
16. Murphy MA, Wentzensen N. Frequency of mismatch repair deficiency in ovarian cancer: a systematic review. This article is a US Government work and, as such, is in the public domain of the United States of America. *Int J Cancer.* 2011;129(8):1914-1922. doi:10.1002/ijc.25835
17. Sohn BH, Hwang JE, Jang HJ, Lee HS, Oh SC, Shim JJ, et al. Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):4441-4449. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2211
18. Janjigian YY, Sanchez-Vega F, Jonsson P, Chatila WK, Hechtman JF, Ku GY, et al. Genetic Predictors of Response to Systemic Therapy in Esophagogastric Cancer. *Cancer Discov.* 2018;8(1):49-58. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0787
19. Agostini M, Enzo MV, Morandi L. A ten markers panel provides a more accurate and complete microsatellite instability analysis in mismatch repair-deficient colorectal tumors. *Cancer Biomark.* 2010;6(1):49-61. doi:10.3233/CBM-2009-0118
20. Haghghi MM, Javadi GR, Parivar K. Frequent MSI mononucleotide markers for diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010;11(4):1033-1035
21. Suraweera N, Duval A, Reperant M. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterol.* 2002;123(6):1804-1811. doi:10.1053/gast.2002.37070

22. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):251-257. doi:10.1155/2004/159347
23. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol*. 2006;24(2):241-251. doi:10.1200/JCO.2005.02.7227
24. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers [published correction appears in *PLoS One*. 2010;5(3). doi: 10.1371/annotation/572bb6d3-0315-40b1-a6d7-ce818809b5ea]. *PLoS One*. 2010;5(2):e9393. Published 2010 Feb 24. doi:10.1371/journal.pone.0009393
25. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL. 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;30(8):1232-1243. doi:10.1093/annonc/mdz116
26. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019;25(13):3753-3758. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-4070
27. Kok M, Chalabi M, Haanen J. How I treat MSI cancers with advanced disease. *ESMO Open*. 2019;4(Suppl 2):e000511. Published 2019 May 21. doi:10.1136/esmoopen-2019-000511
28. Kwok G, Yau TC, Chiu JW, Tse E, Kwong YL. Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(11):2777-2789. doi:10.1080/21645515.2016.1199310
29. McDermott J, Jimeno A. Pembrolizumab: PD-1 inhibition as a therapeutic strategy in cancer. *Drugs Today (Barc)*. 2015;51(1):7-20. doi:10.1358/dot.2015.51.1.2250387
30. Selvajaran G. Pembrolizumab: The Nut Cracker. *Indian J Med Paediatric Oncology*. 2020;41(3):393-396. doi:10.4103/ijmpo.ijmpo_37_20
31. Gokare P, Lulla AR, El-Deiry WS. MMR-deficiency and BRCA2/EGFR/NTRK mutations. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(8):1849-1850. doi:10.18632/aging.101275
32. Medina PJ, Adams VR. PD-1 Pathway Inhibitors: Immuno-Oncology Agents for Restoring Antitumor Immune Responses. *Pharmacotherapy*. 2016;36(3):317-334. doi:10.1002/phar.1714
33. van Vugt MJH, Stone JA, De Greef RHJMM, Snyder ES, Lipka L, Turner DC, et al. Immunogenicity of pembrolizumab in patients with advanced tumors. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):212. Published 2019 Aug 8. doi:10.1186/s40425-019-0663-4
34. Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(2):e15-e21. doi:10.1097/PAI.0000000000000575
35. Sidaway P. MSI-H: a truly agnostic biomarker?. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(2):68. doi:10.1038/s41571-019-0310-5

36. Freshwater T, Kondic A, Ahamadi M, Li CH, de Greef R, de Alwis D, et al. Evaluation of dosing strategy for pembrolizumab for oncology indications. *J Immunother Cancer*. 2017;5:43. Published 2017 May 16. doi:10.1186/s40425-017-0242-5
37. Goodman AM, Sokol ES, Frampton GM, Lippman SM, Kurzrock R. Microsatellite-Stable Tumors with High Mutational Burden Benefit from Immunotherapy. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(10):1570-1573. doi:10.1158/2326-6066.CIR-19-0149
38. Duffy MJ, Crown J. Biomarkers for Predicting Response to Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Patients. *Clin Chem*. 2019;65(10):1228-1238. doi:10.1373/clinchem.2019.303644
39. Rüschoff J, Baretton G, Bläker. MSI testing : What's new? What should be considered?. MSI-Testung : Was ist neu? Was ist zu beachten?. *Pathologe*. 2021;42(Suppl 1):110-118. doi:10.1007/s00292-021-00948-3
40. Yamamoto H, Imai K. An updated review of microsatellite instability in the era of next-generation sequencing and precision medicine. *Semin Oncol*. 2019;46(3):261-270. doi:10.1053/j.seminoncol.2019.08.003