



## **Raccomandazioni dell'Associazione Tecnico Scientifica – S.I.T.La.B.**

N.005/23

### **Impatto tecnico-organizzativo dell'analisi del mismatch repair sui tumori solidi**

R. Bedin (Verona), A. Remo (Verona), A. Calìo (Verona)

**Rev. 1.0**

**SITLaB news**

**Pubblicato: 15 Maggio 2023**

**Copyright: © SITLaB**

## Abstract

**Introduzione:** L'analisi del Mismatch Repair è incrementata negli ultimi anni estendendosi a molti carcinomi solidi, diversi da utero o grosso intestino. Questa diventa utile per individuare pazienti con Sindrome di Lynch, e per poter trattare determinati tipi di tumori (MMR deficienti) con immunoterapici. A questo scopo sono state redatte delle linee guida per identificare questi pazienti.

**Obiettivo:** Studiare l'analisi del Mismatch Repair all'interno dell'ULSS9 tra il 2018 e il 2021, verificare il completamento dello screening proposto e confrontare i dati ottenuti con la letteratura.

**Materiali e metodi:** Si sono raccolti tutti i casi che hanno effettuato l'analisi del MMR con relativi esami annessi, sia eseguiti in sede con tecnica immunoistochimica, sia esternalizzati con tecniche PCR real time o multiplex.

**Risultati:** I dati e le percentuali riscontrate sono per la maggiore, in linea con la letteratura. Si è visto un trend in aumento in seguito all'introduzione delle linee guida per il numero di esami eseguiti. Vi è una percentuale di 4,6% di pazienti che non hanno completato lo screening. I tempi di risposta degli esami esternalizzati sono maggiori rispetto a quelli eseguiti in sede.

**Conclusioni:** Le differenze di percentuali trovate dei casi di Sospetti Lynch si suppone siano dovute ad un tasso di pazienti che non hanno completato lo screening, che vanno ad impattare sul totale. L'esternalizzazione di alcuni esami porta allungamento dei tempi di risposta quindi sarebbe opportuno diffondere i test molecolari alle strutture periferiche, sia per questo sia per permettere il completamento dello screening.

**Parole chiavi:** Carcinoma, tumori solidi, linee guida, MMR, screening.

## Introduzione

L'analisi del MisMatch Repair (MMR) negli ultimi anni è incrementata nella pratica clinica estendendosi a carcinomi coinvolgenti organi che non siano solo colon-retto (GRI) od utero (UT)<sup>(1)</sup>. L'utilità dell'esecuzione di questo test è data sia dalla possibilità di individuare pazienti con Sindrome di Lynch (LS), sia dal poter trattare questo tipo di tumori con farmaci immunoterapici<sup>(2,3)</sup>.

Il MMR è un complesso di diverse proteine (MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6), la cui espressione determina la funzionalità del sistema stesso. Il sistema ha la funzione di riparare gli errori di appaiamento, inserzione o delezione su singolo filamento che avvengono durante la replicazione del DNA<sup>(4)</sup>. Il meccanismo di funzionamento del sistema MMR è basato su due eterodimeri: MLH1/PMS2, MSH2/MSH6. La perdita di MLH1 comporta anche quella di PMS2, e corrispettivamente MSH2 per MSH6. Se tutte le proteine del sistema MMR sono espresse si parla di MMR proficiente (*pMMR*), viceversa se alcune di queste sono assenti si parla di MMR deficiente (*dMMR*)<sup>(5)</sup>.

Lo stato di *dMMR* determina un'incapacità di correggere errori (varianti) sul singolo filamento, seguito da una maggior probabilità di accumulare alterazioni, specialmente in alcune zone altamente ripetute come i microsatelliti; infatti, l'alterata funzionalità del MMR (*dMMR*) determina la cosiddetta instabilità microsatellitare (MSI)<sup>(1)</sup>. La MSI è una condizione che può essere rilevata da un'analisi di biologia molecolare (*PCR multiplex*), identificando l'espressione qualitativa e quantitativa delle zone dei microsatelliti e, in base a queste, identifica condizioni di elevata instabilità microsatellitare (MSI-H) o bassa (MSI-L)<sup>(7)</sup>. Attualmente la funzionalità delle proteine del MMR viene valutata dall'espressione di queste, con la tecnica dell'immunoistochimica (ICH), considerato il *gold standard*, mentre per casi che danno un risultato dubbio, viene consigliata l'analisi in biologia molecolare per determinare la condizione di MSI<sup>(6)</sup>.

Per verificare la correlazione tra un *dMMR* (o una MSI) e la LS sono stati proposti dalle linee guida i seguenti test reflex che permettono di escludere o meno una condizione ereditaria:

- analisi della mutazione V600E del gene BRAF. Il gene BRAF è un regolatore della proliferazione cellulare, pertanto se mutato, le cellule perdono il controllo della crescita e aumentano la possibilità di sviluppare tumori. Se questa mutazione è presente nel tessuto tumorale caratterizzato da MMR deficiente, si esclude la LS. Viceversa se assente si prosegue con il test reflex del promotore di MLH1, sospettando una LS;
- analisi dell'ipermetilazione del promotore di MLH1. L'attivazione del promotore in maniera incontrollata può portare a condizioni di *dMMR* per la coppia MLH1/PMS2 (che vedremo essere la maggiormente interessata). Se il test risulta positivo, anche in questo caso si esclude la LS, altrimenti no.

In letteratura si riscontra che le percentuali di Sindrome di Lynch abbiano un'incidenza media di circa 3% sia per i tumori al colon sia dell'utero <sup>(7)</sup>.

Al fine di individuare questi pazienti è stato proposto dalle Linee guida lo Screening Universale per GRI e UT <sup>(7)</sup> che prevede i seguenti passaggi:

1. Analisi MMR, eseguita con immunohistochimica;
2. se il pattern MMR non è chiaro, si esegue una valutazione dei Microsatelliti con PCR multiplex;
3. i tumori pMMR vengono esclusi da una possibile LS e pertanto definiti sporadici;
4. i tumori dMMR (MLH1/PMS2) proseguono l'iter eseguendo i test reflex dello stato mutazionale di *BRAF* (solo per GRI) con immunohistochimica o PCR real time e l'iper-metilazione della regione del promotore di *MLH1* (per GRI e UT) con tecnica PCR real time. Tali varianti sono aneddotiche nelle sindromi di Lynch e pertanto la escludono nello Screening Universale. Gli altri carcinomi dMMR vengono avviati a consulenza oncogenetica;
5. i tumori dMMR (MSH2/MSH6) vengono inviati direttamente a consulenza oncogenetica.

## **Obiettivo**

Questo studio analizza l'impatto dal punto di vista tecnico ed organizzativo dell'analisi del MMR effettuata sui carcinomi nel quadriennio 2018-2021 all'interno dell'ULSS9. Lo scopo è verificare se l'esecuzione degli esami eseguiti (in sede e non) rispecchia quanto dettato dallo screening, per valutare se possibile implementare l'attuale situazione evitando sprechi di tempo e costi. Inoltre i dati raccolti vengono confrontati con la letteratura per osservare e ragionare sulle concordanze e non.

## **Materiali e metodi**

In tale studio abbiamo analizzato e recuperato i casi che hanno eseguito l'analisi di immunohistochimica MMR nell'ULSS9 dall'anno 2018 all'anno 2021, per un totale di 740 carcinomi.

## **Raccolta dati**

Grazie ai sistemi informatici interni al laboratorio, si sono ricavate informazioni per ogni caso su: età del paziente, sede del tumore, diagnosi istologica del tumore, valutazione del sistema MMR in ICH, esami immunohistochimici eseguiti annessi allo studio MMR (*BRAF* e *p53*), esami di biologia molecolare annessi allo studio MMR (*MSI*, *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*), tempi di risposta.

## Tecniche utilizzate

Gli esami di biologia molecolare sono stati svolti presso sedi esterne, mediante tecnica PCR real time.

Le analisi di ICH sono state eseguite nel Laboratorio di Anatomia Patologica dell'Ospedale Fracastoro. Lo strumento utilizzato per l'ICH è il BenchMark ULTRA della ditta Roche. Gli anticorpi e i kit di rivelazione sono stati forniti da VENTANA e li troviamo riassunti nella tabella I.

<b>Anticorpo</b>	<b>Smascheramento antigenico</b>	<b>Incubazione anticorpo primario</b>	<b>Kit di rivelazione</b>
<b>ANTI-MLH1 (M1)</b>	48 minuti, 100°C	32 minuti, 37°C	OptiView DAB
<b>ANTI-PMS2 (A16-4)</b>	92 minuti, 100°C	36 minuti, 37°C	OptiView DAB
<b>ANTI-MSH2 (G219-1129)</b>	40 minuti, 100°C	12 minuti, 37°C	OptiView DAB
<b>ANTI-MSH6 (SP93)</b>	64 minuti, 100°C	12 minuti, 37°C	OptiView DAB
<b>ANTI-BRAF V600E (VE1)</b>	64 minuti, 100°C	32 minuti, 37°C	OptiView DAB
<b>ANTI-P53 (BP53-11)</b>	64 minuti, 100°C	28 minuti, 37°C	UltraView DAB

*Tabella I. Dettagli tecnici degli anticorpi e dei kit utilizzati*

La reazione di immunostochimica effettuata dallo strumento si basa sull'interazione dell'anticorpo con l'antigene ricercato nel tessuto in esame. Questa viene messa in evidenza tramite l'utilizzo di anticorpi marcati da enzimi, che in presenza dei loro substrati portano alla produzione di un precipitato colorato, indice di positività della reazione. In questo caso l'enzima perossidasi si trova ancorato ad un anticorpo, ibridato al tessuto in esame. L'enzima, in presenza di acqua ossigenata (substrato) converte la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) in un precipitato di colore marrone (DAB ossidata), indice di positività della reazione. Possiamo osservare infatti nella figura 1, come nelle due immagini in alto la reazione sia positiva, viceversa nelle immagini in basso sia negativa, data dalla mancata espressione delle proteine, seguita da una mancata ibridazione dell'anticorpo al tessuto e mancata reazione.

Tutte le analisi si sono eseguite su tessuti *Formalin-Fixed-Paraffine-Embedded* (FFPE).

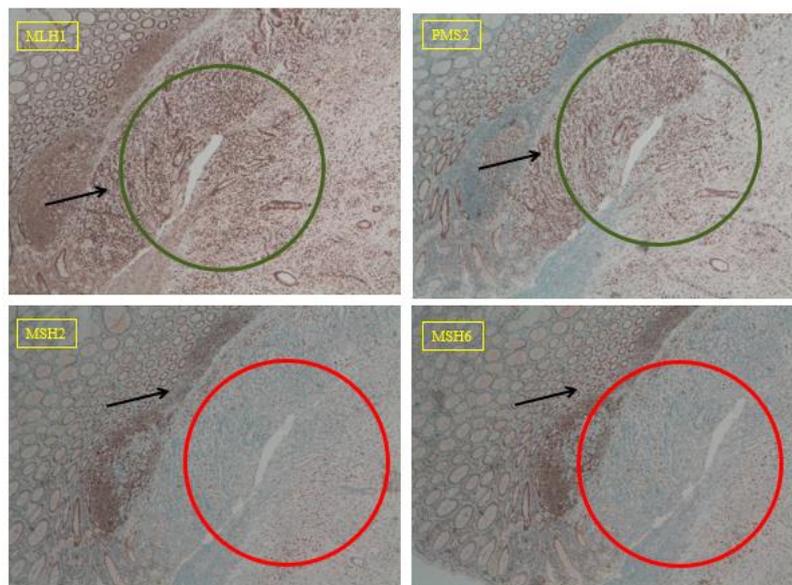


Figura 1: Acquisizione del campione mediante immunoistochimica.

## Risultati

Sono stati raccolti 740 casi, riassunti nella tabella II. Notiamo come l'analisi sia stata estesa anche ad organi diversi dal grosso intestino e dall'utero e come alcuni di questi siano risultati con un MMR deficiente.

Le percentuali di deficienza nel GRI e nell'UT sono risultate rispettivamente del 19% e del 25%, mentre negli altri organi è risultata del 5%.

	<b>Carcinomi Grosso intestino (GRI)</b>	<b>Carcinomi utero (UT)</b>	<b>Totale</b>
<b>Numero casi totali</b>	517	129	740
<b>dMMR</b>	99 (19%)	32 (25%)	136 (19%)
<b>pMMR</b>	416 (80%)	97 (75%)	602 (81%)
<b>dMLH1/PMS2</b>	78 (79%)	21 (66%)	104 (76%)
<b>dPMS2</b>	5 (5%)	3 (9%)	8 (7%)
<b>dMSH2/MSH6</b>	12 (12%)	5 (16%)	17 (12%)
<b>dMSH6</b>	4 (4%)	3 (9%)	7 (5%)
<b>BRAF <i>wild type</i></b>	24	1	25
<b>BRAF mutato</b>	47	0	48
<b>BRAF non eseguito</b>	7	20	29
<b>Iperm. MLH1 presente</b>	0	8	8
<b>Iperm. MLH1 assente</b>	8	6	14
<b>Iperm. MLH1 non es.</b>	16	7	80

Tabella II: Casi osservati. Defected MMR (dMMR), proficient MMR (pMMR), defected MLH1/PMS2/MSH2/MSH6 (dMLH1/PMS2/MSH2/MSH6), ipermetilazione promotore MLH1 (iperm. MLH1).

L'esecuzione in ICH di MMR è aumentata dal 2018 al 2021, comportando una diminuzione della percentuale di tumori dMMR riscontrati (figura 2). Ugualmente anche l'andamento dell'esecuzione dei test di biologia molecolare è in crescita (figura 3).

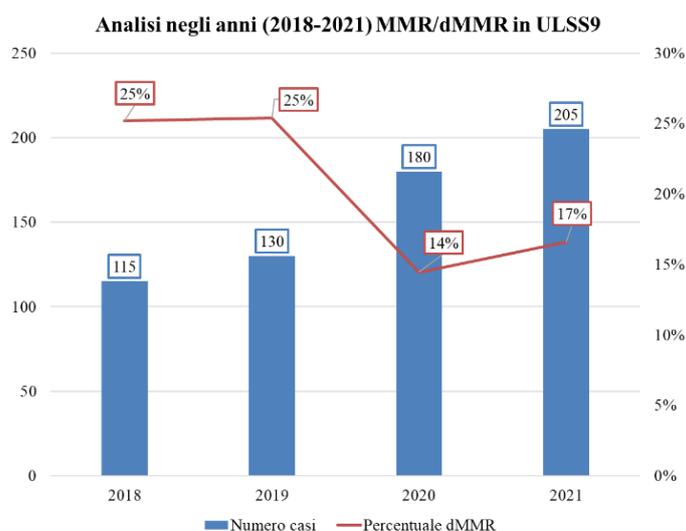
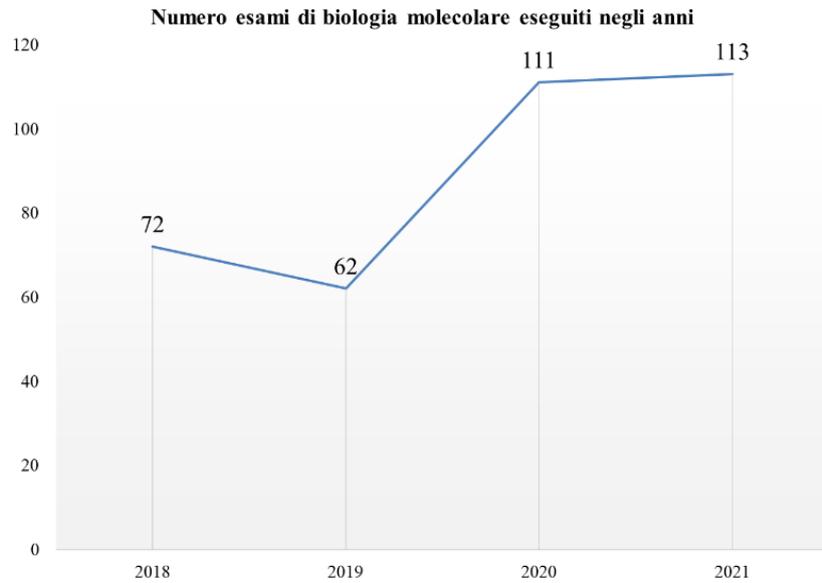
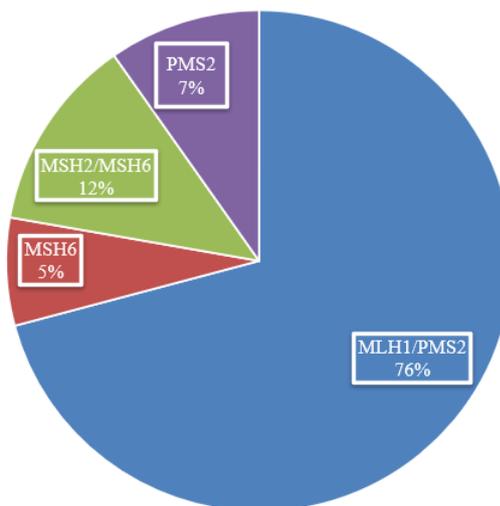


Figura 2 - Trend negli anni dei test ICH MMR, rapportati alle percentuali di tumori dMMR.



*Figura 3 - Andamento in crescita degli esami di biologia molecolare eseguiti.*

Analizzando la perdita, sia dei singoli omodimeri, che degli eterodimeri, la situazione dMLH1/PMS2 è preponderante rispetto al dMSH2/MSH6, o alle deficienze delle singole proteine (figura 4). Correlando questi ultimi dati alle classi d'età dei pazienti dello studio, si nota che dMLH1/PMS2 dimostra una relazione con la senescenza, non osservata invece nelle altre situazioni (figura 5).



*Figura 4 - Percentuali perdita singoli omodimeri e eterodimeri.*

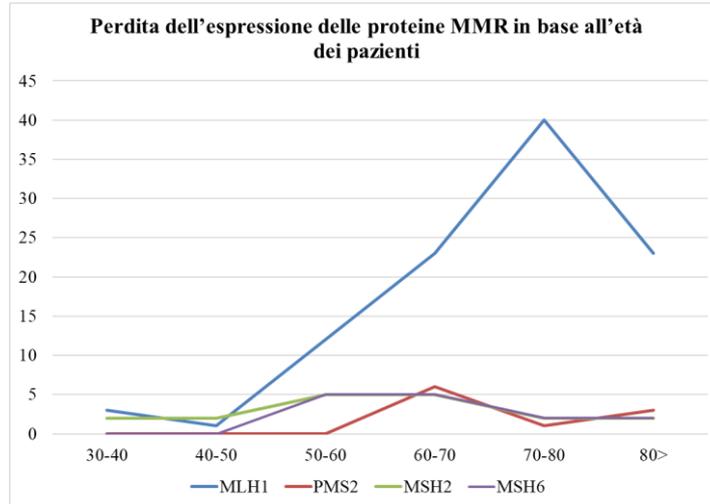


Figura 5 - Stratificazione della perdita delle singole proteine in base alle classi d'età.

## Risultati GRI

I casi totali sono 517 con un'età media di 67, anni (aa). La percentuale di deficienza media è del 19%, con un picco del 33% in pazienti con età compresa tra 70-80 aa (figura 6). Le sedi dei GRI dMMR maggiormente interessate partono dal colon ascendente destro, andando a diminuire verso il sigma-retto (figura 7).

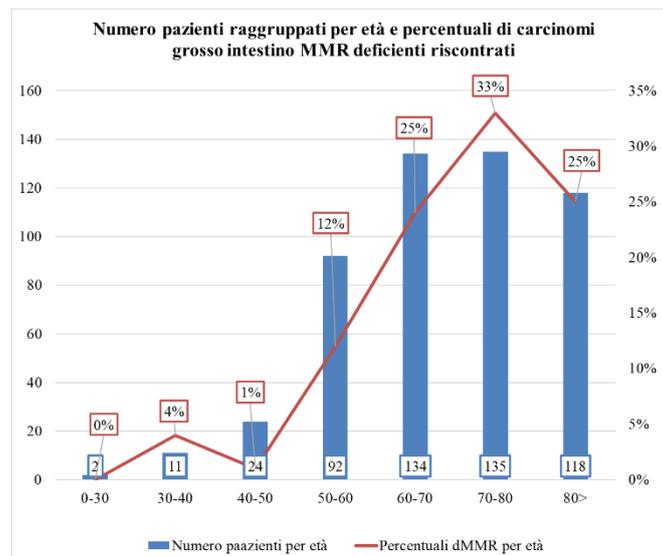


Figura 6 - Grafico rappresentante casi GRI per età, con rispettive percentuali di dMMR.

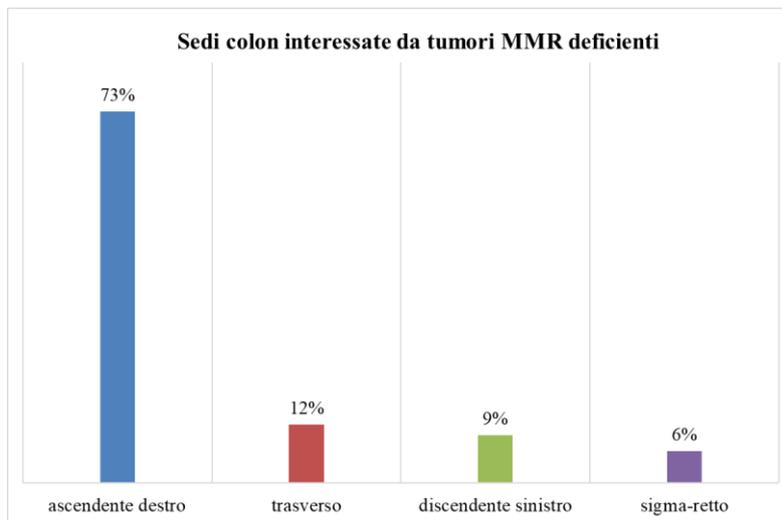


Figura 7 - Casi GRI dMMR stratificati in base alla sede interessata dalla neoplasia.

I casi dMLH1/PMS2 sono stati 78, di cui 71 hanno eseguito l'analisi di BRAF risultando 24 *wild type* e 47 mutati. Dei 24 *wild type*, 8 hanno completato lo screening eseguendo l'ipermetilazione del promotore di MLH1, risultando negativi (tabella II).

Il gene *BRAF* è risultato dunque mutato nel 62% dei casi (dMLH1/PMS2) e *wild type* nel 29% (figura 8).

L'esecuzione di questo è stata eseguita nel 64% dei casi in biologia molecolare, esternalizzando dunque il test, mentre nel 27% in ICH in sede (figura 9). Il restante 9% è stato eseguito in entrambe le tecniche, dimostrando una concordanza dell'89%.

Risultati dell'analisi del gene BRAF su carcinomi del grosso intestino con dMMR (MLH1/PMS2)

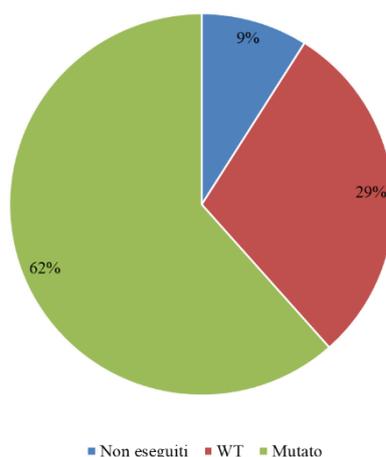
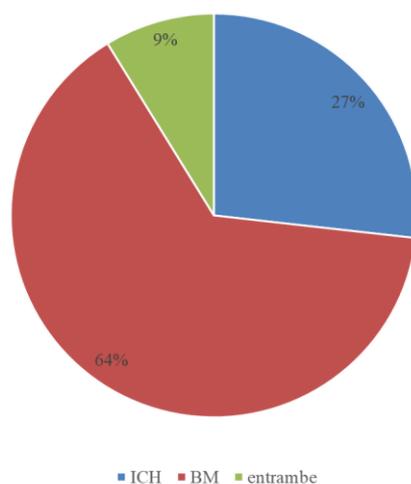


Figura 8 - Analisi dello stato mutazionale del gene BRAF ne GRI dMMR.

**Esami BRAF eseguiti in immunocistochimica (ICH) e biologia molecolare (BM) su GRI**

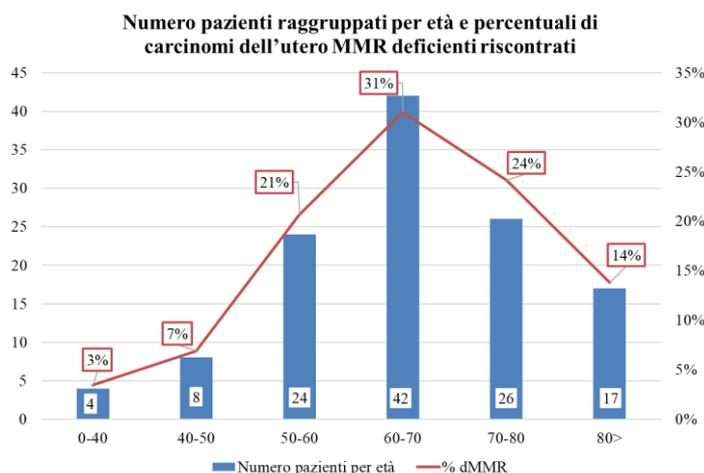


*Figura 9 - Modalità tecniche di esecuzione per l'analisi dello stato mutazionale di BRAF.*

## Risultati UT

I casi di UT sono stati 129, risultati con una deficienza media del 25%, e con un picco nella classe d'età tra 60-70 aa (figura 10).

I casi dMLH1/PMS2 sono stati 21 di cui 14 hanno eseguito l'ipermetilazione, risultando presente in 8 casi e assente negli altri 6 (tabella II).



*Figura 10 - Grafico rappresentante casi UT per età, con rispettive percentuali di dMMR.*

## Risultati TAT clinici

Abbiamo voluto valutare i giorni medi di risposta per ogni esame, rappresentati come Turn Around Time (TAT), calcolati dal giorno in cui l'esame è stato richiesto al giorno del rilascio del referto. I tempi medi degli esami esternalizzati sono mediamente superiori rispetto agli esami eseguiti in sede in ICH (figura 11).

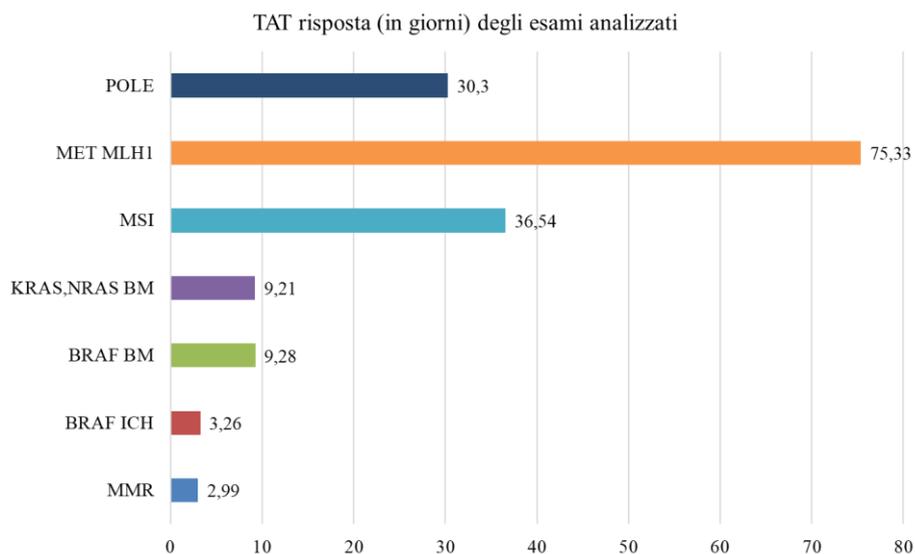


Figura 11 - Giorni medi di risposta per ogni esame analizzato. MMR in immunoistochimica (MMR), BRAF in immunoistochimica (BRAF ICH), BRAF in biologia molecolare (BRAF BM), KRAS, NRAS in biologia molecolare (KRAS, NRAS in BM), instabilità microsatelliti in biologia

## Discussione

L'aumento dell'esecuzione del test MMR associato ad una diminuzione della deficienza percentuale totale è probabilmente dovuto al fatto che questo esame sia stato esteso ad organi dove la percentuale di dMMR sia in letteratura minore (9), impattando dunque sul totale.

L'aumento dei numeri di MMR, e di esami associati in biologia molecolare, è seguito alle Linee guida pubblicate nel 2020 (7).

Il tasso di dMMR per GRI e UT è stato rispettivamente del 19% e del 25%, dato maggiore, per i GRI, rispetto a quanto osservato in letteratura dove si riscontra un 10% (8). Così come è maggiore la percentuale di BRAF mutato, che nella nostra serie corrisponde ad un 62%, mentre in letteratura è del 49% (8). Entrambi questi dati siano da imputarsi all'elevata età media dei pazienti operati nelle strutture periferiche (centri *spoke*), come quella in questione. La senescenza, infatti, è correlata alla

comparsa di mutazioni sporadiche di BRAF, che portano alla perdita della proteina MLH1, infatti nella figura 5, si nota questa correlazione.

La percentuale di soggetti inviati a CGO per Sospetti Lynch GRI è data dunque dai dMSH2/MSH6, e dai dMLH1/PMS2 con un BRAF *wild type* e ipermetilazione del promotore di MLH1 negativa o non eseguita (40 pazienti), il 7,6% di tutti i GRI.

Tra questi si tenga conto che 23 casi non hanno completato lo Screening Universale proposto, per la mancata esecuzione di BRAF o dell'iper-metilazione del promotore di MLH1, inviando direttamente i pazienti in CGO.

Per quanto riguarda gli UT, i sospetti Lynch inviati in CGO sono stati i casi dMSH2/MSH6, e quelli dMLH1/PMS2 con l'iper-metilazione del promotore MLH1 negativa o non eseguita, il 14%. I casi incompleti sono stati 7 per mancata esecuzione del promotore MLH1.

Le percentuali di Sospetti Lynch inviati in CGO risultano nettamente superiori ai dati riportati in Letteratura, e questo è probabilmente dovuto ai 30 casi che non hanno completato lo screening per GRI e UT, impattando sulla percentuale totale (4,6%).

Dall'analisi dei TAT si nota come l'esternalizzazione di un esame comporti tempi di risposta più lunghi, dovuti a ragioni di natura logistica ed organizzativa.

## Conclusioni

L'analisi del MMR è in aumento in particolar modo dopo l'approvazione dei farmaci agnostici in immunoterapia, e risulta utile non solo per grosso intestino od utero ma anche per altri organi dove abbiamo riscontrato una percentuale di tumori dMMR.

I sospetti Lynch nella nostra casistica sono risultati del 7,6 e 14% rispettivamente tra tutti i GRI e gli UT raccolti. Confrontati alle incidenze riportate in letteratura del 2,8% per i GRI e 5% per UT (1), possiamo affermare che le percentuali del nostro studio sono superiori, e si suppone che questo sia dovuto ad una percentuale di casi che non hanno completato lo Screening Universale proposto, venendo inviati direttamente in CGO come Sospetti Lynch, aumentandone la percentuale totale.

Si sospetta che il mancato completamento dello screening possa essere dovuto da una mancata informazione, oppure dal lungo tempo di risposta che richiedono gli esami di biologia molecolare esternalizzati. Sarebbe opportuno che venga diffusa alle strutture *spoke* la possibilità di eseguire questi test, permettendo il completamento dello Screening.

In CGO sono eseguite analisi più approfondite che investono tempo e risorse, pertanto si consiglia di seguire lo screening seguendo tutti gli step, al fine di limitarla allo stretto necessario. Le linee guida propongono test più rapidi ed economici, rispetto a quelli eseguiti in CGO.



## Bibliografia e Sitografia

1. Beretta, G., Capoluongo, E., Chiari, R., Cortesi, L., Danesi, R., Re, M. del, Florena, A., Fontanini, G., Gori, S., Incorvaia, L., Malapelle, U., Marchetti, A., Sangiolo, D., Silvestris, N., Tagliaferri, P., Tallini, G., Vincenzi, B., & Russo, A. (n.d.). *Raccomandazioni 2020 sui Farmaci Agnostici*. (2020).
2. Tibiletti MG, Carnevali I, Calò V, Cini G, Lucci Cordisco E, Remo A, Urso E, Oliani C, Ranzani GN; (on behalf of A.I.F.E.G.). Universal testing for MSI/MMR status in colorectal and endometrial cancers to identify Lynch syndrome cases: state of the art in Italy and consensus recommendations from the Italian Association for the Study of Familial Gastrointestinal Tumors (A.I.F.E.G.). *Eur J Cancer Prev.* (2022):44-49.
3. Kanani, A., Veen, T., & Søreide, K. (2021). Neoadjuvant immunotherapy in primary and metastatic colorectal cancer. In *The British journal of surgery* (Vol. 108, Issue 12, pp. 1417–1425). NLM (Medline).
4. Jiricny, J. (2013). Postreplicative mismatch repair. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 5, Issue 4, pp. 1–23).
5. Remo, A., & Lanza, G. (2016). Immunohistochemical evaluation of mismatch repair proteins in colorectal carcinoma: the AIFEG/GIPAD proposal. In *pathologica* (Vol. 108).
6. Luchini, C., Bibeau, F., Ligtenberg, M. J. L., Singh, N., Nottegar, A., Bosse, T., Miller, R., Riaz, N., Douillard, J. Y., Andre, F., & Scarpa, A. (2019). 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. *Annals of Oncology*, 30(8), 1232–1243.
7. Russo, A., Incorvaia, L. Estensori: AIFE, AIOM, AISP, CIPOMO, COMU, FICOG, GIPAD E SIAPEC-IAP, GISCAD, SIGE, SIGO, SIGU, SIED, SIMG, Cittadinanza Attiva. Raccomandazioni per l'implementazione del test universale su carcinomi

colorettali ed endometriali per l'identificazione della Sindrome di LYNCH. *AIOM* (2021).

8. Eikenboom, E. L., van der Werft Lam, A. S., Rodríguez-Girondo, M., van Asperen, C. J., Dinjens, W. N. M., Hofstra, R. M. W., van Leerdam, M. E., Morreau, H., Spaander, M. C. W., Wagner, A., & Nielsen, M. (2022). Universal Immunohistochemistry for Lynch Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis of 58,580 Colorectal Carcinomas. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, e496–e507.
9. Malapelle U, Parente P, Pepe F, De Luca C, Pisapia P, Sgariglia R, Nacchio M, Gragnano G, Russo G, Conticelli F, Bellevicine C, Vigliar E, Iaccarino A, Covelli C, Balistreri M, Clemente C, Perrone G, Danza A, Scaramuzzi F, Fassan M, Troncone G, Graziano P. Evaluation of Micro Satellite Instability and Mismatch Repair Status in Different Solid Tumors: A Multicenter Analysis in a Real World Setting. *Cells*. 2021 Jul 24;10(8):1878. doi: 10.3390/cells10081878. PMID: 34440647; PMCID: PMC8391221.