

Caracterización de pacientes con cáncer colorrectal esporádico basado en la nueva subclasificación molecular de consenso

ANA MARÍA WIELANDT^{1,a}, CYNTHIA VILLARROEL^{1,a},
CLAUDIA HURTADO^{1,b}, DANIELA SIMIAN^{2,c}, DIEGO ZAMORANO⁴,
MARIPAZ MARTÍNEZ^{2,c}, MAGDALENA CASTRO^{2,d}, MARÍA TERESA VIAL³,
UDO KRONBERG⁴, FRANCISCO LÓPEZ-KOSTNER⁴

Characterization of patients with sporadic colorectal cancer following the new Consensus Molecular Subtypes (CMS)

Background: Colorectal cancer (CRC) is an heterogeneous disease. Three carcinogenic pathways determine its molecular profile: microsatellite instability (MSI), chromosomal instability (CIN) and CpG island methylator phenotype (CIMP). Based on the new molecular classification, four consensus CRC molecular subtypes (CMS) are established, which are related to clinical, pathological and biological characteristics of the tumor. **Aim:** To classify Chilean patients with sporadic CRC according to the new consensus molecular subtypes of carcinogenic pathways. **Material and Methods:** Prospective analytical study of 53 patients with a mean age of 70 years (55% males) with CRC, operated at a private clinic, without neoadjuvant treatment. From normal and tumor tissue DNA of each patient, CIN, MSI and CIMP were analyzed. Combining these variables, tumors were classified as CMS1/MSI-immune, CMS2/canonical, CMS3/metabolic and CMS4/mesenchymal. **Results:** CMS1 tumors (19%) were located in the right colon, were in early stages, had MMR complex deficiencies and 67% had an activating mutation of the BRAF oncogene. CMS2 tumors (31%) were located in the left colon, had moderate differentiation, absence of vascular invasion, lymphatic and mucin. CMS3 tumors (29%) were also left-sided, with absence of vascular and lymphatic invasion, and 29% had an activating mutation of the KRAS oncogene. CMS4 tumors (21%) showed advanced stages and presence of metastases. **Conclusions:** This new molecular classification contributes to understanding the heterogeneity of tumors. It is possible to differentiate molecular subgroups of a single pathological diagnosis of adenocarcinoma, opening the door to personalized medicine.

(Rev Med Chile 2017; 145: 419-430)

Key words: Carcinogenesis; Chromosomal Instability; Colorectal Neoplasms; CpG Island; Microsatellite Instability.

¹Laboratorio de Oncología y Genética Molecular, Clínica Las Condes, Santiago, Chile.

²Dirección Académica, Clínica Las Condes, Santiago, Chile.

³Unidad de Anatomía Patológica, Clínica Las Condes, Santiago, Chile.

⁴Unidad de Coloproctología, Clínica Las Condes, Santiago, Chile.

^aBioquímico.

^bPhD en Ciencias.

^cEnfermera Universitaria.

^dEnfermera Universitaria MSC en Epidemiología.

Fuente de apoyo financiero:
Proyecto Fondecyt 1140012.

Recibido el 30 de diciembre de 2016, aceptado el 25 abril de 2017.

Correspondencia a:

Ana María Wielandt N.

Lo Fontecilla 441, Las Condes, Santiago, Chile.

awielandt@clc.cl

El cáncer colorrectal (CCR) representa un importante problema de salud a nivel mundial, ocupando el tercer lugar entre los cánceres más frecuentes y el cuarto en mortalidad por cáncer^{1,2}. En Chile, se ha duplicado

su mortalidad en los últimos años a pesar de los programas de prevención primaria, ocupando el cuarto lugar de muerte por cáncer en hombres y el quinto en mujeres³.

En los últimos años, el modelo para CCR

formulado por Vogelstein⁴ para la secuencia adenoma-carcinoma basado en la inestabilidad de diversos genes ha evolucionado⁵. Hoy en día, se ha determinado que el CCR es una enfermedad heterogénea y surge por la acumulación secuencial de procesos genéticos y epigenéticos^{6,7}. Se ha descrito que el CCR esporádico se desarrolla principalmente por 3 eventos moleculares carcinogénicos: la inestabilidad cromosómica (CIN), la inestabilidad microsatelital (MSI) y el fenotipo metilador (CIMP)⁸.

El mecanismo CIN ocurre en 65%-70% de los casos de CCR esporádico. Permite identificar ganancias o pérdidas cromosomales y rearrreglos estructurales que promueven la carcinogénesis a través de la pérdida de genes supresores de tumores o aumento en el número de copias de protooncogenes. Una de las formas de evaluarla es mediante la pérdida de heterocigosidad (LOH). La vía CIN ha sido propuesta como marcador predictivo en pacientes con etapas II y III^{9,10}.

La MSI es causada por la incapacidad de la célula cancerosa en corregir deleciones o inserciones en regiones repetitivas del ADN por el complejo de reparación "mismatch repair" (MMR). Los defectos del complejo MMR (dMMR) se deben a mutaciones o deleciones en los genes que lo conforman o la hipermetilación en la región promotora del gen MLH1. Se observa en aproximadamente 15%-20% de los casos de CCR esporádicos y se asocia a buen pronóstico^{11,12}.

La vía CIMP se caracteriza por una amplia hipermetilación de los islotes CpG en los promotores de genes supresores de tumores, provocando la inactivación de ellos. Se presenta en 15%-20% de CCR esporádicos y se le asocia a mal pronóstico^{13,14}.

Debido a la heterogeneidad y complejidad de los tumores, diversos estudios han propuesto subgrupos moleculares de CCR basados en las 3 vías antes descritas¹⁵⁻¹⁹. Los esfuerzos en determinar el perfil molecular de CCR tienen como fin comprender mejor los mecanismos que determinan el comportamiento clínico de los diferentes tumores y, de esta manera, identificar biomarcadores que proporcionen información pronóstica precoz. En base a ello, se podrá confeccionar un tratamiento personalizado a los pacientes, con el fin de mejorar su supervivencia. La subtipificación de CCR más reciente se realizó por un grupo de especialistas de varios países, que

constituyeron *The Colorectal Cancer Subtyping Consortium* (CRCSC), en el año 2015, donde se logró identificar 4 subtipos moleculares por consenso definidos en CMS 1 a 4, según las características clínico-patológicas, vías moleculares involucradas y estado mutacional de los genes KRAS, BRAF y PI3KCA, con el fin de favorecer el tratamiento clínico¹⁹. Cabe notar que en ese estudio, 21% de los tumores no lograron ser categorizados en estos cuatro subtipos.

Dada la falta de subclasificación de nuestra población, se propuso realizar un estudio exploratorio del perfil molecular de las vías carcinogénicas CIN, MSI y CIMP en pacientes con CCR esporádico sometidos a cirugía en Clínica Las Condes para determinar la prevalencia de estos 4 subtipos.

Materiales y Métodos

Diseño del estudio

Se realizó un estudio analítico exploratorio prospectivo de 53 pacientes sometidos a cirugía por neoplasias colorrectales entre los años 2010 y 2016 en Clínica Las Condes (Figura 1). Los criterios de inclusión correspondieron a pacientes tratados por neoplasias colorrectales sin terapia neoadyuvante; como criterios de exclusión se consideraron pacientes con enfermedad inflamatoria, síndromes hereditarios de CCR o tratados previamente con radio/quimioterapia. Cada paciente firmó un consentimiento informado previamente aprobado por el Comité de Bioética de Clínica Las Condes.

A partir de los datos disponibles de la ficha clínica de los pacientes, se elaboró una base de datos con características demográficas y clínico-patológicas (Tabla 1).

Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico normal se realizó a partir de una muestra de sangre venosa periférica por método Lahiri²⁰.

El ADN tumoral se extrajo mediante el *kit* de extracción QIAmp DNA FFPE Tissue de QIAGEN (Hilden, Alemania), a partir de secciones de tejido tumoral fijado en formalina y embebido en parafina (FFPE); se seleccionaron áreas de la muestra con células tumorales $\geq 80\%$. La integridad del ADN se verificó mediante reacción en cadena polimerasa (PCR) multiplex.

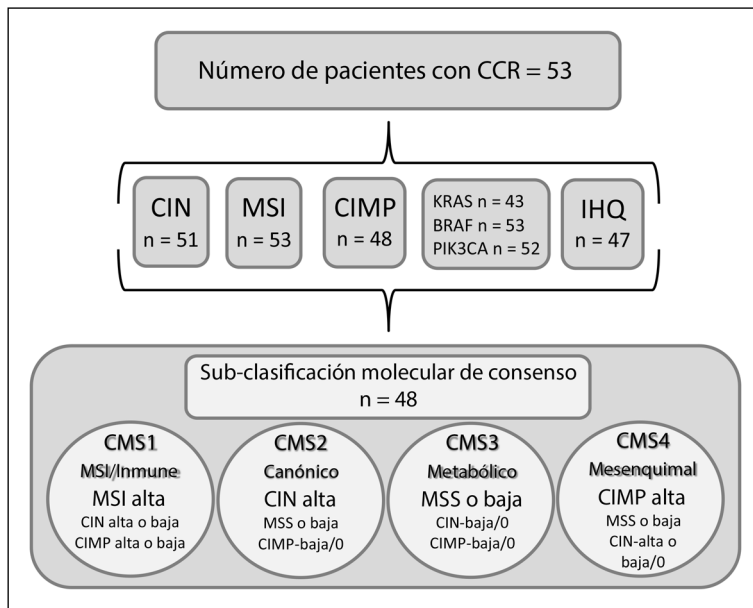


Figura 1. Flujograma de pacientes con cáncer colorrectal disponibles para el análisis de las distintas vías carcinogénicas. CCR: cáncer colorrectal; CIN: inestabilidad cromosomal; MSI: inestabilidad microsatelital; CIMP: fenotipo metilador de islotes CpG; MSS, MSI estable; IHQ: inmunohistoquímica; CMS: subtipo molecular consenso.

Análisis del estado CIN

Se realizó un análisis de delección de 10 STRs (*short tandem repeat*) aledaños a los genes APC (D5S134-D5S346-D5S656-D5S82), DCC (D18S46-D18S64-D18S69) y P53 (D17S1176-D17S1881-D17S250) mediante PCR²¹. Cada marcador microsatelital fue amplificado por PCR a partir de ADN tumoral y normal del mismo paciente. Se consideró LOH positivo si la altura relativa del *peak* del ADN tumoral disminuye 30% con respecto al ADN normal. El locus se consideró positivo si al menos uno de los marcadores informativos mostró LOH. Se considera CIN-alta si presenta sobre 3 STRs con pérdida alélica²².

Análisis del estado de MSI

Se determinó mediante el panel de siete marcadores microsatelitales recomendados por el *National Cancer Institute* (NCI) (Bat-25/Bat-26/Bat-40/D2S123/D3S1029/D5S346/ D17S250). Cada marcador microsatelital fue amplificado mediante PCR a partir de ADN tumoral y normal del mismo paciente²³. Los tumores se clasificaron en tres categorías: MSI-alta (≥ 3 marcadores inestables), MSI-baja (1-2 marcadores inestables) y MSS (sin inestabilidad).

CIMP

Se determinó utilizando MethyLight²⁴ para un panel de 6 marcadores (CACNA1G/IGF2/NEU-

ROG1/RUNX3/SOCS1/MLH1)^{25,26}. Las muestras de ADN tumoral fueron modificadas mediante el *kit EZ DNA Methylation-Gold* (*Zymo Research, Irvine, AC, USA*). Se utilizó como gen de referencia ALU-C4. Como control positivo se usó ADN metilado con enzima SssI metiltransferasa (Promega, Madison, WI, USA). Se consideró un gen metilado si presentaba sobre 80% de metilación respecto al ADN control. Los tumores se clasifican en 3 categorías: CIMP-alta (≥ 3 genes metilados), CIMP-baja (1 o 2 genes metilados) y CIMP-0 (sin genes metilados).

Análisis de mutaciones somáticas en KRAS, BRAF y PIK3CA

El ADN tumoral se analizó mediante PCR para las mutaciones más frecuentes en los genes KRAS (codón 12 y 13), BRAF (codón 600) y PIK3CA (exones 9 y 20)²⁷. Luego fueron analizados directamente por secuenciación Sanger.

Análisis de inmunohistoquímica (IHQ)

La evaluación de la expresión en el tumor de las proteínas del complejo MMR: MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 fue realizada por IHQ en tejidos FFPE²³. Para la interpretación de los resultados, se consideró una variable dicotómica positiva y negativa para la presencia o ausencia de las proteínas, respectivamente.

Tabla 1. Caracterización clínico-patológica de los pacientes con CCR analizados

	n (%)	Hombres 29 (55)	Mujeres 24 (45)	Total (n) 53 (100)	Valor p^a
Edad (años)	Mediana (mín-máx)	69 (50-89)	70 (41-97)	70 (41-97)	0,7005 ^b
Localización	Derecho Izquierdo-recto	6 (21) 23 (79)	14 (58) 10 (42)	20 (38) 33 (62)	0,0055*
Invasión vascular	Positiva Negativa	11 (38) 18 (62)	5 (21) 19 (79)	16 (30) 37 (70)	0,147
Invasión linfática	Positiva Negativa NI	9 (31) 20 (69) 0 (0)	8 (33) 15 (63) 1 (4)	17 (32) 35 (66) 1 (2)	1
Invasión de pared	pT1-T2 pT3-T4	4 (14) 25 (86)	4 (17) 20 (83)	8 (15) 45 (85)	0,1108
Estadio	I-II III-IV	13 (45) 16 (55)	11 (46) 13 (54)	24 (45) 29 (55)	1
Diferenciación	Bien-moderada Pobre	25 (86) 4 (14)	20 (83) 4 (17)	45 (85) 8 (15)	1
IMC (mín-máx)	≥ 25 (25,09-36,23) < 25 (18,73-24,65)	20 (69) 9 (31)	11 (46) 13 (54)	31 (58) 22 (42)	0,0644 ^b
Mucina	Positivo Negativo NI	7 (24) 22 (76) 0 (0)	8 (33) 13 (54) 3 (13)	15 (28) 35 (66) 3 (6)	0,226
Tumor budding	Bajo Alto NI	17 (59) 10 (34) 2 (7)	17 (71) 6 (25) 1 (4)	34 (64) 16 (30) 3 (6)	1
KRAS	WT MUT ND	19 (66) 6 (21) 4 (14)	13 (54) 5 (21) 6 (25)	32 (60) 11 (21) 10 (19)	1
BRAF	WT MUT	24 (83) 5 (17)	21 (88) 3 (12)	45 (85) 8 (15)	1
PIK3CA	WT MUT ND	22 (76) 6 (21) 1 (3)	16 (67) 8 (33) 0 (0)	38 (72) 14 (26) 1 (2)	0,2572

IMC: Índice de masa corporal. Mín: mínimo; Máx: máximo; NI: No informado; ND: No determinado; ^aTest exacto de Fischer y/ χ^2 si no hay otra especificación; ^bTest Mann-Whitney; * $p < 0,05$.

Clasificación molecular

El grupo CMS1 o inmune consideró pacientes que presentan MSI-alta independiente del estado de CIMP o CIN. En el grupo CMS2 o canónico se consideraron los tumores con CIN-alta, MSS/baja y CIMP-baja/0. El Grupo CMS3 o metabólico consideró aquellos tumores con las vías MSI, CIMP y CIN baja o estables. En el grupo CMS4 o mesenquimal se categorizaron los tumores que presentaron CIMP-alta y MSS/baja¹⁹.

Análisis estadístico

Las variables categóricas (dicotómicas y policotómicas) se describieron con frecuencia absoluta y porcentual, las continuas, con mediana e intervalo mínimo-máximo, porque no distribuyeron normal. Para comparar las categóricas, se usó Test exacto de Fischer y/o χ^2 dependiendo del menor o mayor a 30. Para continuas test de Mann Whitney (2 grupos) o Kruskal Wallis (más de 2 grupos). Se utilizó el software estadístico STATA12.

Resultados

Descripción clínico-patológica

Se analizaron un total de 53 pacientes, 55% hombres, con una mediana de edad de 70 años. Sesenta y dos por ciento de los pacientes tenía localizado el tumor en lado izquierdo. Respecto de las mutaciones somáticas, 21% (11/53) de los pacientes presentaron mutaciones activantes en el oncogen KRAS, 15% (8/53) en BRAF y 26% (14/53) en PI3KCA (Tabla 1).

Análisis MSI

Los tumores fueron categorizados en MSI-baja/MSS y MSI-alta con una prevalencia de 83% (44/53) y 17% (9/53), respectivamente (Tabla 2). Los tumores con MSI-alta tuvieron diferencias significativas respecto a edad, ubicación, preferentemente en el lado derecho del colon, presencia de patrón de invasión linfática y pobre diferenciación comparado con tumores MSI-baja/MSS con una alta prevalencia de BRAF^{mut} (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de la inestabilidad microsatelital (MSI) según las características clínico-patológicas y moleculares

	n (%)	MSI-alta 9 (17)	MSI-baja/MSS 44 (83)	Total 53 (100)	Valor p ^a
Género	Femenino	5 (21)	19 (79)	24 (100)	0,3756
	Masculino	4 (14)	25 (86)	29 (100)	
Edad (años)	< 60	0 (0)	10 (23)	10 (100)	0,0426 ^{b*}
	≥ 60	9 (21)	34 (79)	43 (100)	
Localización	Derecho	8 (40)	12 (60)	20 (100)	0,001*
	Izquierdo-recto	1 (3)	32 (97)	33 (100)	
Invasión vascular	Positiva	2 (12)	14 (88)	16 (100)	0,4462
	Negativa	7 (19)	30 (81)	37 (100)	
Invasión linfática	Positiva	6 (35)	11 (65)	17 (100)	0,0254*
	Negativa	3 (9)	32 (91)	35 (100)	
	NI	0 (0)	1 (100)	1 (100)	
Invasión de pared	pT1-T2	1 (12)	7 (88)	8 (100)	0,651
	pT3-T4	8 (18)	37 (82)	45 (100)	
Estadio	I-II	5 (21)	19 (79)	24 (100)	0,3756
	III-IV	4 (14)	25 (86)	29 (100)	
Diferenciación	Bien-moderada	5 (11)	40 (89)	45 (100)	0,0213*
	Pobre	4 (50)	4 (50)	8 (100)	
IMC (mín-máx)	≥ 25 (25,09-36,23)	5 (16)	26 (84)	31 (100)	0,5458 ^b
	< 25 (18,73-24,65)	4 (18)	18 (82)	22 (100)	
Mucina	Positiva	4 (27)	11 (73)	15 (100)	0,1757
	Negativa	4 (11)	31 (88)	35 (100)	
	NI	1 (33)	2 (67)	3 (100)	
Tumor budding	Bajo	5 (15)	29 (85)	34 (100)	0,0578
	Alto	3 (19)	13 (81)	16 (100)	
	NI	1 (33)	2 (67)	3 (100)	
KRAS	WT	5 (16)	27 (84)	32 (100)	0,512
	MUT	1 (9)	10 (91)	11 (100)	
	ND	3 (30)	7 (70)	10 (100)	
BRAF	WT	3 (7)	42 (93)	45 (100)	< 0,001*
	MUT	6 (75)	2 (25)	8 (100)	
PIK3CA	WT	7 (18)	31 (82)	38 (100)	0,5861
	MUT	2 (14)	12 (86)	14 (100)	
	ND	0 (0)	1 (100)	1 (100)	

MSI: inestabilidad microsatelital; MSS, MSI estable; IMC: Índice de masa corporal. Mín: mínimo; Máx: máximo; NI: No informado; ND: No determinado; ^aTest exacto de Fischer y/o Test χ^2 si no hay otra especificación; ^bTest Mann-Whitney; *p < 0,05.

Análisis CIMP

Sólo en 48 pacientes se logró tener ADN suficiente para determinar el estado CIMP. El 31% (15/48) de los tumores presentó CIMP-alta y 69% CIMP-baja/0. Los tumores CIMP-alta se ubicaron frecuentemente al lado derecho del colon y presentaron pobre grado de diferenciación comparado

con tumores CIMP-baja/0 y alta presencia de BRAF^{mut} (Tabla 3).

Análisis CIN

Se logró analizar el estado CIN en 51 pacientes, 10% (5/51) de los casos analizados fueron no informativos por presentar inestabilidad microsatelital.

Tabla 3. Análisis del fenotipo metilador (CIMP) según las características clínico-patológicas y moleculares

	n (%)	CIMP-alta 15 (31)	CIMP-baja/0 33 (69)	Total 48 (100)	Valor p ^a
Género	Femenino	6 (27)	16 (73)	22 (100)	0,4089
	Masculino	9 (35)	17 (65)	26 (100)	
Edad (años)	< 60	1 (10)	9 (90)	10 (100)	0,1737 ^b
	≥ 60	14 (37)	24 (63)	38 (100)	
Localización	Derecho	9 (53)	8 (47)	17 (100)	0,0198*
	Izquierdo-recto	6 (19)	25 (81)	31 (100)	
Invasión vascular	Positiva	6 (43)	8 (57)	14 (100)	0,2186
	Negativa	9 (26)	25 (74)	34 (100)	
Invasión linfática	Positiva	6 (40)	9 (60)	15 (100)	0,3126
	Negativa	9 (28)	2 (72)	32 (100)	
	NI	0 (0)	1 (100)	1 (100)	
Invasión de pared	pT1-T2	3 (38)	5 (62)	8 (100)	0,3941
	pT3-T4	12 (30)	28 (70)	40 (100)	
Estadio	I-II	5 (23)	17 (77)	22 (100)	0,1956
	III-IV	10 (38)	16 (62)	26 (100)	
Diferenciación	Bien-moderada	9 (22)	32 (78)	41 (100)	0,0026*
	Pobre	6 (86)	1 (14)	7 (100)	
IMC (mín-máx)	≥ 25 (25,09-36,23)	9 (35)	17 (65)	26 (100)	0,3732 ^b
	< 25 (18,73-24,65)	6 (27)	16 (73)	22 (100)	
Mucina	Positiva	3 (21)	11 (79)	14 (100)	0,2805
	Negativa	11 (35)	20 (65)	31 (100)	
	NI	1 (33)	2 (67)	3 (100)	
Tumor budding	Bajo	10 (30)	23 (70)	33 (100)	0,5584
	Alto	4 (33)	8 (67)	12 (100)	
	NI	1 (33)	2 (67)	3 (100)	
Metástasis	Negativa	8 (24)	26 (76)	34 (100)	0,0803
	Positiva	4 (67)	2 (33)	6 (100)	
	Otro primario	2 (50)	2 (50)	4 (100)	
	NI	1 (25)	3 (75)	4 (100)	
KRAS	WT	9 (31)	20 (69)	29 (100)	0,409
	MUT	2 (20)	8 (80)	10 (100)	
	ND	4 (44)	5 (56)	9 (100)	
BRAF	WT	10 (24)	31 (76)	41 (100)	0,0239*
	MUT	5 (71)	2 (29)	7 (100)	
PIK3CA	WT	12 (35)	22 (65)	34 (100)	0,3917
	MUT	3 (23)	10 (77)	13 (100)	
	ND	0 (0)	1 (100)	1 (100)	

CIMP, Fenotipo metilador de los islotos CpG; IMC: Índice de masa corporal; Mín: mínimo; Máx: máximo; NI: No informado; ND: No determinado; *Test exacto de Fischer y/o χ^2 si no hay otra especificación; ^bTest Mann-Whitney; *p < 0,05.

De las 46 muestras restantes, 50% fueron CIN-baja/0 y 50% CIN-alta. Los tumores con CIN-alta, al momento del diagnóstico, se encontraban en estadios más avanzados, comparado con tumores CIN-baja/0 y eran no mucinosos (Tabla 4).

Clasificación molecular

Se identificaron los 4 grupos establecidos por el CRCSC. El 9% de los pacientes quedó sin clasificar.

Al analizar las características clínico-patológicas, se observó que en los tumores CMS1 (19%) todos los pacientes eran ≥ 60 años (Tabla 5); se ubicaban en el lado derecho del colon, tenían MLH1 hipermetilado, mucina, frecuente invasión linfática, estadios tempranos y alta prevalencia de oncogen BRAF^{mut}, 7/9 pacientes presentaban mutaciones en alguno de los oncogenes. En 2 de los casos existía concomitancia de BRAF^{mut} y PI3KCA^{mut}.

Tabla 4. Análisis de la inestabilidad cromosomal (CIN) según las características clínico-patológicas y moleculares

	n (%)	CIN-alta 23 (50)	CIN-baja 23 (50)	Total 46 (100)	Valor p ^a
Género	Femenino	10 (50)	10 (50)	20 (100)	1
	Masculino	13 (50)	13 (50)	26 (100)	
Edad (años)	< 60	7 (70)	3 (30)	10 (100)	0,1084 ^b
	≥ 60	16 (44)	20 (56)	36 (100)	
Localización	Derecho	5 (36)	9 (64)	14 (100)	0,1684
	Izquierdo-recto	18 (56)	14 (44)	32 (100)	
Invasión vascular	Positiva	7 (50)	7 (50)	14 (100)	1
	Negativa	16 (50)	16 (50)	32 (100)	
Invasión linfática	Positiva	6 (43)	8 (57)	14 (100)	0,4129
	Negativa	16 (52)	15 (48)	31 (100)	
	NI	1 (100)	0 (0)	1 (100)	
Invasión de pared	pT1-T2	6 (86)	1 (14)	7 (100)	0,0835
	pT3-T4	17 (44)	22 (56)	39 (100)	
Estadio	I-II	8 (36)	14 (64)	22 (100)	0,0696
	III-IV	15 (63)	9 (38)	24 (100)	
Diferenciación	Bien-moderada	22 (52)	20 (48)	42 (100)	0,3209
	Pobre	1 (25)	3 (75)	4 (100)	
IMC (mín-máx)	≥ 25 (25,09-36,23)	14 (50)	14 (50)	28 (100)	0,9562 ^b
	< 25 (18,73-24,65)	9 (50)	9 (50)	18 (100)	
Mucina	Positiva	3 (25)	9 (75)	12 (100)	0,0442 [*]
	Negativa	19 (59)	13 (41)	32 (100)	
	NI	1 (50)	1 (50)	2 (100)	
Tumor budding	Bajo	15 (48)	16 (52)	31 (100)	0,3217
	Alto	8 (62)	5 (38)	13 (100)	
	NI	0 (0)	2 (100)	2 (100)	
KRAS	WT	17 (59)	12 (41)	29 (100)	0,0776
	MUT	3 (27)	8 (73)	11 (100)	
	ND	3 (50)	3 (50)	6 (100)	
BRAF	WT	21 (50)	21 (50)	42 (100)	1
	MUT	2 (50)	2 (50)	4 (100)	
PIK3CA	WT	16 (48)	17 (52)	33 (100)	0,5
	MUT	6 (50)	6 (50)	12 (100)	
	ND	1 (100)	0 (0)	1 (100)	

CIN: Inestabilidad cromosomal; IMC: Índice de masa corporal. Mín: mínimo; Máx: máximo; NI: No informado; ND: No determinado; ^aTest exacto de Fischer y/o Test χ^2 si no hay otra especificación; ^bTest Mann-Whitney; ^{*}p < 0,05.

Tabla 5. Comparación de las variables clínico-patológicas y moleculares con los subgrupos consenso

	n (%)	CMS1 9 (19)	CMS2 15 (31)	CMS3 14 (29)	CMS4 10 (21)	Total 48 (100)	Valor p^a
Género	Femenino	5 (22)	8 (35)	6 (26)	4 (17)	23 (100)	0,8539
	Masculino	4 (16)	7 (28)	8 (32)	6 (24)	25 (100)	
Edad (años)	< 60	0 (0)	6 (67)	2 (22)	1 (11)	9 (100)	0,0408 ^c
	≥ 60	9 (23)	9 (23)	12 (31)	9 (23)	39 (100)	
Localización	Derecho	8 (42)	2 (11)	5 (26)	4 (21)	19 (100)	0,004*
	Izquierdo-recto	1 (3)	13 (45)	9 (31)	6 (21)	29 (100)	
Invasión vascular	Negativa	7 (20)	12 (34)	10 (29)	6 (17)	35 (100)	0,718
	Positiva	2 (15)	3 (23)	4 (31)	4 (31)	13 (100)	
Invasión linfática	Negativa	3 (10)	11 (35)	10 (32)	7 (23)	31 (100)	0,138
	Positiva	6 (38)	3 (19)	4 (25)	3 (19)	16 (100)	
	NI	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	
Estadio	I	1 (17)	3 (50)	0 (0)	2 (33)	6 (100)	0,217
	II	4 (25)	3 (19)	8 (50)	1 (6)	16 (100)	
	III	2 (11)	6 (32)	6 (32)	5 (26)	19 (40)	
	IV	2 (29)	3 (42)	0 (0)	2 (29)	7 (100)	
Diferenciación	Bien-moderada	5 (13)	15 (38)	13 (32)	7 (17)	40 (100)	0,017*
	Pobre	4 (50)	0 (0)	1 (12)	3 (38)	8 (100)	
IMC (mín-máx)	≥ 25 (25,09-36,23)	5 (18)	8 (30)	7 (26)	7 (26)	27 (100)	0,7579 ^c
	< 25(18,73-24,65)	4 (19)	7 (33)	7 (33)	3 (14)	21 (100)	
Tumor budding	Bajo	5 (15)	10 (30)	11 (33)	7 (22)	33 (100)	0,7985
	Alto	3 (23)	5 (38)	3 (23)	2 (15)	13 (100)	
	NI	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	2 (100)	
Mucina	Negativa	4 (13)	11 (35)	7 (22)	9 (29)	31 (100)	0,121
	Positiva	4 (27)	3 (20)	7 (47)	1 (6)	15 (31)	
	NI	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	
Metástasis	Negativa	6 (19)	9 (28)	12 (37)	5 (16)	32 (100)	0,543
	Sincrónica	2 (24)	3 (38)	0 (0)	3 (38)	8 (100)	
	Otro primario	1 (25)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	4 (100)	
	NI	0 (0)	2 (50)	1 (25)	1 (25)	4 (100)	
KRAS	WT	5 (17)	10 (34)	8 (28)	6 (21)	29 (100)	0,8797
	MUT	1 (10)	3 (30)	4 (40)	2 (20)	10 (100)	
	ND	3 (34)	2 (22)	2 (22)	2 (22)	9 (100)	
BRAF	WT	3 (8)	14 (35)	14 (35)	9 (22)	40 (100)	0,0001*
	MUT	6 (76)	1 (12)	0 (0)	1 (12)	8 (100)	
PIK3CA	WT	7 (20)	10 (29)	10 (29)	8 (22)	35 (100)	0,9506
	MUT	2 (17)	4 (33)	4 (33)	2 (17)	12 (100)	
	ND	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	

CMS: Subtipo Molecular Consenso; IMC: Índice de masa corporal; Mín: mínimo; Máx: máximo; NI: No informado; ND: No determinado. *Test exacto de Fischer y/o Test χ^2 si no hay otra especificación; ^cTest Kruskal-Wallis *p < 0,05.

Tenían CIMP-alta a diferencia de CMS2 y CMS3 (Figura 2).

El grupo CMS2 presentó principalmente pacientes cuya edad diagnóstica fue < 60 años. Representó el grupo más frecuente (31%), se lo-

calizaron al lado izquierdo del colon, con ausencia de invasión vascular, linfática y mucina y todos ellos con grado bien/moderado de diferenciación (Tabla 5, Figura 2).

Los tumores CMS3 (29%) se presentaron

n = 48	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
MSI-alta	■			
CIMP-alta	■			
CIN-alta	■	■	■	■
Masculino	■	■	■	■
≥ 60 años	■	■	■	■
IMC ≥ 25 kg/m ²	■	■	■	■
Derecho	■	■	■	■
Etapa avanzada	■	■	■	■
Diferenciación moderada	■	■	■	■
Invasión vascular +	■	■	■	■
Invasión linfática +	■	■	■	■
Mucina +	■	■	■	■
Cáncer otro primario	■	■	■	■
Metástasis sincrónica	■	■	■	■
Metástasis metacrónica	■	■	■	■
MLH1 metilado	■	■	■	■
dMMR	■	■	■	■
KRAS ^{mut}	■	■	■	■
BRAF ^{mut}	■	■	■	■
PI3KCA ^{mut}	■	■	■	■

Figura 2. Análisis comparativo entre las variables clínico-patológicas y moleculares según los subgrupos. CMS: Subtipo molecular Consenso; MSI: Inestabilidad microsateletal; CIMP: fenotipo metilador de islotos CpG; CIN: inestabilidad cromosomal; IMC: Índice de masa corporal; dMMR: deficiencia del sistema reparador "mismatch repair". ■ Positivo; □ Negativo; ■ No determinado.

mayormente al lado izquierdo, mucinosos, sin invasión vascular ni linfática y sin mutaciones en BRAF. No se observaron metástasis sincrónicas. Tuvo el mayor porcentaje de KRAS^{mut} entre los grupos (Tabla 5, Figura 2).

Las características asociadas a tumores más agresivos como ausencia de mucina y bajo grado de diferenciación se observaron en los tumores CMS4, que correspondieron a 21%. En este grupo el estado de CIMP-alta no se acompaña de MLH1 hipermetilado, por lo que son tumores MSS (Tabla 5, Figura 2). En este grupo se observó una frecuencia de 20% (2/10) de KRAS^{mut} (Tabla 5).

Con respecto a mutaciones en PI3KCA no se observaron diferencias entre los grupos (Tabla 5).

Discusión

El presente estudio fue diseñado para caracterizar y describir las tres principales vías moleculares carcinogénicas (CIN, MSI y CIMP) involucradas en la heterogeneidad y complejidad molecular en el CCR.

En la práctica clínica, la clasificación TNM^{28,29} es utilizada como la principal herramienta pronóstica de selección de pacientes a quimioterapia adyuvante. Se ha descrito que la sobrevida de

pacientes en etapas tempranas supera 90%, pero en estadios metastásicos es inferior a 10%³⁰. En los últimos años, la incorporación de terapias moleculares ha permitido mejorar la sobrevida de estos pacientes, sin embargo, debido a la heterogeneidad de los tumores, no tienen la misma efectividad en todos los pacientes³¹⁻³⁴.

Considerando lo anterior, el año 2015 se estableció un grupo internacional de subtipificación del CCR, *The CRC Subtyping Consortium*, basado en datos provenientes de *The Cancer Genome Atlas* complementados con análisis moleculares y mutacionales¹⁹. Se establecieron 4 subgrupos de consenso: CMS1 (MSI-inmune), CMS2 (canónica), CMS3 (metabólica), y CMS4 (mensenquimal) con una prevalencia en la población internacional de 14%, 37%, 13% y 23%, respectivamente. Esta clasificación refleja una evolución biológica específica durante el desarrollo de los tumores, permitiendo definir terapias con mejor respuesta y sobrevida de los pacientes^{19,33,35}.

En este estudio se logró subclasificar a los pacientes chilenos participantes en los 4 subgrupos establecidos por el CRCSC y la prevalencia para cada subgrupo de 19%, 31%, 29% y 21% para CMS1, CMS2, CMS3 y CMS4 respectivamente, es acorde a lo descrito^{19,32,33} (Tabla 6).

Se describió que los tumores CMS1 presentan

Tabla 6. Resumen de la clasificación de los tumores de CCR en 4 subtipos basados en las variables clínico-patológicas y moleculares

n = 48	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
%	19	31	29	21
MSI	+++	-	+/-	-
CIMP	+	-	-	+++
CIN	-	+++	-	+
KRAS	-	+	+	+
BRAF	+	-	-	-
PI3KCA	+	+	+	+
Localización	D>I	I>D	I>D	D>I
Género	F>M	M>F	M>F	F>M
Mucina	+++	+	+	-
Diferenciación	+	+++	+++	++

D: derecho; I: izquierdo; F: femenino; M: masculino; MSI: inestabilidad microsatelital; CIMP: fenotipo metilador de islotes CpG; CIN: inestabilidad cromosomal; CMS: subtipo molecular consenso.

características que previamente se han reportado para tumores MSI-alta/CIMP-alta en CCR esporádico¹⁵. Se ha descrito como lesión precursora a los pólipos sésiles aserrados³⁶. Estos tumores presentan una alta respuesta de infiltrado intratumoral, lo cual confiere a estos pacientes un buen pronóstico y, según lo reportado, se sugiere que ello se debería a la presencia de linfocitos T citotóxicos CD8+³⁷⁻⁴⁰. Por otra parte, se ha establecido que la mutación activante en el oncogen BRAF (V600E) provoca la activación constitutiva de la vía EGFR y en consecuencia una ineficiente respuesta al tratamiento con cetuximab o panitumumab. Cabe señalar que estos pacientes poseen un pronóstico intermedio³³ y una tasa de supervivencia muy pobre después de la recaída³⁸. Debido a la falta de datos de seguimiento no fue posible establecer esta correlación.

Se ha reportado que los tumores CMS2 se originan a partir de adenomas tubulares, cuya progresión adenoma-carcinoma es iniciada por el gen supresor de tumores APC con una alta actividad en la vía de señalización intracelular Wnt/MYC^{35,41}. Si bien no contamos con perfiles moleculares que den cuenta de la activación de la vía Wnt/MYC,

logramos establecer que los tumores categorizados CMS2 se asocian a mutaciones en oncogenes como KRAS y PI3KCA y poseen características clínicas asociadas a una mejor respuesta a terapias asociadas a la vía CIN-alta. Se ha descrito una mejor sobrevida después de la recurrencia comparado a otros subtipos³⁵.

Hemos observado que tumores de pacientes categorizados en CMS3 exhiben la mayor tasa de mutación activante en el oncogen KRAS, indicando que estos pacientes tendrían una baja respuesta al tratamiento con cetuximab o panitumumab. Se ha descrito que este subgrupo corresponde a tumores epiteliales de pronóstico intermedio y cuya lesión precursora aún no se ha determinado³³.

Los tumores CMS4 se han descrito como el subtipo de peor pronóstico^{19,33}. Estos tumores provienen de pólipos sésiles aserrados, pero a diferencia del subtipo CMS1, presentan sobreexpresión de señales asociadas a la activación del factor de crecimiento transformante (TGF- β) que desencadena señales intracelulares asociadas a la transición epitelio-mesénquima (MET)^{35,41}.

Según nuestros datos, al momento del diagnóstico, la mayor prevalencia de tumores en estados avanzados fueron categorizados en CMS2 y CMS4. Además, presentaron la mayor proporción de metástasis (sincrónica y metacrónica). Estos resultados se podrían explicar por el alto número de ganancia o pérdida de copias de oncogenes o genes supresores de tumores presente en ambos grupos. Sin embargo, el peor pronóstico asociado al grupo CMS4 podría explicarse, además de la activación de TGF- β , por remodelamiento de la matriz, angiogénesis, invasión estromal y por alto estado de metilación de genes supresores de tumores que caracteriza a este subtipo.

En resumen, hemos logrado distinguir 4 subgrupos en CCR, con señales intracelulares diferentes que le confieren una biología única a cada tumor. Si bien esta subclasificación se ha asociado a pronóstico y respuesta a terapia, en nuestra serie no fue posible de establecer debido al corto período de seguimiento y al tamaño de nuestro grupo de estudio, siendo una de nuestras limitaciones. Se espera que la clasificación de consenso en estos 4 subgrupos faciliten la incorporación de las nuevas terapias establecidas en los grandes grupos de investigación, basadas en la heterogeneidad del tumor para dar terapia más efectiva a cada paciente.

Referencias

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: source, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136 E359-86.
2. Bray F, Ferlay J, Laversanne M, Brewster DH, Gombé Mbalawa C, Kohler B, et al. Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration. *Int J Cancer* 2015; 137 (9): 2060-71.
3. Zárate AJ, Alonso FT, Garmendia ML, López-Köstner F. Increasing crude and adjusted mortality rates for colorectal cancer in a developing South American country. *Colorectal Dis* 2013; 15 (1): 47-51.
4. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319 (9): 525-32.
5. Vogelstein B, Kinzler KW. The Path to Cancer-Three Strikes and You're Out. *N Engl J Med* 2015; 373.
6. Yiu AJ, Yiu CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anti-cancer Research* 2016; 36: 1093-102.
7. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello LC. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 16365-85.
8. Kudryavtseva AV, Lipatova AV, Zaretsky AR, Moskalev AA, Fedorova MS, Rasskazova AS, et al. Important molecular genetic markers of colorectal cancer Oncotarget 2016 Jun 2. doi: 10.18632/oncotarget.9796.
9. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, et al. Chromosomal instability (CIN) phenotype, CIN high or CIN low, predicts survival for colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30 (18): 2256-64.
10. Hveem TS, Merok MA, Pretorius ME, Novelli M, Bævre MS, Sjo OH, et al. Prognostic impact of genomic instability in colorectal cancer *BJC* 2014; 110: 2159-64.
11. Mouradov D, Domingo E, Gibbs P, Jorissen RN, Li S, Soo PY, et al. Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations *Am J Gastroenterol* 2013; 108 (11): 1785-93.
12. Issa JP. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (19): 5939-40.
13. Zhang X, Shimodaira H, Soeda H, Komine K, Takahashi H, Ouchi K, et al. CpG island methylator phenotype is associated with the efficacy of sequential oxaliplatin- and irinotecan-based chemotherapy and EGFR-related gene mutation in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 2016; 21 (6): 1091-101.
14. Cha Y, Kim KJ, Han SW, Rhee YY, Bae JM, Wen X, et al. Adverse prognostic impact of the CpG island methylator phenotype in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2016; 115 (2): 164-71.
15. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50: 113-30.
16. Sadanandam A, Wang X, de Sousa E Melo F, Gray JW, Vermeulen L, et al. Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer: Interrelationships and clinical implications. *Cell Cycle* 2014; 13 (3): 353-7.
17. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* 2013; 10 (5): e1001453.
18. Domingo E, Ramamoorthy R, Oukrif D, Rosmarin D, Presz M, Wang H, et al. Use of multivariate analysis to suggest a new molecular classification of colorectal cancer. *J Pathol* 2013; 229 (3): 441-8.
19. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015; 21 (11): 1350-6.
20. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.
21. Cawkwell L1, Lewis FA, Quirke P. Frequency of allele loss of DCC, p53, RBI, WT1, NF1, NM23 and APC/MCC in colorectal cancer assayed by fluorescent multiplex polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1994; 70 (5): 813-8.
22. Chang SC, Lin JK, Lin TC, Liang WY. Loss of heterozygosity: an independent prognostic factor of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (6): 778-84.
23. Wielandt AM, Zárate AJ, Hurtado C, Orellana P, Álvarez K, Pinto E, et al. [Lynch syndrome: selection of families by microsatellite instability and immunohistochemistry]. *Rev Med Chile* 2012; 140 (9): 1132-9.
24. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. Methy Light: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28 (8): E32.
25. Berg M, Hagland HR, Søreide K. Comparison of CpG island methylator phenotype (CIMP) frequency in colon cancer using different probe- and gene-specific scoring alternatives on recommended multi-gene panels. *PLoS One* 2014; 9 (1): e86657.
26. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phe-

- notype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38 (7): 787-93.
27. Hurtado C, Wielandt AM, Zárata AJ, Kronberg U, Castro M, Yamagiwa K, et al. [Molecular analysis of sporadic colon cancer]. *Rev Med Chile* 2015; 143 (3): 310-9.
 28. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New-York: Springer; 2010.
 29. Greene FL. Current TNM staging of colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2007; 8 (7): 572-3.
 30. Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA, ABC of Colorectal Cancer: Molecular basis for risk factors *BJM* 2000; 321: 886-9.
 31. Zlobec I, Kovac M, Erzberger P, Molinari F, Bihl MP, Ruffe A, et al. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127 (11): 2569-75.
 32. Fessler E, Jansen M, De Sousa F, Melo E, Zhao L, Prasetyanti PR, et al. A multidimensional network approach reveals microRNAs as determinants of the mesenchymal colorectal cancer subtype. *Oncogene* 2016; 35: 6026-37.
 33. Punt C, Koopman M, Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14 (4): 235-46.
 34. Blanco-Calvo M, Concha Á Figueroa A, Garrido F, Valladares-Ayerbes M. Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach. *Int J Mol Sci* 2015; 16 (6): 13610-32.
 35. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch* 2016; 469 (2): 125-34.
 36. De Sousa E, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LP, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* 2013; 19 (5): 614-8.
 37. Zárata AJ, Álvarez K, Villarroel C, Wielandt AM, Kronberg U, Cavada G, et al. Caracterización del infiltrado linfocitario (cd3, cd4, cd8, cd45ro y foxp3) e inestabilidad microsatelital en pacientes con cáncer colorrectal. *Rev Chil Cir* 2015; 67 (1): 43-50.
 38. Dunne PD, O'Reilly PG, Coleman HG, Gray RT, Longley DB, Johnston PG, et al. Stratified analysis reveals chemokine-like factor (CKLF) as a potential prognostic marker in the MSI-immune consensus molecular subtype CMS1 of colorectal cancer. *Oncotarget* 2016; 7 (24): 36632-44.
 39. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency *N Engl J Med* 2015; 372: 2509-20.
 40. Becht E, de Reyniès A, Giraldo NA, Pilati C, Buttard B, Lacroix L, et al. Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2016; 22 (16): 4057-66.
 41. Fessler E, Drost J, van Hooff SR, Linnekamp JF, Wang X, Jansen M, et al. TGF signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype. *EMBO Mol Med* 2016; 8 (7): 745-60.