



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Análisis de las variantes genéticas y epigenéticas en tumores gastrointestinales

Q.F. MSc. Marcelo Vital

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Julio 2024



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Análisis de las variantes genéticas y epigenéticas en tumores gastrointestinales

Tribunal: Dr. Eduardo Savio (Presidente)
Dra. Gabriela Irazoqui
Dra. Carolina Márquez

Director de tesis: Dra. Patricia Esperón
Unidad de Genética Molecular
Facultad de Química

Análisis de las variantes genéticas y epigenéticas en tumores gastrointestinales

Q.F. MSc. Marcelo Vital

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTOR: Dra. Patricia Esperón
Unidad de Genética Molecular
Facultad de Química, UDELAR

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial, ubicándose como la segunda neoplasia más frecuente en mujeres y la tercera en hombres.

La formación de un tumor es consecuencia de la acumulación de múltiples alteraciones tanto a nivel genético como epigenético. La mayoría son esporádicos y son consecuencia de variantes a nivel tumoral, mientras que las variantes a nivel germinal producen los diferentes síndromes de CCR hereditario.

En este trabajo nos enfocamos en el análisis de variantes en genes relacionados con procesos tumorales: genes del mecanismo de reparación de mal apareamiento (MMR), genes con patrones de metilación anómalos, y genes participantes de las vías de señalización intracelular MAPK y PI3K.

Partimos de una muestra de 108 tumores de pacientes con CCR, provenientes del Banco de Tumores del Uruguay.

- Se realizó la secuenciación y caracterización de variantes localizadas en la región promotora del gen *MLH1*. Se determinó la presencia de algunas variantes ya reportadas y asociadas a CCR y de otras variantes nuevas.
- Se determinó la prevalencia de variantes en *KRAS*, *NRAS* y *PIK3CA*, y cuáles fueron las variantes más comunes en nuestra población; además se determinó la frecuencia de la mutación puntual V600E del gen *BRAF* en nuestra cohorte.
- Se realizó el estudio de metilación del gen *MLH1* mediante 4 técnicas y concluimos que PCR-HRM es el método de detección más conveniente.
- Se determinó el estado de metilación de los genes MMR: *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *MSH6*, *RFC3* y *EXO1* y analizamos la posible presencia de deleciones/duplicaciones en las regiones promotoras de los genes *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *MSH6* y *EPCAM*. Observamos metilación en *MLH1* (10 tumores) y en *RFC3* (1 tumor); no observamos deleciones/duplicaciones en los genes analizados.
- Se determinó el estado de metilación de 8 marcadores del Fenotipo Metilador de islas de CpG (CIMP) (*CACNA1G*, *CDKN2A*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* y *SOCS1*) y se clasificaron los tumores en los fenotipos CIMP-alto, CIMP-bajo y CIMP-cero.

- Se analizó estado de metilación del gen de la septina 9 (*SEPT9*). Nuestros resultados indicaron que habría que analizar otra región del promotor, ya que nuestro análisis concluye que no sería un buen biomarcador de CCR.
- Los datos demográficos e histopatológicos de las 108 muestras permitieron analizar las asociaciones estadísticas más relevantes:
 - Respecto a *KRAS* mutado, no se encontró ningún tipo de asociación significativa. Observamos una tendencia hacia pacientes de sexo masculino, mayores de 50 años, tumores con inestabilidad de microsatélites (MSI) bajo/estable, ubicación en colon distal y tumores moderadamente diferenciados.
 - BRAFV600E se asoció con tumores MSI-alto, mujeres mayores de 60 años, tumores localizados en el colon proximal, y es excluyente con variantes en el gen *KRAS*.
 - No se encontraron variantes en los genes *NRAS* y *PIK3CA* por lo que no pudieron realizar asociaciones con estos genes.
 - *MLH1* metilado se asoció con tumores MSI-alto, con ubicación proximal y con la variante BRAFV600E. No encontramos asociación significativa con el género o edad, ni con los distintos estadios tumorales.
 - Observamos asociación significativa entre los fenotipos CIMP-bajo y CIMP-cero con *KRAS* mutado. Por otra parte, encontramos asociación entre el fenotipo CIMP-alto con tumores moderadamente diferenciados, ubicación proximal, tumores MSI-alto, *MLH1* metilado y la variante BRAFV600E.

Esta tesis dio lugar a la publicación de 2 artículos y 1 en preparación.

Vital M, Vergara C, Carusso F, Neffa F, Valle AD, Esperón P. Analysis of MLH1 promoter methylation by different methods in colorectal tumors. *Japanese J Gastroenterol Res.* 2022; 2(15): 1123. doi:10.52768/jjgastro/1123.

Vital M, Carusso F, Vergara C, Neffa F, Della Valle A, Esperón P. Genetic and epigenetic characteristics of patients with colorectal cancer from Uruguay. *Pathol Res Pract.* 2023 Jan;241:154264. doi: 10.1016/j.prp.2022.154264.

Analysis of genetic and epigenetic variants in gastrointestinal tumors

Q.F. MSc. Marcelo Vital

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTOR: Dra. Patricia Esperón
Unidad de Genética Molecular
Facultad de Química, UDELAR

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequent neoplasms worldwide, ranking as the second most frequent neoplasm in women and the third in men.

Tumour formation is the result of the accumulation of multiple alterations at both the genetic and epigenetic levels. Most are sporadic and are the consequence of variants at the tumour level, while variants at the germline level produce the different syndromes of hereditary CRC.

In this work we focus on the analysis of variants in genes related to tumour processes: genes of the mismatch repair mechanism (MMR), genes with abnormal methylation patterns, and genes involved in the MAPK and PI3K intracellular signalling pathways.

We worked with 108 tumor samples from patients with CRC, from the Tumor Bank of Uruguay.

- Sequencing and characterization of variants located in the promoter region of the MLH1 gene was carried out. The presence of some previously reported variants associated with CRC and other new variants was determined.
- We assessed the prevalence of variants in KRAS, NRAS and PIK3CA, and which were the most common variants in our population; we also determined the frequency of the V600E point mutation of the BRAF gene in our cohort.
- The methylation study of the MLH1 gene was carried out using 4 techniques and we concluded that PCR-HRM is the most convenient detection method.
- We determined the methylation status of the MMR genes: MLH1, MSH2, PMS2, MSH6, RFC3 and EXOI and analysed the possible presence of deletions/duplications in the promoter regions of the MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 and EPCAM genes. We observed methylation in MLH1 (10 tumours) and RFC3 (1 tumour); we did not observe deletions/duplications in the analysed genes.
- The methylation status of 8 CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) markers (CACNA1G, CDKN2A, CRABP1, IGF2, MLH1, NEUROG1, RUNX3 and SOCS1) was determined and tumours were classified into CIMP-high, CIMP-low and CIMP-zero phenotypes.

- Methylation status of the septin 9 gene (SEPT9) was analysed. Our results indicated that another region of the promoter should be analysed, as our analysis concludes that it would not be a good biomarker for CRC.
- The demographic and histopathological data of the 108 samples allowed us to analyze the most relevant statistical associations:
 - Regarding mutated KRAS, no significant association was found. We observed a trend towards male patients, older than 50 years, tumours with low/stable microsatellite instability (MSI), distal colon location and moderately differentiated tumours.
 - BRAFV600E was associated with MSI-high tumours, women older than 60 years, tumours located in the proximal colon, and is exclusive with variants in the KRAS gene.
 - No variants were found in the NRAS and PIK3CA genes so associations with these genes could not be made.
 - Methylated MLH1 was associated with MSI-high tumours, with proximal location and with the BRAFV600E variant. We found no significant association with gender or age, nor with different tumour stages.
 - We observed significant association between CIMP-low and CIMP-zero phenotypes with mutated KRAS. On the other hand, we found association between the CIMP-high phenotype with moderately differentiated tumours, proximal location, MSI-high tumours, methylated MLH1 and BRAFV600E variant.

This thesis led to the publication of 2 articles and 1 in preparation.

Vital M, Vergara C, Carusso F, Neffa F, Valle AD, Esperón P. Analysis of MLH1 promoter methylation by different methods in colorectal tumors. *Japanese J Gastroenterol Res.* 2022; 2(15): 1123. doi:10.52768/jjgastro/1123.

Vital M, Carusso F, Vergara C, Neffa F, Della Valle A, Esperón P. Genetic and epigenetic characteristics of patients with colorectal cancer from Uruguay. *Pathol Res Pract.* 2023 Jan;241:154264. doi: 10.1016/j.prp.2022.154264.

INDICE

RESUMEN en español	1
RESUMEN en inglés	4
1- INTRODUCCIÓN	9
1.1 Epidemiología	9
1.2 Formas de presentación del cáncer	10
1.3 Genes implicados en la carcinogénesis	10
1.4 Mecanismos moleculares asociados al CCR	11
1.4.1 - Vía supresora o de la Inestabilidad Cromosómica (CIN)	11
1.4.2- Vía mutadora o de la Inestabilidad de Microsatélites (MSI)	12
1.4.3 Vía metiladora o del Fenotipo Metilador de islas de CpG	16
1.4.3.1 Fenotipo Metilador de islas de CpG (CIMP)	17
1.4.4 Genes de vías de señalización celular relacionados con la tumorigénesis colorectal	18
2- OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo General	23
2.1 Objetivos Específicos	23
3- MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Muestras	24
3.2 Microsatélites	24
3.3 Extracción de ADN	24
3.4 Purificación de productos de PCR	24
3.4.1 A partir de geles de agarosa	24
3.4.2 A partir de la mezcla de PCR mediante digestión con las enzimas Exonucleasa I y Fosfatasa alcalina	25
3.5 Estudio de metilación del ADN	25
3.5.1 Modificación del ADN con bisulfito de sodio	25
3.5.2 Secuenciación por bisulfito (BS)	25
3.5.3 Real time PCR-High Resolution Melting (HRM)	26
3.5.4 Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)	26
3.5.5 PCR específica de metilación (MS- PCR)	27
3.5.6 Amplificación de sonda multiplex dependiente de la ligación sensible a metilación (MS-MLPA)	28
3.6 Determinación de la variante V600E del gen BRAF	28
3.7 Determinación de variantes por Secuenciación Sanger	29
3.8 Análisis estadístico	29
3.9 Identificación de regiones promotoras	29

3.10 Identificación de las islas CpG y el diseño de cebadores.....	30
4- RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
4.1 Análisis de correlaciones entre las características demográficas, clínicas e histopatológicas	33
4.2 Secuenciación y caracterización de variantes presentes en la región promotora del gen MLH1 en muestras tumorales.....	35
4.3. Estudios de asociación de la Inestabilidad de Microsatélites con características demográficas y clinicopatológicas	38
4.4 Búsqueda de variantes en los genes KRAS (exones 2, 3 y 4), NRAS (exones 2 y 3) y PIK3CA (exones 9 y 20) y determinación de la mutación BRAFV600E. Asociaciones con otros marcadores y con características demográficas y clinicopatológicas.	40
4.4.1 Gen KRAS.....	40
4.4.2 Gen NRAS	43
4.4.3 Gen BRAF.....	45
4.4.4 Gen PIK3CA.....	47
4.5 Evaluación y comparación de sensibilidad, especificidad y otras características, entre diferentes técnicas utilizadas para realizar estudios de metilación del ADN.....	49
4.5.1 MS-MLPA (Methyl Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)...49	
4.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación (MS-PCR).....	51
4.6 Determinación del estado de metilación del promotor de genes MMR y detección de deleciones/duplicaciones en las regiones promotoras de los genes MMR y en la región 3` de EPCAM.....	53
4.6.1 Análisis del perfil de metilación de los principales genes MMR: MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2.....	53
4.6.2 Estudio de metilación de otros genes participantes del mecanismo MMR.....	57
4.7 Determinación del estado de metilación de marcadores del fenotipo CIMP para CCR.....	59
4.8 Estudio de metilación del gen SEPT9.....	67
5- CONCLUSIONES.....	69
6- PERSPECTIVAS.....	72
7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXO 1 Clasificación por estadios del CCR.....	81
ANEXO 2 Vital M, Vergara C, Carusso F, Neffa F, Valle AD, Esperón P. Analysis of MLH1 promoter methylation by different methods in colorectal tumors. Japanese J Gastroenterol Res. 2022; 2(15): 1123. www.doi.org/10.52768/jigastro/1123	84
ANEXO 3 Vital M, Carusso F, Vergara C, Neffa F, Della Valle A, Esperón P. Genetic and epigenetic characteristics of patients with colorectal cancer from Uruguay. Pathol Res Pract. 2023 Jan;241:154264. doi: 10.1016/j.prp.2022.154264. Epub 2022 Dec 6. PMID: 36495761	89
AGRADECIMIENTOS.....	94

1- INTRODUCCIÓN

Cáncer colorrectal (CCR)

1.1 Epidemiología

El CCR es una de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial. La mayoría son adenocarcinomas y, si bien la tasa de incidencia sigue en aumento, las tasas de mortalidad han disminuido en los países desarrollados, en gran parte como resultado de programas de detección eficaces. Según GLOBOCAN (Global Cancer Observatory), el CCR se ubica como la segunda neoplasia más frecuente en mujeres (9,4%) después del cáncer de mama (24,5%), y es la tercera en hombres (10,6%) detrás del cáncer de pulmón (14,3%) y próstata (14,1%)¹. En 2020, se estimó que se produjeron en todo el mundo más de 1,9 millones de nuevos casos de CCR y más de 930000 muertes². En nuestro país, tanto en incidencia como en mortalidad, el CCR se ubica en segundo lugar en mujeres y tercero en hombres (Figura 1)³.

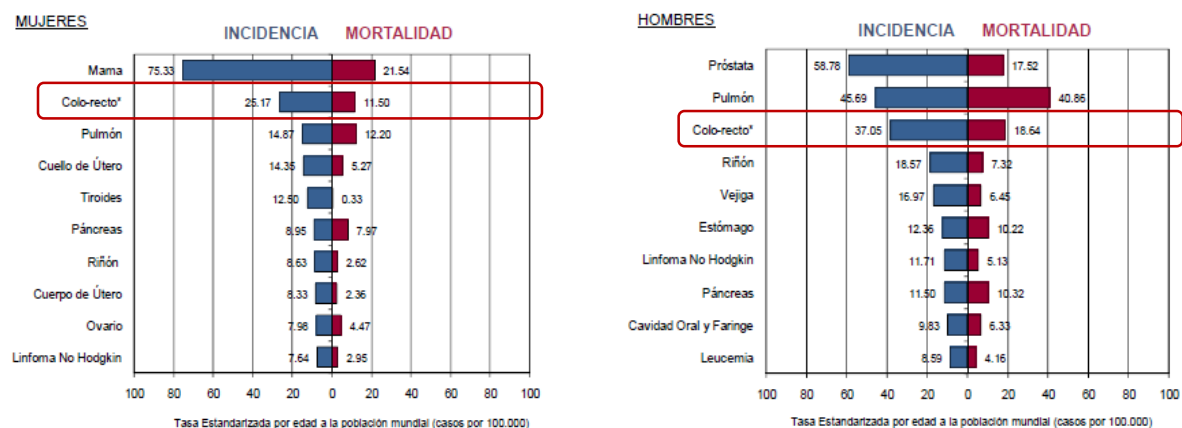


Figura 1: Datos de incidencia y mortalidad reportados por la Comisión de la Lucha Contra el Cáncer en Uruguay, año 2023.

A pesar de los importantes avances en su diagnóstico precoz y prevención secundaria, la mayoría de las muertes son debidas a la diseminación sistémica de la

enfermedad, la cual predomina a nivel hepático y peritoneal⁴. El pronóstico varía según el estadio en el momento del diagnóstico. Los cánceres en etapa temprana tienen tasas de supervivencia más altas que los cánceres en etapa avanzada. Por lo tanto, el diagnóstico oportuno, el tratamiento adecuado y el seguimiento regular son factores importantes para mejorar las tasas de supervivencia y la calidad de vida⁵.

1.2 Formas de presentación del cáncer

La mayoría de los cánceres son esporádicos (70-90% de los casos), las alteraciones genéticas se van acumulando con el tiempo, normalmente debido a la edad y el entorno. Generalmente no tiene familiares afectados y se presenta pasados los 40-50 años de edad debido a las exposiciones y mutaciones acumuladas en células somáticas. Hay algunos tipos de cáncer, que, aunque no presentan una base genética, afectan a varios miembros de la familia. En estos casos parece existir cierta predisposición genética al desarrollo de cáncer debida al contacto con algún cancerígeno habitual en el entorno familiar⁶.

El cáncer hereditario, en un menor porcentaje, aparece como consecuencia de variantes germinales en genes que incrementan la susceptibilidad para padecer cáncer. Esta susceptibilidad se transmite con un patrón mendeliano (dominante o recesivo) entre los miembros de la familia. El cáncer hereditario suele aparecer a una edad más temprana que el esporádico, y el riesgo de desarrollarlo está relacionado con el grado de parentesco con familiares que ya han desarrollado la enfermedad. En los individuos predispuestos es frecuente la presencia de tumores de localización multifocal, el desarrollo bilateral de la enfermedad y la asociación de múltiples neoplasias. Las neoplasias que afectan a los miembros de una familia suelen ser de un mismo tipo, pero también pueden encontrarse otros tumores o incluso una agrupación de distintas neoplasias⁷.

1.3 Genes implicados en la carcinogénesis

El cáncer es una enfermedad provocada por cambios genéticos y/o epigenéticos que puede sufrir una célula y que conducen a una proliferación descontrolada favorecida por

una mayor supervivencia⁸. Para estudiar la carcinogénesis hay que tener en cuenta su alta complejidad, la cual se ve reflejada en la heterogeneidad tumoral a causa del gran número de alteraciones moleculares oncogénicas descritas.

En el año 1990, Fearon y Vogelstein propusieron un modelo en múltiples etapas para la progresión de la tumorogénesis del CCR, llamado secuencia adenoma-carcinoma⁹. Este modelo considera que a lo largo de la vida ocurren mutaciones, donde algunas de ellas son “pasajeras” que no afectan el funcionamiento del tejido, mientras que otras, “conductoras”, tienen efecto pro-tumoral que incrementan la tasa de crecimiento respecto al equilibrio división/senescencia^{10, 11}. Los autores propusieron que la formación de un CCR se da a partir de una célula madre epitelial normal a través de una serie de pasos, cada uno de los cuales es causado por una nueva mutación conductora y se refleja en la progresión histológica a través del pasaje de un adenoma a un carcinoma temprano y, eventualmente, metástasis. Este modelo propone una expansión monoclonal donde la aparición de una nueva mutación conductora provoca la eliminación del clon anterior.

El modelo actualmente aceptado indica la presencia de múltiples clones competidores que coexisten, ya que inevitablemente el proceso de adquisición de mutaciones somáticas es continuo¹². Durante ese desarrollo tumoral, algunas células adquieren una mayor capacidad adaptativa y de proliferación respecto a otras, por lo que, a largo plazo, se produce una selección y sobrerrepresentación de todos los clones de células pro-tumorales generando una gran heterogeneidad¹³.

Las alteraciones genéticas pueden encontrarse en genes supresores tumorales, en proto-oncogenes, en genes relacionados con la apoptosis o en aquellos involucrados en los mecanismos de reparación del ADN.

Los oncogenes, versiones alteradas de los proto-oncogenes, son reguladores positivos de la proliferación celular que en su mayoría participan en las vías de transducción de señales, mientras que un grupo más pequeño se relaciona con la supervivencia celular¹⁴. Las mutaciones presentes en un oncogen son de tipo dominante, es decir, sólo es necesario que uno de los alelos presente la variante para que la proteína que codifica gane funcionalidad. Esto generalmente se traduce en aumento de sobrevida y proliferación¹⁵.

Los supresores tumorales son reguladores negativos que controlan la proliferación, reparación celular y apoptosis. Estos genes se pusieron en evidencia con la teoría de

Knudson en la que en los individuos afectados se produce una primera mutación en la línea germinal (primer hit) que inactiva uno de los alelos del gen. Luego, para que se genere un tumor, debe ocurrir una segunda mutación somática en el alelo normal (segundo hit) que lleva a la pérdida de la expresión. Las mutaciones de los genes supresores tumorales se traducen en una pérdida de función, permitiendo la proliferación y crecimiento descontrolado celular, además de la acumulación de nuevas mutaciones¹⁶.

Los genes de reparación son responsables de la detección y reparación del daño genético. Cuando ocurren mutaciones en estos genes, la pérdida de función de las proteínas que codifican hace a las células más sensibles a agentes que dañan el ADN y a la adquisición y acumulación de mutaciones que favorecen la carcinogénesis. Los individuos portadores de mutaciones en heterocigocia en estos genes, presentan una mayor susceptibilidad de desarrollar distintos tipos de cáncer¹⁷.

1.4 Mecanismos moleculares asociados al CCR

Desde el primer modelo de carcinogénesis propuesto por Fearon y Vogelstein, se han identificado tres grandes vías de carcinogénesis en el desarrollo del CCR:

- la vía supresora o de la inestabilidad cromosómica (CIN)
- la vía mutadora o de la inestabilidad de microsatélites (IMS)
- la vía metiladora o del Fenotipo Metilador de islas de CpG

1.4.1 - Vía supresora o de la Inestabilidad Cromosómica (CIN)

La presencia y acumulación de las mutaciones responsables de la progresión tumoral está favorecida por un estado de inestabilidad cromosómica en las células tumorales. Esta es una característica común de la gran mayoría de los tumores que acelera la acumulación de cambios genéticos. Muchos cánceres poseen un número incorrecto de cromosomas (aneuploidía). En condiciones fisiológicas normales, algunas células genéticamente alteradas pueden llegar a dividirse realizando un reparto desigual de cromosomas generando células que tendrán numerosas regiones cromosómicas perdidas, duplicadas o en pérdida de heterocigosidad¹⁸. Aunque esta nueva carga genética puede

suponer la inviabilidad celular, también puede dotar a la célula de una ventaja selectiva. La mayor heterogeneidad intratumoral que presentan estos tumores puede facilitar la resistencia a las diferentes terapias¹⁹. El fenotipo CIN puede estar asociado a la presencia de variantes en genes supresores tumorales, y a una alta prevalencia de aneuploidía, en las que las alteraciones más frecuentemente encontradas son pérdidas de segmentos cromosómicos.

1.4.2- Vía mutadora o de la Inestabilidad de Microsatélites (MSI)

Los microsatélites son secuencias de ADN de entre 1-6pb que se repiten contiguamente un número determinado de veces²⁰. Se encuentran dispersos por todo el genoma, localizándose generalmente en regiones no codificantes. Debido a su naturaleza repetitiva, son zonas propensas a generar errores en el proceso de replicación mediante la incorporación o eliminación de repeticiones.

La MSI fue descrita inicialmente en pacientes con CCR esporádico y en CCR hereditario no polipósico²¹. Alguno de los rasgos moleculares que definen a los tumores con MSI es su diploidía con pocas regiones en pérdida de heterogocidad, bajo número de mutaciones en KRAS y p53, y presencia de la mutación BRAF V600E^{22, 23}. En el año 1997 se estableció un panel de cinco marcadores genéticos (panel de Bethesda) para el análisis de MSI: dos repeticiones de mononucleótidos (BAT25 y BAT26), y tres repeticiones de dinucleótidos (D2S123, D5S346 y D17S250)²⁴. Más recientemente, se han incorporado otros marcadores mononucleótidos (NR21, NR22, NR27 y BAT40), por su mayor sensibilidad y especificidad²⁵. Según el número de marcadores inestables, los tumores se clasifican en tres grupos: tumores de alta MSI (MSI-H), tumores de baja MSI (MSI-L), y tumores sin MSI o estables (MSS). Algunos autores toman en conjunto los tumores MSI-L y MSS, ya que no parece haber diferencias ni patológicas ni clínicas entre ellos, clasificándolos solamente en 2 grupos: MSI-H y MSI-L/S²⁶.

La MSI resulta en un fenotipo mutador y es consecuencia de alteraciones genéticas o epigenéticas en alguno de los genes implicados en el sistema de reparación de bases desapareadas (MMR). Un MMR deficiente tiene como consecuencia que los errores

producidos durante la replicación del ADN no se reparen, lo que conduce a una acumulación de mutaciones puntuales y cambios en la longitud de la secuencia de microsatélites. MMR es un mecanismo de reparación que actúa durante la fase S del ciclo celular y corrige los errores generados durante replicación que escapan de la actividad correctora de pruebas de las ADN polimerasas²⁷. Los genes involucrados en este mecanismo son: MLH1 MSH2, PMS2, PMS1, MLH3, MSH6, PCNA/RFC, EXO1, RPA y HMGB1²⁸. En la Figura 2 se muestra un esquema del funcionamiento del mismo.

Según el error a reparar, MSH2 heterodimeriza con MSH6 o MSH3 para formar complejos con actividad ATPasa, que juegan un papel crítico en el reconocimiento de mal apareamiento y en el inicio de la reparación²⁹. Por otra parte, MLH1 se heterodimeriza con PMS2, PMS1 o MLH3. El complejo más abundante y primero en actuar es MSH2-MSH6 al que luego se le une MLH1-PMS2. El heterodímero MSH2-MSH6 reconoce preferentemente apareamientos erróneos base-base y pares de inserción/delección (I/D) de 1 o 2 nucleótidos, mientras que MSH2-MSH3 reconoce I/D más grandes. MLH1-PMS2 posee actividad ATPasa y endonucleasa dependiente de PCNA/RFC (factor de replicación humana C)³⁰. PCNA y EXO1 interactúan con MSH2 y MLH1, y tienen su rol en los pasos de iniciación y resíntesis de ADN^{31,32}. Otros componentes proteicos implicados en MMR incluyen la proteína de unión a ADN de cadena simple RPA y la ADN pol δ . RPA parece estar involucrada en todas las etapas de la MMR: se une al ADN heterodúplex, estimula la escisión, protege el ADN de cadena simple generado durante la escisión y facilita la resíntesis de ADN³³.

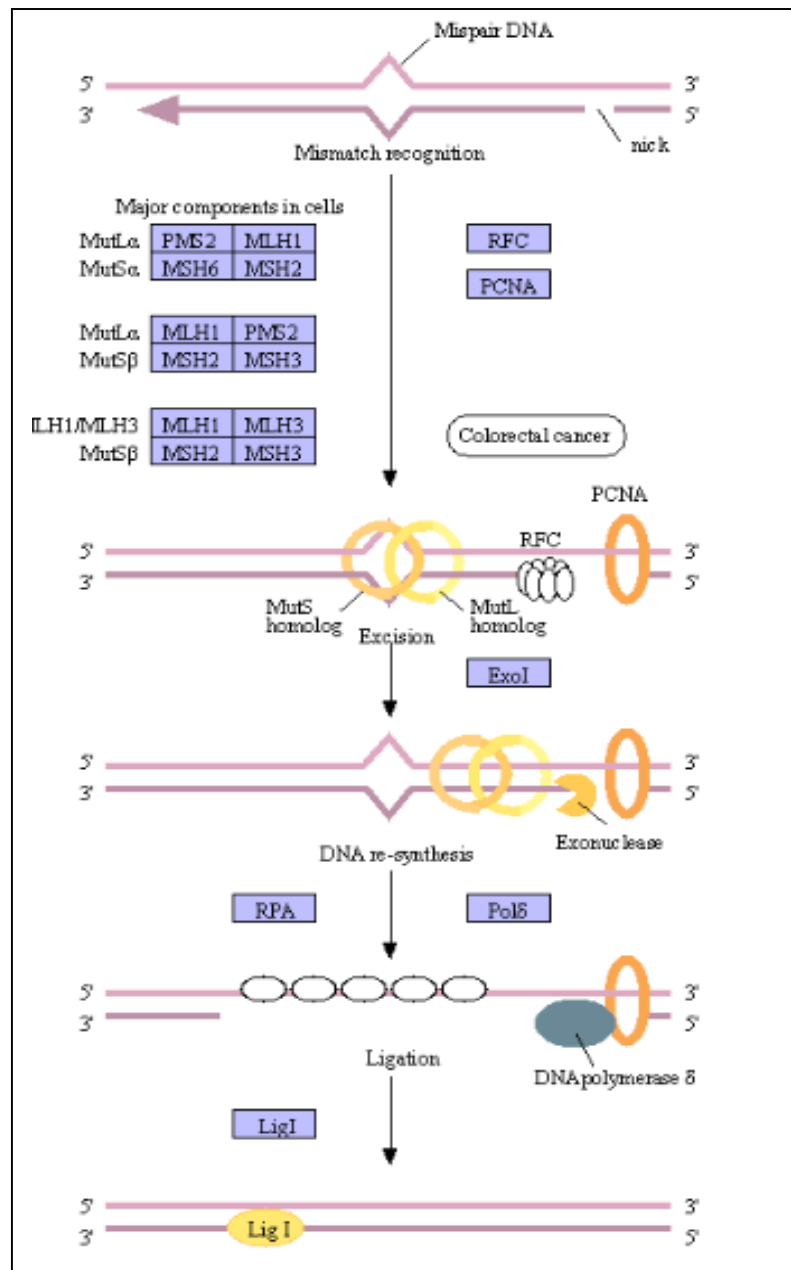


Figura 2: Mecanismo de reparación MMR donde se muestra la participación de las diferentes proteínas participantes³⁴.

La inactivación de los dos alelos de uno de los genes participantes del mecanismo MMR, conlleva un fallo de este sistema de reparación. Este fallo, trae como consecuencia una MSI, y además potencia la aparición de mutaciones que, en el caso de afectar a genes

supresores tumorales o de activar proto-oncogenes, desencadenarán el proceso de transformación tumoral.

1.4.3 Vía metiladora o del Fenotipo Metilador de islas de CpG

Los cambios epigenéticos, son aquellos cambios que regulan la expresión génica sin modificar la secuencia del ADN. Hasta la fecha se han descrito los siguientes 3 mecanismos: metilación del ADN, modificación de histonas o por la acción de ARN no codificantes³⁵. De estos tres mecanismos, el más estudiado y el más descrito en la génesis del CCR es la metilación del ADN. En células de mamífero, las enzimas encargadas de regular la metilación son las ADN metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B³⁶. Por otra parte, la enzima arginina metiltransferasa PRMT6, afecta la asociación de un factor accesorio de DNMT1, lo que conlleva a una desmetilación del ADN en esa región³⁷. La metilación del ADN, que ocurre en las islas CpG (regiones del ADN con alta densidad de pares CG), es un mecanismo habitual de regulación de diferentes mecanismos celulares, con patrones de metilación específicos de cada tipo celular. Aproximadamente el 60% de los genes humanos, que contienen islas CpG en su promotor, se regulan por este mecanismo³⁸. Los genomas de las células tumorales presentan cambios importantes en los niveles de metilación. Estos cambios son la hipometilación global del genoma, que conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; y/o la hipermetilación específica de genes, que tiene como consecuencia una disminución de su tasa de expresión. Estos diferentes niveles de metilación pueden presentarse en forma simultánea, donde la hipometilación lleva a una sobre expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis, mientras que la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes supresores tumorales³⁹.

Particularmente en CCR, un 15% de los CCR esporádicos se desarrolla mediante la vía MSI, causada principalmente por hipermetilación del promotor del gen MLH1 (>80% de los casos)^{40, 41, 42}. El promotor de MLH1 presenta 4 regiones metilables: A (-711 a -577), B (-522 a -266), C (-248 a -178) y D (-109 a +5) que han sido estudiadas utilizando líneas celulares de CCR. De estas 4 regiones, se observó que solamente la región C correlaciona el estado de hipermetilación con una inhibición de la expresión génica de MLH1⁴³. De los

demás genes participantes del mecanismo MMR, solamente un estudio ha reportado la metilación en el promotor del gen MSH2⁴⁴.

1.4.3.1 Fenotipo Metilador de islas de CpG (CIMP)

En CCR, múltiples estudios han reportado la hipermetilación de la región promotora de varios genes, entre ellos RB1, APC, MLH1, MGMT, CDH1, CDKN2A, RUNX3, y RASSF1A⁴⁵. Esto ha llevado a confirmar la existencia de un subconjunto de CCR con niveles elevados y patrones únicos de metilación del ADN, denominados Fenotipo Metilador de islas de CpG (CIMP). Este fenotipo se puede observar en un 15-20% de los CCR esporádicos y se asocia a un mal pronóstico⁴⁶. Hasta el momento, no hay un consenso respecto a qué conjunto de marcadores de metilación utilizar para definir el fenotipo CIMP. Weisenberger et al, realizó un primer screening de 195 posibles marcadores de metilación definidos como “tipo C” (marcadores metilados en tumores de CCR) y se excluyeron los denominados “tipo A”, que mostraban evidencia de metilación asociada con tejidos normales^{47, 48}. Clasificados en términos de importancia y parámetros estadísticos, se seleccionaron los marcadores CDKN2A, MINT1, MINT2, MINT31, MLH1, CRABP1, NR3C1, BCL2, BDNF, CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3 y SOCS1. Posteriormente, Ogino et al. realizaron una evaluación de estos marcadores y observaron que CRABP1, IGF2, NEUROG1, CACNA1G, MLH1, RUNX3 y SOCS1 eran los que presentaban sensibilidad y especificidad superiores al 90% al momento de clasificar los tumores como CIMP+ o CIMP-⁴⁹. Por otra parte, Noho et al. realizó un estudio similar incorporando 16 marcadores donde concluyeron que CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, CRABP1, MLH1 y SOCS, eran los que mejor se ajustaban al modelo⁵⁰.

El fenotipo CIMP se determina cuantificando la proporción de loci que se encuentran metilados entre una selección de los genes analizados. Según el número de marcadores metilados, respecto al total analizados, se distinguen los tres fenotipos CIMP: metilación alta (CIMP-H), metilación baja (CIMP-L) o ausencia de metilación (CIMP-0). Existe una falta de consenso acerca de los distintos paneles a utilizar y el número de marcadores para definir CIMP+, que queda claramente reflejado en un estudio llevado a cabo por Jia et al, donde realizaron una comparación sobre los paneles y las diferentes definiciones CIMP⁵¹. Debido a estas múltiples definiciones de CIMP, al uso de diferentes conjuntos de

marcadores de metilación, y a diferencias en metodologías de diagnóstico, actualmente existe una falta de consenso sobre la frecuencia de este fenotipo en CCR⁵². Advani et al, estimaron que la prevalencia global promedio del fenotipo CIMP era 22%, en un rango del 21%-27%⁵³.

Muchos investigadores creen que la clasificación de tumores basada en subtipos moleculares mejora la estratificación de los tumores. La estratificación del CCR se realiza en función de las características clínicas y patológicas (como la localización del tumor, el estadio o el grado de diferenciación) y en función de sus diferentes características moleculares como CIN, MSI y CIMP.

Uno de los primeros estudios centrados en subtipos moleculares fue el de Jass et al⁵⁴. Los autores propusieron cinco subtipos moleculares de CCR basados en el estado de CIN y CIMP. Más adelante, se introdujo otra clasificación donde los tumores se clasificaron en diferentes grupos según el perfil de metilación, presencia o no de mutación BRAF, estado de MSI, y tomando en cuenta el género, la diferenciación y la ubicación tumoral⁵⁵.

de Sousa et al.⁵⁶ clasificaron los tumores en tres subtipos, CCS1 asociado con CIN y del lado izquierdo, CCS2 asociado principalmente con MSI y del lado derecho, mientras que los resultados para el subtipo CCS3 fueron más controvertidos. Luego, Kaneda y Yagi⁵⁷ desarrollaron como marcadores de metilación el “modelo de dos paneles”. Primero, agruparon los tumores en tres epigenotipos: de baja, intermedia o de alta metilación, pero luego esta estratificación fue reemplazada por la clasificación CMS1 a CMS4⁵⁸. Esta estratificación molecular se denominó "subtipos moleculares consenso" y se estableció como CMS1 (subtipo inmune MSI), CMS2 (subtipo canónico), CMS3 (subtipo metabólico) y CMS4 (subtipo mesenquimal). En general, la categorización de CMS proporciona una visión detallada de la etiología del CCR, pero actualmente todavía no tiene un impacto real en la toma de decisiones clínicas.

1.4.4 Genes de vías de señalización celular relacionados con la tumorigénesis colorectal

La comunicación permanente entre las células de organismos pluricelulares ocurre a través de señales mediadas por moléculas que regulan el metabolismo, la diferenciación, el comportamiento celular, la proliferación y la apoptosis. La interacción de estas moléculas

con sus células dianas, mediante receptores de membrana, produce la activación de rutas específicas de transducción de señales. Estas señales son transmitidas hacia el interior celular a través de vías de señalización para generar la respuesta adecuada⁵⁹. Las vías de señalización celular se encuentran bajo control enzimático, por lo que el aumento o disminución en la actividad enzimática de las proteínas que componen la vía inciden en el proceso de regulación. Entre las vías de señalización intracelular, MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) y PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) son las vías más frecuentemente mutadas en CCR (Figura 3)⁶⁰.

- La vía efectora MAPK, también identificada como la vía RAF-MEK-ERK, está involucrada en la señalización mitogénica de los receptores de tirosina quinasa, llevando a crecimiento, diferenciación, inflamación y apoptosis⁶¹. RAF es un miembro de la familia de serina/tirosina quinasa que incluye RAF-1, ARAF y BRAF (B-Raf protooncogene serine/threonine kinase)⁶². Esta familia RAF se une a la región efectora de RAS-GTP, fosforilando y activando la proteína RAF. Esta activación induce una cascada de señalización, que fosforila la proteína quinasa MEK, que a su vez fosforila y activa el efector corriente abajo, quinasa 1 y 2 (ERK1 y ERK2). La activación de estas quinasas ERK produce su translocación al núcleo donde activa y fosforila factores de transcripción nucleares y quinasas⁶³.

- La familia de efectores RAS, PI3K, está involucrada en los procesos de supervivencia y proliferación celular⁶⁴. Luego de la interacción ligando-receptor tirosina (RTK), el receptor se dimeriza y autofosforila. Esto permite la activación de PI3K, que convierte el fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). PIP3 se une al dominio de homología pleckstrin (PH) de Akt y estimula la fosforilación de proteínas que afectan el crecimiento celular, ciclo celular y supervivencia. La desfosforilación PIP3 a PIP2 está regulada por la fosfatasa supresora de tumores PTEN⁶⁵.

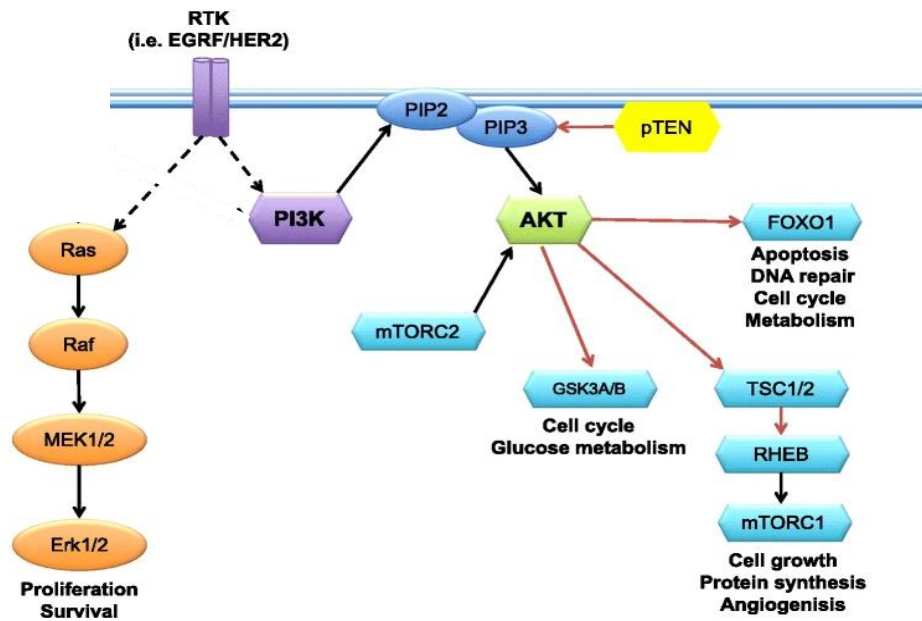


Figura 3: Diagrama de las vías RAS/RAF/MEK/MAPK y PI3K/AKT/mTOR (extraída de Toss et al 2015⁶⁶).

Las variantes en los genes KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), NRAS (Neuroblastoma ras viral oncogene homolog) y BRAF han estado involucradas en el desarrollo de CCR por la activación anormal de la vía MAPK. Mientras que la vía alternativa PI3K/AKT/mTOR se encuentra regulada positivamente por variantes del gen PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5- biphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) en el que se han reportado variantes en diferentes tipos de tumores. Las presencias de variantes que activan estas vías, lleva a la activación de factores de transcripción que controlan la expresión de genes relevantes para la proliferación celular y migración^{67, 68, 69, 70}.

KRAS pertenece al grupo de proteínas pequeñas de unión al GTP. La familia RAS se divide en seis subfamilias (RAS, RAL, RAP, RHEB, RAD y RIT) y comúnmente tiene un dominio G catalítico. Las más estudiadas en la familia RAS son KRAS, NRAS y HRAS (Harvey-Ras viral oncogene homolog). Por lo general, la vía de señalización de RAS es activada por receptores de la proteína tirosina quinasa, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR).

KRAS puede encontrarse de manera inactiva cuando está unido a GDP o en un estado activo cuando interacciona con GTP. Cuando la proteína KRAS se encuentra mutada, ésta tiende a interactuar más fuertemente con GTP que con GDP por lo que influye en la activación del efector corriente abajo, incluso en ausencia del factor de crecimiento⁷¹.

El gen NRAS, codifica para la proteína NRas con actividad GTPasa, y está implicado en la patogénesis de varios tipos de cánceres, melanoma cutáneo, melanoma, adenocarcinoma de colon, leucemia mieloide aguda, adenocarcinoma de pulmón, entre otros,⁷². NRAS se encuentra alterado en el 3% del total de los tumores, y las variantes más frecuentes se encuentran en “hotspots” que incluyen los exones 2, 3 y 4⁷³. Estos cambios genéticos están menos estudiados en comparación con las mutaciones KRAS y BRAF⁷⁴. Las características clínicas y patológicas de los pacientes con variantes en NRAS son similares a la de los pacientes con variantes en KRAS⁷⁵.

Otro de los protagonistas más estudiados que desempeña un papel en la activación de la vía MAPK es el gen BRAF. Aproximadamente el 90% de las mutaciones BRAF se producen a nivel de la transversión T1799 en el exón 15, que lleva a la sustitución del ácido glutámico por valina (V600E)⁷⁶. Esta sustitución regula la fosforilación aumentando la actividad BRAF aproximadamente diez veces en comparación con la proteína silvestre⁷⁷. Los pacientes de CCR con mutación BRAF representan el 8-12% de todos los pacientes que padecen CCR. Las mutaciones BRAF y KRAS son mutuamente excluyentes, pero la mutación BRAF puede coexistir con variantes en el gen PIK3CA^{78, 79}.

El gen PIK3CA, codifica para la subunidad catalítica p110-alfa de PI3K, este está comúnmente mutado en varios tipos de cánceres, por ej. ovario, mama, pulmón, colon, entre otros^{80, 81}. La mayoría de las variantes se localizan específicamente en tres sitios, E542 y E545 en el dominio helicoidal (exón 9) y H1047 en el dominio quinasa (exón 20)⁸². Las mutaciones de PIK3CA están significativamente asociadas con la presencia de variantes en KRAS y con la pérdida de la expresión de MGMT (O6-metilguanina-DNA metiltransferasa), mientras que se reportaron correlaciones menos claras con BRAFV600E^{83, 84}.

La importancia de realizar la búsqueda de variantes en estos genes, radica en la posibilidad de realizar una terapia dirigida contra los tumores. La terapia dirigida es un tratamiento que apunta a genes, proteínas, o a las condiciones del tejido que contribuyen al crecimiento y a la supervivencia del tumor, bloqueando el crecimiento y la diseminación de las células cancerosas y limitando el daño a las células sanas. Por ej. en el caso de CCR metastásico, la American Society of Clinical Oncology (ASCO) recomienda antes de usar un inhibidor EGFR, realizar la detección de mutaciones del gen RAS y RAF en los tumores. En caso de presentar una variante en BRAF, la recomendación consiste en no utilizar inhibidores EFGR. Las variantes aceptadas hasta el momento como factor predictivo de resistencia a la terapia anti-EGFR, son la variante V600E del gen BRAF^{85, 86} y las que se encuentran principalmente en los exones 2, 3 y 4 de los genes KRAS y NRAS^{87, 88, 89, 90}. Sin embargo, dado que un 50-60% de los pacientes con tumores RAS de tipo salvaje no se benefician de una terapia anti-EGFR, se han analizado otros biomarcadores entre los que se encuentra el gen PIK3CA lo que explicaría la resistencia a este tipo de terapia. En algunos estudios se ha observado una resistencia significativa a la terapia^{91, 92, 93}, mientras que en otros las variantes en PIK3CA no predijeron la respuesta anti-EGFR⁹⁴.

2- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Análisis de los eventos genéticos y epigenéticos relevantes en el cáncer colorrectal en una muestra de tumores de la población uruguaya

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Relevamiento de las características demográficas y clinicopatológicas de pacientes y tumores para la posterior realización de estudios de asociación.
- 2) Secuenciación y caracterización de variantes localizadas en la región promotora del gen MLH1.
- 3) Búsqueda de variantes en los genes KRAS (exones 2, 3 y 4), NRAS (exones 2 y 3) y PIK3CA (exones 9 y 20) y determinación de la mutación BRAFV600E. Asociaciones con otros marcadores y características demográficas y clinicopatológicas.
- 4) Puesta a punto de diferentes técnicas utilizadas para realizar estudios de metilación del ADN.
- 5) Caracterización del estado de metilación de genes MMR y detección de deleciones / duplicaciones en las regiones promotoras de los genes MMR y en la región 3' de EPCAM
- 6) Determinación del estado de metilación de marcadores del fenotipo CIMP para CCR.
- 7) Determinación del estado de metilación del gen de la septina 9 (SEPT9).

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras

Se incluyeron 108 muestras de tejido tumoral del Banco de Tumores del Hospital Central de las FFAA. De las historias clínicas se obtuvieron los datos demográficos (edad, género) y características relacionadas con el tumor (localización, diferenciación, estadio). Este estudio cuenta con el aval de los Comité de Ética del Hospital Militar y de la Facultad de Química.

3.2 Microsatélites

Se partió de 54 MSI-H y 54 MSI-L/S tipificadas por el laboratorio del Banco de Tumores del Hospital Militar mediante la amplificación de los marcadores propuestos en el panel de Bethesda⁹⁵.

3.3 Extracción de ADN

Se obtuvo el ADN genómico de tejido tumoral, congelados o embebidos en parafina. Para las muestras de tejidos tumoral congelado, se utilizó el kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) (rendimiento de 70 a 120ng/μL). De las muestras de tejidos embebidos en parafina, el ADN se aisló a partir secciones de 5um de tejido con ≥80% de tejido tumoral, y se utilizó el kit QIAamp DNA FFPE Mini (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) (rendimiento de 10 a 40ng/μL). El ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c.

3.4 Purificación de productos de PCR

3.4.1 A partir de geles de agarosa

Una vez realizada la electroforesis se realiza la purificación del fragmento de interés mediante el kit comercial QIAquick de Qiagen.

3.4.2 A partir de la mezcla de PCR mediante digestión con las enzimas Exonucleasa I y Fosfatasa alcalina

Luego de realizada la amplificación por PCR, se debe asegurar que se obtuvo un único producto de reacción. Para ello se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, a 100V durante 50 minutos. El gel se revela con la técnica de nitrato de plata.

A 10uL de reacción de PCR se agrega:

1μl de fosfatasa alcalina (1U/μL)

0.5μL de Exonucleasa I (20U/μL)

Se realiza una incubación durante 1h a 37°C e inactivación 5min a 80°C.

3.5 Estudio de metilación del ADN

3.5.1 Modificación del ADN con bisulfito de sodio

La conversión del ADN con bisulfito se realizó utilizando el kit EZ DNA Methylation-Lightning (Zymo Research, Irvine, CA, EEUU). El tratamiento con bisulfito de sodio consiste en una reacción de dos pasos. Primero, la sulfonación en la posición C-6 de la citosina produce un sulfonato de citosina que luego, por desaminación hidrolítica, se convierte en un sulfonato de uracilo. Finalmente, la eliminación del grupo sulfonato, en condiciones alcalinas, conduce a la conversión en uracilo. Cuando el sitio CpG se encuentra metilado, el grupo metilo en la posición C-5 bloquea la formación de citosina de sulfonato, por lo que, luego del tratamiento con bisulfito de sodio, las citosinas no metiladas se convierten en uracilo, mientras que las citosinas metiladas permanecen incambiadas.

3.5.2 Secuenciación por bisulfito (BS)

El ADN extraído de las muestras tumorales, previamente modificado con bisulfito, se amplificó usando dos rondas de PCR con cebadores diseñados a partir de las secuencias de referencia publicadas en la base de datos NCBI. La secuencia de los primers, temperatura de hibridación, número de ciclos y longitud de los fragmentos amplificados se

muestran en la tabla 1. Para todas las regiones estudiadas, la primera ronda de PCR se realizó en tampón de PCR 1X, 0,2μM de cada cebador, 0,8nM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1uL de ADN genómico modificado y 0,3U de ADN polimerasa Hot Start (Promega) en un volumen final de 10μL. La segunda amplificación se realizó en las mismas condiciones utilizando como molde 1uL de ADN obtenido de la primera ronda. Los productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa al 2% utilizando el kit comercial (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) o mediante digestión con las enzimas Exonucleasa I y fosfatasa alcalina. El análisis de los fragmentos se realizó en un sistema ABI 3730xl (servicio de Macrogen Inc).

3.5.3 Real time PCR-High Resolution Melting (HRM)

El ADN extraído de las muestras tumorales, previamente modificado con bisulfito, se amplificó usando dos rondas de PCR. La secuencia de los primers, temperatura de hibridación, número de ciclos y longitud de los fragmentos amplificados se muestran en la tabla 1. La primera ronda de PCR se realizó en tampón de PCR 1X, 0,2μM de cada cebador, 0,8nM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1uL de ADN genómico modificado y 0,3U de ADN polimerasa Hot Start (Promega) en un volumen final de 10μL. La segunda ronda se realizó con 0,7μM de cada cebador, 1μL de molde de ADN obtenido de la primera ronda, en una mezcla de PCR-HRM (Type IT HRM kit, Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). La reacción se llevó a cabo en un Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen, EE. UU.) con el siguiente programa: 95 °C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de 95°C durante 10s, 55°C durante 15s y 72°C durante 10s. El posterior análisis HRM se realizó con un modo de adquisición de fluorescencia continua de 73°C a 80°C a una velocidad de rampa de 0,1 °C/s⁹⁶.

3.5.4 Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

El ADN extraído de las muestras tumorales, previamente modificado con bisulfito, se amplificó usando dos rondas de PCR. La secuencia de los primers, temperatura de

hibridación, número de ciclos y longitud de los fragmentos amplificados se muestran en la tabla 1. La primera ronda de PCR se realizó en tampón de PCR 1X, 0,2μM de cada cebador, 0,8nM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1uL de ADN genómico modificado y 0,3U de ADN polimerasa Hot Start (Promega) en un volumen final de 10μL. La segunda amplificación se realizó en las mismas condiciones utilizando como molde 1uL de ADN obtenido de la primera ronda. El producto de la segunda amplificación se digirió con la enzima de restricción BstUI (New England Biolabs) (10U/μL)⁹⁷.

Luego de realizada la segunda amplificación por PCR, se debe asegurar que se obtuvo un único producto de reacción. Para ello se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, a 100V durante 50 minutos. El gel se revela con la técnica de nitrato de plata.

Una vez verificada la presencia de una sola banda, se incuban 10μL del producto de amplificación con 0,5ul de BstUI durante 4hs a 37°C. Luego se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, a 100V durante 50 minutos. El gel se revela con la técnica de nitrato de plata.

Si el ADN se encuentra metilado, el sitio de reconocimiento de la enzima (CGCG) se mantiene y la enzima digiere el fragmento de 261pb liberando dos fragmentos, uno de 145pb y otro de 116pb. Si el ADN no se encuentra metilado, el sitio CGCG se convierte en TGTG por lo que luego de la digestión sólo se observa el fragmento de 261pb.

3.5.5 PCR específica de metilación (MS- PCR)

El ADN extraído de las muestras tumorales, previamente modificado con bisulfito, se amplificó usando dos rondas de PCR. La secuencia de los primers, temperatura de hibridación, número de ciclos y longitud de los fragmentos amplificados se muestran en la tabla 1. Las condiciones de reacción se detallan en el capítulo de Resultados y Discusión.

3.5.6 Amplificación de sonda multiplex dependiente de la ligación sensible a metilación (MS-MLPA)

Los estudios de metilación se llevaron a cabo utilizando los kits comerciales: SALSA MS-MLPA Probemix ME011-C1 (MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos) que permite analizar el estado de metilación de los genes MLH1 y MSH2, MSH6, PMS2; y el kit SALSA MS-MLPA Probemix ME042-C1 CIMP assay (MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos) que utiliza los siguientes 8 marcadores para evaluar el estado de metilación del tejido tumoral: CACNA1G, CDKN2A, CRABP1, IGF2, MLH1, NEUROG1, RUNX3 y SOCS1. Cada uno de ellos presenta diferentes números de sondas, que varían entre 3 y 6, para analizar su estado de metilación. Por ejemplo, el marcador RUNX3 contiene 3 sondas (de 258, 346 y 371pb), mientras que NEUROG1 contiene 6 sondas. Para cada sonda se calculó su metilación relativa (%) comparando con el valor de metilación obtenido para esa misma sonda, en la muestra de referencia. La sonda se consideró como metilada si el valor superaba el 20% de metilación relativa. Luego, para considerar el marcador como metilado, el criterio utilizado fue que el 100% de las sondas fueran metiladas⁹⁸. Los tumores sin marcadores metilados se clasifican como CIMP-0; aquellos con 1-4/8 se clasifican como CIMP-L y con 5-8/8 como CIMP-H, según Ogino et al⁹⁹.

Se determinó la sensibilidad de cada marcador para la determinación de CIMP-H, definida como el cociente entre el número de casos positivos de CIMP-H para un marcador dado sobre el total de casos CIMP-H. La especificidad se calculó como el cociente entre el número de casos CIMP-H negativos para un marcador sobre el total de casos CIMP-H negativos.

3.6 Determinación de la variante V600E del gen BRAF

Se analizó mediante el uso de sondas TaqMan® utilizando el equipo Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen, EE. UU.) con el siguiente programa: 95 °C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de 95°C durante 15s y 60°C durante 60s donde se adquirió la fluorescencia de las sondas en los canales Yellow (530-555nm) y Green (470-510nm). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10ul a partir de 5uL de Universal master mix 2X, 1uL de ADN y 0.5uL de sonda TaqMan® (Hs00000111_mu). Los datos de fluorescencia se analizaron utilizando la interfase de discriminación alélica.

Por otra parte, el estado de BRAFV600E también se determinó a partir de los ensayos de MS-MLPA.

3.7 Determinación de variantes por Secuenciación Sanger

El ADN se amplificó usando cebadores diseñados con el programa Gene Runner a partir de las secuencias de referencia publicadas en la base de datos NCBI. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 20uL conteniendo 10uL de mezcla de reacción BioMix (Bioline) 20x, 2μM de cada cebador y 2μL de ADN genómico. Los productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa al 2% utilizando un kit comercial (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) o mediante digestión con las enzimas Exonucleasa I y fosfatasa alcalina. El análisis de los fragmentos se realizó en un sistema ABI 3730xl (servicio de Macrogen Inc). La secuencia de los primers utilizados para cada región analizada, así como la temperatura de hibridación, número de ciclos y longitud de los fragmentos, se encuentran detallados en la tabla 2.

3.8 Análisis estadístico

El cálculo de frecuencia alélica se realizó por conteo directo. Para el análisis estadístico de los estudios de asociación, se aplicó la prueba χ^2 o test exacto de Fisher, utilizando el software IBM SPSS Statistics (versión de prueba) o el programa VassarStats. La significancia estadística se estableció en $p \leq 0.05$.

3.9 Identificación de regiones promotoras

Para la identificación de la secuencia promotora de los distintos genes se utilizó el siguiente sitio web:

https://www.genecopoeia.com/product/search3/?s=MV10&search_type=1

En este sitio se encuentran construcciones plasmídicas que contienen la secuencia promotora de diversos genes.

3.10 Identificación de las islas CpG y el diseño de cebadores

Para la identificación de las islas CpG, establecer los criterios de densidad de dobletes CpG y longitud de la región, así como para el diseño de primers, se utilizó el programa bioinformático que se encuentra en el siguiente link: <https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>.

En varias ocasiones, los primers brindados por el programa no cumplían las mejores condiciones, por lo que fueron de diseño propio.

Gen	Técnica	Primer	Secuencia	Amplicon (pb)	TM (Nº ciclos)
MLH1 (región C)	BS	RegC- FE	TAGGGTTAACGTTAGAAAGGTCGTAAGG	544	52(40)
		RegC-RE	ATAACATTAATAACCGCTAAATAACTT		
		RegC-FI	AAAGGTCGTAAGGGGAGAGGAGGAGTT	336	52(40)
		RegC-RI	AACTTACGCCATCCAACCCACCCCTTC		
	COBRA	RegC- FE	TAGGGTTAACGTTAGAAAGGTCGTAAGG	544	52(40)
		RegC-RE	ATAACATTAATAACCGCTAAATAACTT		
		Cobra intF	GTATTTTTTTTGTGTTTGCCTTAG	261	52(40)
		Cobra intR	CTATTAATTAACAACCTTAAATACCAATC		
	HRM	RegC- FE	TAGGGTTAACGTTAGAAAGGTCGTAAGG	544	52(40)
		RegC-RE	ATAACATTAATAACCGCTAAATAACTT		
		HRM for int	TGTTTTTATTGGTTGGATATTT	174	
		HRM rev int	CCAATCAAATTTCTCAACTCTATA		
	MS	NOMet F	TAAAAATGAATTAATAGGAAGAGTGATAGTG	102	
		NOMet R	AATCTCTTCATCCCTCCCTAAAACA		
		Met F	GCGGTCCCAAAAGGGTCAGTCGGATAGCGATTTTAAACGC	91	
		Met R	CCTAAAACGACTACTACCCG		
RFC3	BS	RFC3bis-Fext	AGTAGTGAATTTTAGAATTAGAGGG	285	52(40)
		RFC3bis-Rext	CGCCTACTCCTTATAATAATCCAAC		
		RFC3bis-Fint	CGCGGTAGTTGATTTTGTGTTGTATA	207	52(40)
		RFC3bis-Rint	ACTTATCCACCCAAAAACTCATAAC		
ExoI	BS	EXO1bis-Fext2	TTATTATCGGTTATTAGCGTTAGTG	395	52(40)
		EXO1bis-Rext	TCTCACCTTCCGAAAAAAAACCTCTC		
		EXO1bis-Fint	GCGGTTGTAGTCGTATGGTAGTGAG	251	52(40)
		EXO1bis-Rint	GCCCCTAACTCACTATAACCAAAAC		
SEPT9	BS	SEPT9-Fext	ATTTAGTTGAGTTAGGGGGTTAGG	481	52(40)
		SEPT9-Rext	AACAAACACAAACAATAAAAAA		
		SEPT9-Fint	GGCGGTTAGTTTTGTATTGTAGGAG	318	52(40)
		SEPT9- R1int	GAAAAACGCCTAAATTAAAAATCC		

Tabla 1: Condiciones de amplificación para estudios de metilación. TM: Temperatura de hibridación.

Gen (region)	Primer	Secuencia	Long. (pb)	TM (Nº ciclos)
MLH1 (promotor)	MLH1-promF1	GCTTTAAAGTCCCTGGCTCGG	promF1-promR2: 655pb	60(40)
	MLH1-promR4	CTGTCGCCGCCTCATCGTAG	promF2-promR1: 540pb	60(40)
	MLH1-promF4	ACCGCTCGTAGTATTCGTGC	exon1F-exon1R: 312pb	60(40)
	MLH1-promR2	CCAGCCAATAGGAGCAGAGATG	promF3- promR1: 337pb	60(40)
	MLH1-promF2	GGCGTCATCCACATTCTGCGG	promF2- promR3: 302pb	60(40)
	MLH1-promR3	GTTGCTGGGTCTCTTCGTCC	promF4- promR2:357pb	60(40)
	MLH1-promF3	CAATAGGAAGAGCGGACAGC	promF1-promR4: 398pb	60(40)
	MLH1-promR1	ATGCGGTTCACCACTGTCTCG		
	MLH1-exon1F	GTGGGGCTGGATGGCGTAAG		
	MLH1-exon1R	CGTGTCCGCGCCATTGAGTG		
BRAF (exon 15)	BRAF-15F	ATAATGCTTGCTCTGATAGG	241	52(40)
	BRAF-15R	AACTCAGCAGCATCTCAGG		
KRAS (exon 2)	KRAS-2F	CTGGTGGAGTATTTGATAGTG	330	53(40)
	KRAS-2Rint	CTATTGTTGGATCATATTCGTC		
KRAS (exon 3)	KRAS-3Fint	TGTCTTTTCAAGTCCTTTGCC	381	60(40)
	KRAS-3Rint	GCATGGCATTAGCAAAGACTC		
KRAS (exon 4)	KRAS-4Fint	CCCAGAGAACAAATTTAAAGAG	264	56(40)
	KRAS-4Rint	CCTAGTATAGCATAATTGAGAG		
NRAS (exon 2)	NRAS-2F	GAACCAAATGGAAGGTCACAC	283	58(40)
	NRAS-2R	CAAGTGAGAGACAGGATCAG		
NRAS (exon 3)	NRAS-3F	TGGGCTTGAATAGTTAGATGC	259	57(40)
	NRAS-3R	TTGATGGCAAATACACAGAGG		
PIK3CA(exon 9)	PIK3CA-9F	TTAGATATTTTTATGGCAGTC	276	54(40)
	PIK3CA-9R	CCATAGAGAAAAGTATCTACC		
PIK3CA(exon 20)	PIK3CA-20F	AGACGATGGACAAGTAATGG	320	56(40)
	PIK3CA-20R	TAATAGAGCAGCCAGAATC		

Tabla 2: Condiciones de amplificación para estudios de variantes mediante secuenciación Sanger. TM: Temperatura de hibridación.

4- RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Análisis de correlaciones entre las características demográficas, clínicas e histopatológicas

En este trabajo partimos de una cohorte preseleccionada de tumores, 54 tumores MSI-H y 54 tumores MSI-L/S, provenientes de pacientes diagnosticados con CCR. La proporción de hombres fue mayor que la de mujeres (56,5% vs 43,5%) y la edad osciló entre 32 y 92 años (media $61,7 \pm 13,7$). Los datos demográficos, clínicos e histopatológicos se encuentran detallados en la tabla 3.

El 37% de los tumores se localizaron en el colon proximal, el 35.2% en el colon distal y el 25.8% en el recto. El análisis estadístico reveló que la localización del tumor no mostró una asociación estadística significativa con el género ($p=0.287$) observándose una tendencia de la localización proximal, distal y rectal hacia el género masculino (52.9%, 56.25% y 85.7%, respectivamente).

El 65,8% de los tumores eran moderadamente diferenciados, mientras que el 27,7 % eran pobremente diferenciados y solamente el 6.5% era bien diferenciado. El análisis estadístico no reveló una asociación estadística significativa entre el tipo de diferenciación y el género ($p=0.369$). Se observó una tendencia de los tumores bien y moderadamente diferenciados hacia el género masculino (75% y 64.5%, respectivamente), mientras que los tumores pobremente diferenciados mostraron una tendencia hacia el género femenino (63.6%).

El 49.1% de los pacientes presentó tumores en estadio III, el 34.3% estadio II y en menor proporción (8.3%) en estadios I y IV. Los criterios de clasificación tumoral se encuentran detallados en el anexo I. La estadística mostró una asociación significativa entre los estadios I y II con el género masculino, y el estadio IV con el género femenino ($p<0.001$). La distribución del estadio III fue muy similar entre ambos géneros.

En los casos donde no se pudo encontrar una asociación estadística significativa, quizás debido al pequeño número de datos al momento de dividirlos en diferentes

subcategorías, las tendencias halladas van en el mismo sentido a lo reportado como más frecuente¹⁰⁰.

Género	N (%)
Femenino	47 (43.5%)
Masculino	61 (56.5%)
total	108
Edad	
≤50	27 (25%)
>50	81 (75%)
total	108
Localización del tumor	
Proximal Colon derecho	40 (37)
Distal Colon izquierdo	38 (35.2)
Recto	30 (27.8)
total	108
Diferenciación	N (%)
Bien diferenciado	7 (6.5)
Moderadamente diferenciado	71 (65.8)
Pobrementemente diferenciado	30 (27.7)
total	108
Estadío	N (%)
I	9 (8.3)
II	37 (34.3)
III	53 (49.1)
IV	9 (8.3)
total	108

Tabla 3: Datos demográficos y clinicopatológicos extraído de las historias clínicas de los pacientes

4.2 Secuenciación y caracterización de variantes presentes en la región promotora del gen MLH1 en muestras tumorales

Este estudio se realizó a partir de las muestras que presentaban MSI-H. Debido a la dificultad para amplificar fragmentos mayores a 400pb en muestras provenientes de parafina, el promotor del gen MLH1 se dividió en 4 fragmentos solapantes. Se llevaron a cabo 4 reacciones de PCR por muestra y se realizó la búsqueda de variantes por secuenciación Sanger. Luego de identificadas, para conocer su efecto sobre la transcripción del gen, se analizaron los factores de transcripción (FT) que interactúan con el promotor de MLH1.

El análisis abarcó la posición +1 hasta la -900pb de promotor de MLH1 y se realizó mediante el “algoritmo genético de alggen” (<http://alggen.lsi.upc.es/>). Esta herramienta permite la identificación de sitios de unión de FT putativos (TFBS) en secuencias de ADN. Los TFBS definidos en la base de datos TRANSFAC (proporciona datos sobre FT eucarióticos, sus sitios de unión, secuencias de unión consenso y genes regulados) se utilizan para construir matrices de sitios de unión específicas para la predicción de TFBS.

Este análisis mostró que son 38 los FT que tienen sitios de unión con mayor o menor afinidad por el promotor y se muestran en la tabla 4:

TFIID	FOXP3	GR-beta	NFI/CTF	GR-alpha	c-Ets-2	HNF-1C	HNF-1B
TFII-I	GATA-1	E2F-1	RXR-alpha	PPAR-:RXR-alpha	RAR-beta	C/EBPbeta	ENKTF-1
AR	XBP-1	AP-2alphaA	C/EBPalphA	CTF	NF-Y	NF-1	STAT4
c-Ets-1]	Elk-1]	NF-AT2	STAT1beta	E2F	IRF-1	NF-AT1	T3R-beta1
YY1	PEA3	Pax-5	p53	c-Jun	c-Myb	MAZ	

Tabla 4: Factores de transcripción que interaccionan con el promotor de MLH1.

La posición de las variantes encontradas, y los sitios de interacción de los FT, se muestran en la tabla 5:

Variante	Cigocidad	Nº muestras	FT
-31T>C	homocigota	2	---
-41G>C	heterocigota	1	---
-87G>A	heterocigota	2	---
-93G>A	10 heterocigota / 2 homocigota	12	AP-4
-113G>A	heterocigota	1	P53

-136A>G	heterocigota	1	---
-210T>G	heterocigota	2	---
-242C>T	heterocigota	1	---
-258C>T	heterocigota	1	---
-283A>G	heterocigota	1	NF-Y
-309C>G	heterocigota	2	---
-333T>C	heterocigota	1	---
-343T>C	heterocigota	2	---
-367C>T	heterocigota	1	---
-383C>T	heterocigota	2	---
-392C>A	heterocigota	1	---
-393A>G	heterocigota	1	---
-408T>C	heterocigota	1	---
-409C>T	heterocigota	1	---
-433A>G	homocigota	2	---
-441C>T	heterocigota	1	---
-828A>G	heterocigota	1	---

Tabla 5: Lista variantes encontradas en el promotor del gen MLH1 (posición respecto al sitio +1), cigosidad (homocigota o heterocigota), número de muestras que presentan la variante y factor de transcripción (FT) involucrado, en caso de existir.

Analizando la prevalencia de las variantes encontradas, el polimorfismo -93G>A (rs1800734) fue el que presentó la mayor frecuencia (13%). Hay reportes que sugieren que la metilación del gen MLH1 está asociada con la presencia de este polimorfismo¹⁰¹. Ensayos utilizando el gen reportero de la luciferasa, realizados en paralelo con ensayos de movilidad electroforética (EMSA), demostraron que la actividad luciferasa de la construcción con la variante -93A fue significativamente menor que la de la variante -93G¹⁰². Adicionalmente, en los experimentos de EMSA, las sondas -93A y -93G mostraron diferente afinidad de unión a proteínas nucleares de células derivadas de CCR, cáncer de endometrio y de tejido no tumoral¹⁰³. Esto indicó que la presencia de una G en la posición -93 afecta la expresión alterando la unión de proteínas al promotor del gen MLH1.

Se ha sugerido que represores de la transcripción sitio-específicos pueden reclutar metiltransferasas, lo que lleva a la metilación del gen *de novo* y al silenciamiento epigenético¹⁰⁴. MLH1 -93G se localiza en un motivo de consenso E-box (CANNTG), en el que muchas proteínas se unen diferencialmente dependiendo que se encuentre una Guanina o una Adenina. El FT AP-4 (activating enhancer-binding protein 4), se une solamente al alelo -93G.y necesita la unión simultánea de c-myc, para la activación del gen MLH1¹⁰⁵. Por el contrario, la presencia del alelo -93A, facilita la unión de una proteína represora,

inhibiendo directamente la expresión génica y/o provocando el reclutamiento de factores modificadores epigenéticos como la DNMT, causando la metilación del promotor y el silenciamiento génico.

En nuestros resultados observamos que las 12 muestras que presentaron la variante -93G>A pertenecen al grupo de tumores con MSI-H y de ellas, solamente 2 presentaron un patrón metilado.

Por otra parte, se realizó el análisis del promotor a partir de muestras de sangre de esos 12 pacientes y observamos que solamente 1 muestra era portadora del cambio -93G>A demostrando que mayoritariamente este cambio -93G>A se genera somáticamente en las células tumorales. Con nuestros datos no pudimos verificar una asociación entre la metilación del promotor del gen MLH1 y la presencia de la variante -93G>A. Sí podríamos asociarlo a un mal funcionamiento del sistema MMR debido a una falla en la expresión de MLH1 (ya sea por cambios en la afinidad de unión de FT o por metilación del promotor).

Otras variantes encontradas en la secuencia del promotor de MLH1 fueron la sustitución -283A>G en la región que involucra el motivo de reconocimiento de NF-Y y el cambio en la posición -113 (G>A), región que interacciona con p53. La caracterización del promotor de MLH1, reveló que el promotor es una región compacta, constituida por dos secuencias de control ubicadas entre los sitios -300 y -220pb respecto al sitio de inicio de la transcripción. El elemento distal ubicado en la posición -282 es una caja CCAAT canónica que representa aproximadamente el 60% de la fuerza total del promotor y se ha demostrado que esa secuencia es reconocida por el factor nuclear NF-Y¹⁰⁶. NF-Y es un FT ubicuo, que se une a esta secuencia CAAT en orientación directa o invertida en una variedad de promotores eucariotas^{107, 108}. Se ha visto que la cantidad de subunidad A de NF-Y aumenta durante la diferenciación celular y que esta expresión diferencial da como resultado una alteración de la actividad del promotor dependiente de NF-Y¹⁰⁹. Por lo tanto, la presencia de la variante -283A>G podría estar alternado la actividad del promotor de MLH1 por un cambio en la afinidad por el factor NF-Y.

Por otra parte, se sabe que el factor p53 activado induce la expresión de MLH1 y PMS2 como parte de la respuesta para iniciar la reparación, por lo que MLH1 y PMS2

actúan como sensores de daño en el ADN y son determinantes para la decisión entre la detención del ciclo celular o la apoptosis¹¹⁰.

Con estos antecedentes se puede plantear la hipótesis de que, en las células que presenten los cambios en las posiciones -283 y -113, podría haber un cambio de afinidad en la interacción FT-promotor por lo que en ambos casos no se induciría la expresión de MLH1. Por lo tanto, en las células de estos tumores, el mecanismo MMR sería deficiente debido a la ausencia de expresión de MLH1, por lo que no se repararían los daños inducidos en el ADN, presentando así el fenotipo MSI-H.

4.3. Estudios de asociación de la Inestabilidad de Microsatélites con características demográficas y clinicopatológicas

Los datos demográficos y clinicopatológicos de los pacientes se dividieron según el estado de microsatélites y se muestra en la tabla 6.

Al realizar el análisis estadístico, no se observó asociación entre el estado MSI y la edad cuando la población se separó tomando como corte 50 años ($p=0.131$). Sin embargo, se observó que la mayoría de los pacientes mayores de 70 años, presentan tumores MSI-H ($p=0,006$).

En cuanto a la localización del tumor, observamos que los tumores MSI-L/S se encontraban principalmente en la localización distal o recto ($p=0.547$), mientras que los tumores MSI-H mostraron preferentemente una localización proximal, también sin una asociación estadística significativa ($p=0.124$).

Relacionado a la diferenciación tumoral, mientras que los tumores MSI-H eran moderadamente o pobremente diferenciados, la gran mayoría de los tumores MSI-L/S mostraron ser moderadamente diferenciados ($p<0,001$).

En referencia al estadio del tumor, tanto en el grupo MSI-H como en el grupo MSI-L/S, la mayor parte de los tumores se encontraban en estadio II (31.5% y 37%, respectivamente) y estadio III (57.4% y 40.7%, respectivamente) ($p=0.348$).

	MSI-H N (%)	MSI-L/S N (%)
Género		
Femenino	24 (44,4%)	23 (42,6%)
Masculino	30 (55,6%)	31 (57,4%)
Total	54	54
Edad		
≤50	19 (35,2%)	8 (14,8%)
>50	35 (64,8%)	46 (85,2%)
Total	54	54
Localización del tumor		
Proximal Colon derecho	32 (59,2%)	8 (14,8%)
Distal Colon izquierdo	14 (25,9%)	24 (44,4%)
Recto	8 (14,8%)	22 (40,7%)
Total	54	54
Diferenciación		
Bien diferenciado	0 (0)	7 (12,8)
Moderadamente diferenciado	26 (48,1)	45 (83,3)
Pobremente diferenciado	28 (51,9)	2 (3,7)
Total	54	54
Estadío		
I	3 (5,5)	6 (11,1)
II	17 (31,5)	20 (37)
III	31 (57,4)	22 (40,7)
IV	3 (5,6)	6 (11,1)
Total	54	54

Tabla 6: Datos demográficos y clinicopatológicos de los pacientes divididos según el estado de microsatélites.

Nuestros resultados acompañan la mayoría de las características clínicas específicas de tumores MSI-H: 32 (59,2%) se localizaron en colon derecho, 28 (51,9%) son

pobrementemente diferenciados y solamente 3 (5,6%) presentaron estadio IV. Los tumores con MSI-H son más frecuentes en el colon derecho^{111,112,113,114} y poco frecuentes en el recto^{115,116}. Por otra parte, Gryfe et al también encontró que presentaban, con mayor frecuencia, una localización proximal y además una peor diferenciación tumoral. En cuanto al potencial maligno, los tumores con MSI invaden con mayor profundidad la pared del colon, pero, en cambio, se diagnostican en un estadio menos avanzado y es menos frecuente que presenten metástasis ganglionares o a distancia¹¹⁷.

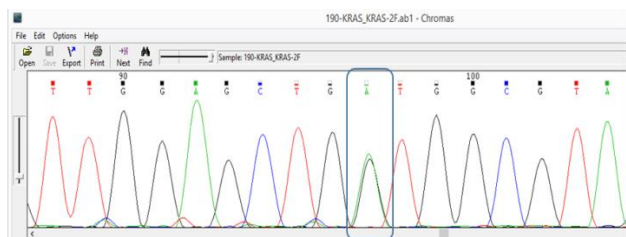
4.4 Búsqueda de variantes en los genes KRAS (exones 2, 3 y 4), NRAS (exones 2 y 3) y PIK3CA (exones 9 y 20) y determinación de la mutación BRAFV600E. Asociaciones con otros marcadores y con características demográficas y clinicopatológicas.

4.4.1 Gen KRAS

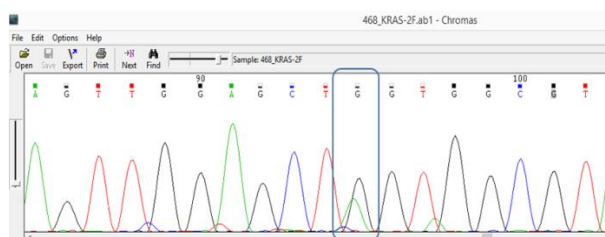
Las variantes encontradas en las 108 muestras analizadas, se muestran en la tabla 7 y en la figura 4. La prevalencia total fue del 28,7%, con la mayor tasa de variación en el codón 12 (18,5%), seguido del codón 13 (9,3%).

KRAS	Total (108) N(%)
wt	77 (71.3)
G12D	10 (9.25)
G12S	6 (5.5)
G12C	3 (2.8)
G12A	1 (0.9)
G13D	10 (9.25)
A146T	1 (0.9)

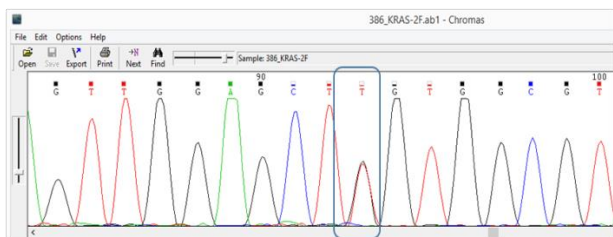
Tabla 7: Variantes halladas en el gen KRAS. wt: alelo normal



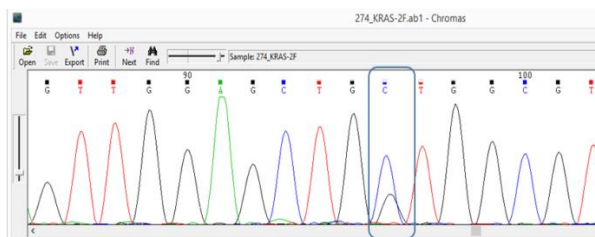
codon 12 c.35G>A, Gly12Asp (G12D)



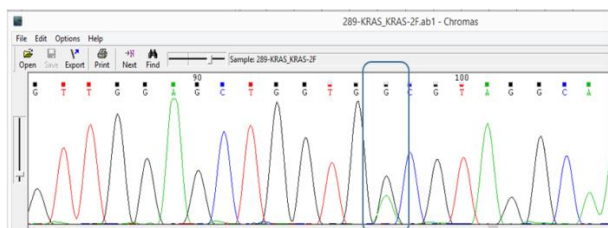
codon 12 c.34G>A, Gly12Ser (G12S)



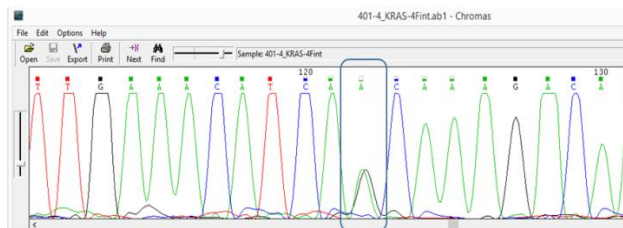
codon 12 c.34G>T, Gly12Cys (G12C)



codon 12 c.35G>C p.Gly12Ala (G12A)



codon 13 c.38G>A, Gly13Asp (G13D)



codón 146, c.436G>A p.Ala146Thr (A146T)

Fig 4: Electroferogramas correspondiente a los exones 2, 3 y 4 del gen KRAS donde se indican en recuadro las diferentes variantes encontradas.

Las proporciones no cambiaron cuando la muestra se dividió según el estado de los microsatélites (ver tabla 8).

KRAS	Total (108) N(%)	MSI-H (54) N (%)	MSI-L/S (54) N (%)
wt	77 (71.3)	40 (74.1)	37 (68.5)
G12D	10 (9.25)	5 (9.25)	5 (9.25)
G12S	6 (5.5)	3 (5.5)	3 (5.5)
G12C	3 (2.8)	1 (1.9)	2 (3.7)
G12A	1 (0.9)	0 (0)	1 (1.9)
G13D	10 (9.25)	4 (7.4)	6 (11.1)
A146T	1 (0.9)	1 (1.9)	0 (0)

Tabla 8: Variantes halladas en el gen KRAS clasificadas según el estado de microsatélites.

wt: alelo normal

Las variantes de KRAS se distribuyeron de manera similar en ambos grupos de tumores: 45.2% (14/31) en MSI-H y 54.8% (17/31) en MSI-L/S ($p=0.523$). Con respecto al género, se presentaron en hombres con una frecuencia del 54.8% (17/31) y en mujeres con el 45.2% (14/31), sin mostrar una asociación estadística significativa ($p=0.682$). Con respecto a la edad, 20/31 (64.5%) de las variantes se presentó en mayores de 50 años ($p=0.110$). Respecto a la ubicación, 10/31 (32.2%) se encontraron en tumores con ubicación proximal y 21/31 (67.8%) en tumores ubicados en colon distal ($p=0.079$). Por otra parte, no se encontraron variantes de KRAS en tumores pobremente diferenciados, mientras que en un 12.9% (4/31) y un 87.1% (27/31), se encontraron en tumores bien o moderadamente diferenciados, respectivamente. Un resumen de la distribución de las variantes en el gen KRAS se puede observar en la figura 5.

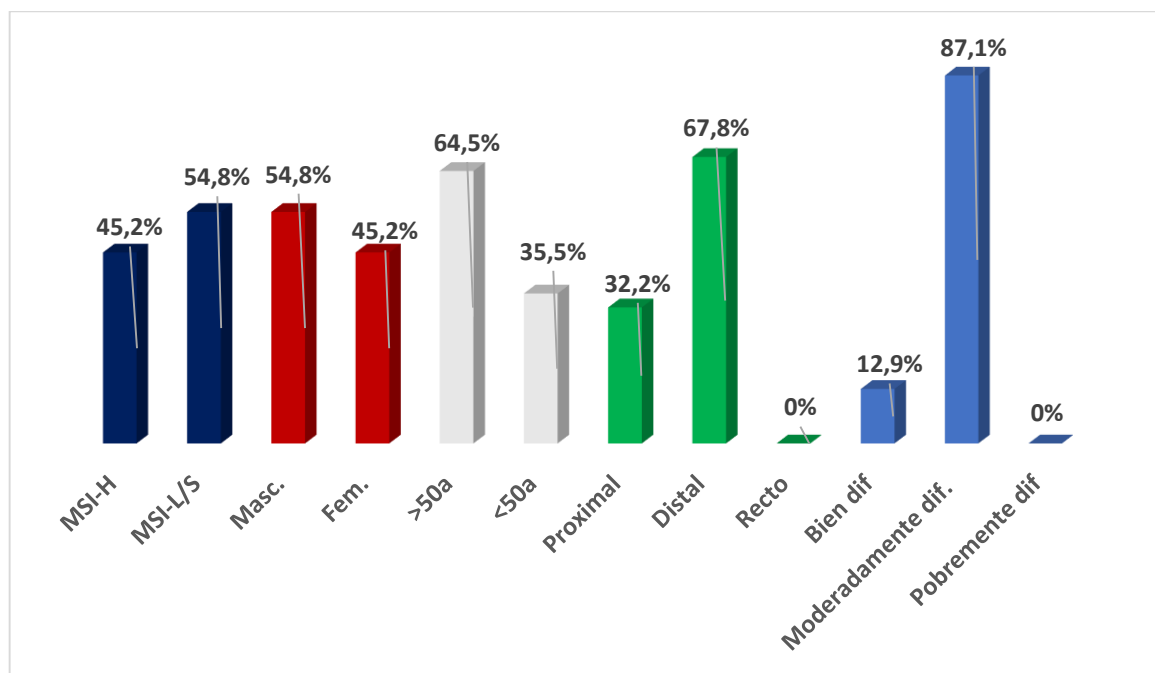


Figura 5: Distribución de las variantes en el gen KRAS según los microsatélites, género, edad, ubicación y diferenciación tumoral.

La frecuencia de las variantes en KRAS varía mucho entre las distintas poblaciones, desde 44.7% en los países de Europa Occidental, 35.8% en los países de Europa del Este, 19.5% de los pacientes de Oriente Medio¹¹⁸, a un 3%-40% en países de Sudamérica¹¹⁹. En el contexto metastásico, las mutaciones en este gen ocurren en aproximadamente el 40% de los casos, especialmente en el exón 2, codones 12 (70-80%) y 13 (15-20%), exón 3,

codones 59-61, y en el exón 4, codones 117 y 146. En el exón 2, las más comunes son G12D, G12V y G12C; en el exón 3 Q61H y Q61R, mientras que en el exón 4 son A146T y A146V¹²⁰. Luego de analizadas las muestras de ADN, nuestros resultados acompañan estos reportes.

Algunas de estas variantes se correlacionan con ciertas características clínicas, patológicas y moleculares típicas. Se ha reportado que las variantes del exón 2 y del codón 12 están asociadas al subtipo adenocarcinoma bien/moderadamente diferenciado¹²¹ y no se ha encontrado una correlación con el sexo¹²². Los cánceres ubicados del lado derecho del colon se han asociado más comúnmente con el sexo femenino, edad avanzada, hipermutación de KRAS y PI3KCA, frecuentemente presentan MSI y BRAF de tipo salvaje^{123, 124}. En nuestro trabajo, observamos una ligera tendencia de la presencia de las variantes hacia el grupo de MSI-L/S, sexo masculino, pacientes mayores de 50 años, ubicación distal y tumores moderadamente diferenciados, sin una correlación estadística significativa. Esta ausencia de correlación, quizás se deba al escaso número de muestras obtenidas al subdividir la muestra en diferentes subgrupos.

4.4.2 Gen NRAS

No se observaron variantes en los exones 2 y 3 del gen NRAS en las 108 muestras analizadas (figura 6). Las variantes más frecuentes en NRAS se localizan principalmente en los codones 12-13 (exon 2) y 59-61 (exon 3)¹²⁵, con una prevalencia en CCR baja (1-2%)¹²⁶, por lo que en nuestra cohorte, se podría haber esperado encontrar 1-2 muestras con cambios en esta región.

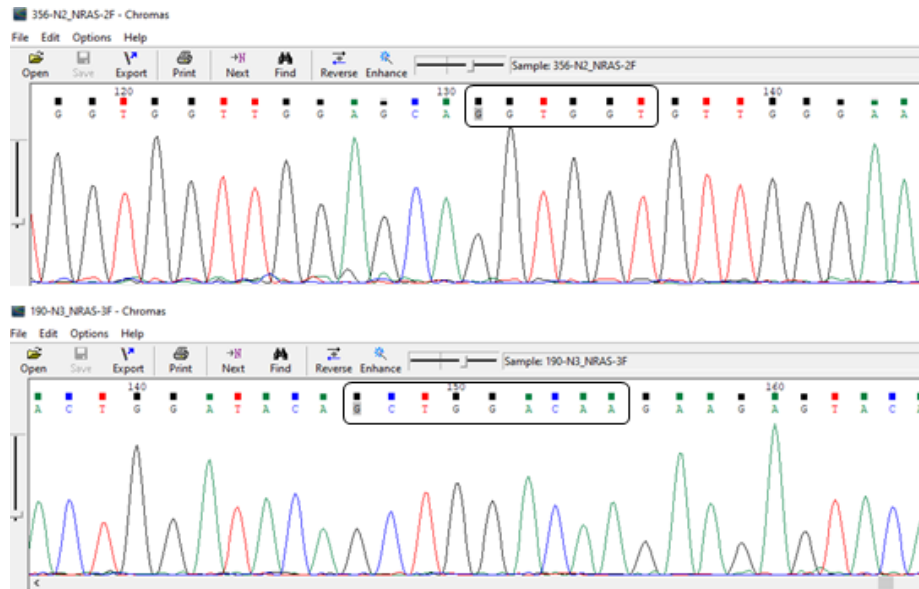


Fig 6: Electroferogramas correspondiente a los exones 2 y 3 del gen NRAS donde se muestran en recuadro los codones 12 y 13 (exón 2) y 59-61 (exón 3) sin variantes.

4.4.3 Gen BRAF

Se analizó la variante V600E del gen BRAF (exón 15) en las 108 muestras mediante PCR a tiempo real con sondas Taqman. Las muestras positivas se validaron por secuenciación Sanger (figura 7).

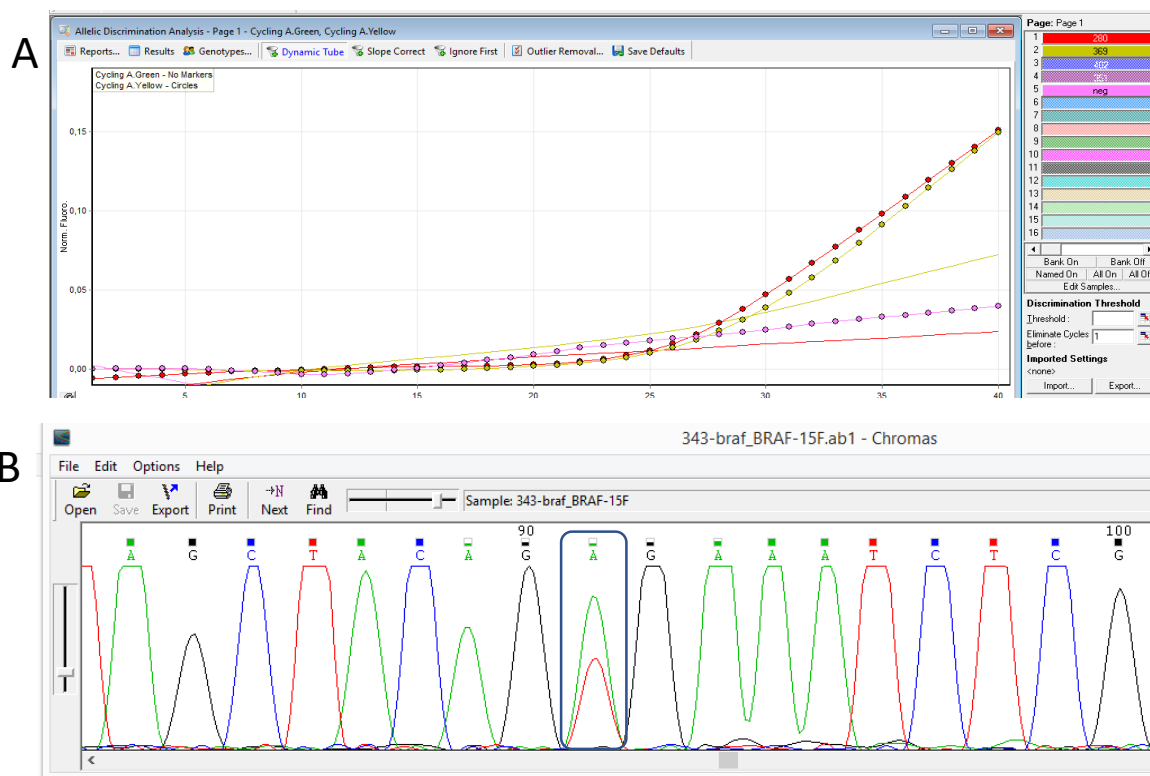


Figura 7: Análisis de la variante V600EBRAF. A) Salida de la PCR a tiempo real. Se observa la muestra sin el cambio (color rojo), la muestra heterocigota (color amarillo). B) Electroferograma que permite observar la variante indicada en el recuadro.

De las 108 muestras, 7 presentaron la variante BRAFV600E (6,5%). Cuando las muestras se clasificaron según el estado de microsatélites, encontramos que los 7 tumores BRAF+ pertenecían al grupo MSI-H ($p=0,007$). Encontramos que 4/7 se presentaron en mujeres y 3/7 en hombres ($p=0,970$); todos los pacientes eran mayores de 60 años ($p=0,023$), siendo 4/7 tumores moderadamente diferenciados y 3/7 pobremente diferenciados

($p=0.970$); y todos localizados en el colon proximal ($p=0.002$). Por otra parte, observamos que ninguno de los tumores BRAFV600E presentó variantes en el gen KRAS.

BRAFV600E se ha reportado con una frecuencia muy variada en las diferentes poblaciones. En europeos y americanos representa aproximadamente el 15% de todos los CCR^{127,128}. Por el contrario, en los países asiáticos y otros países de Europa del Este, las frecuencias de la mutación BRAF en CCR son inferiores y oscilan entre el 3-6%^{129, 130, 131, 132, 133, 134}. Las frecuencias reportadas en los distintos países de Latinoamérica se detallan en la tabla 9¹³⁵

País	Frecuencia (%)
México	4.5
Perú	10
Brasil	7.3
Chile	10.7
Argentina	10.3
Puerto Rico	9.2
Paraguay	5.5

Tabla 9: Prevalencia promedio de la variante V600E del gen BRAF en diferentes países de Latinoamérica.

En relación a las asociaciones con las características demográficas y clinicopatológicas, esta variante se ha reportado asociada con el sexo femenino, mayores de 70 años, en tumores localizados en el colon derecho y con MSI-H^{136, 137}. Por otra parte, se ha reportado que las variantes en los genes BRAF y KRAS son mutuamente excluyentes¹³⁸.

En nuestro trabajo, todas las muestras con la variante BRAFV600E pertenecen a tumores MSI-H, no presentaron variantes en el gen KRAS, los tumores eran de localización proximal, en su mayoría eran moderadamente diferenciados, y se encontró en pacientes de sexo femenino de edad avanzada, características que coinciden con datos reportados previamente.

4.4.4 Gen PIK3CA

La búsqueda de variantes en este gen se centró en los exones 9 y 20 ya que más del 80% de las variantes se ubican en 2 hotspots, uno que codifica para el dominio helicasa (codones 542 y 545, exón 9) y otro que codifica para el dominio quinasa (codon 1047, exón 20)¹³⁹. En nuestro trabajo, no se encontraron variantes en las 108 muestras analizadas. Este resultado fue llamativo ya que la prevalencia de variantes en estos exones entre las diferentes poblaciones se encuentra en el rango de 3-30% (tabla 10), con una prevalencia promedio de países de Latinoamérica del 15.16% y mundialmente del 13,22%.

Arab Gulf	8%
Argentina	6%
Australia	13%
Belgium	10%
Brazil	10%
Chile	20%
China	3-13%
France	10%
Germany	15%
Greece	10%
India	7%
Iran	25%
Italy	3-30%
Japan	10-20%
Paraguay	19%
Portugal	13%
Spain	11%
Taiwan	6%
The Netherlands	10%
UK	7%
USA	3-18%

Tabla 10: Prevalencia de variantes en los exones 9 y 20 del gen PIK3CA en diferentes poblaciones.

Un metanálisis realizado por Jin y col, sugirió que las mutaciones PIK3CA no mostraron asociaciones con parámetros clínico-patológicos, incluidos el estadio y la diferenciación tumoral¹⁴⁰. Este hecho es importante ya que demuestra que, por ejemplo, el bajo número de tumores bien diferenciados (6.5%) o en estadios I y IV (8.3%), con el que contamos en este trabajo, no es un sesgo que podría estar influyendo en el resultado nulo de prevalencia obtenido.

Por otra parte, al realizar una revisión bibliográfica, vimos que la prevalencia es muy diferente entre las diferentes regiones, donde además de factores étnicos, la técnica utilizada puede tener un impacto directo en la frecuencia observada, dando falsos positivos o falsos negativos.

A continuación, a modo de resumen, se presentan la distribución de las variantes encontradas en las 108 muestras (figura 8).

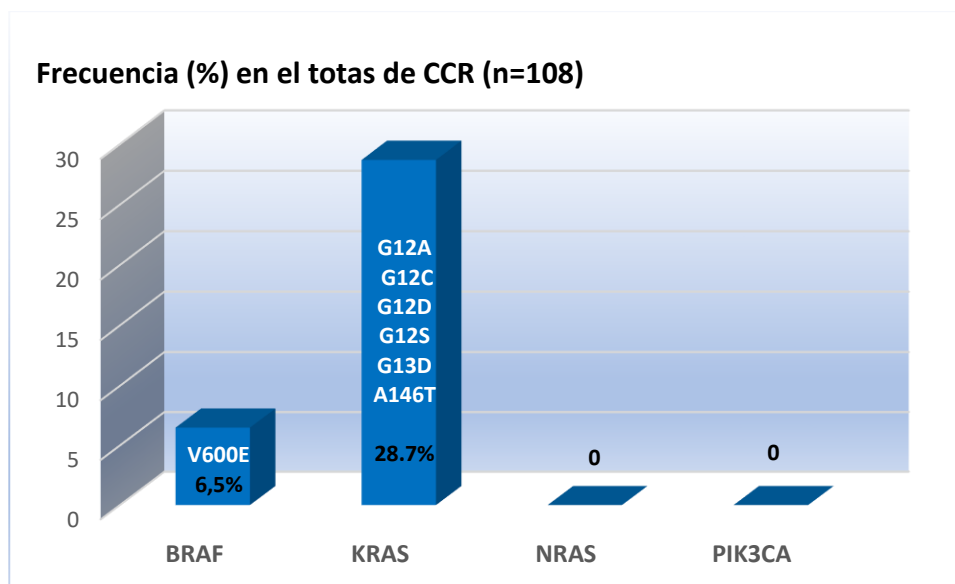


Figura 8: Variantes y frecuencias en los genes BRAF, KRAS, NRAS y PIK3CA en el total de la cohorte.

4.5 Evaluación y comparación de sensibilidad, especificidad y otras características, entre diferentes técnicas utilizadas para realizar estudios de metilación del ADN.

Para llevar a cabo el estudio de metilación, en este trabajo evaluamos las siguientes técnicas: secuenciación por bisulfito (SB), PCR en tiempo real (PCR-HRM), análisis de restricción combinado con bisulfito (COBRA), PCR específica de metilación (MS-PCR), amplificación de sondas tras ligación múltiple específica de metilación (MS-MLPA).

Los resultados de este objetivo se presentan en el siguiente artículo (Anexo 2):

Vital M, Vergara C, Carusso F, Neffa F, Valle AD, Esperón P. Analysis of MLH1 promoter methylation by different methods in colorectal tumors. Journal of Gastroenterology Research and Practice. 2022; 2(15): 1123. www.doi.org/10.52768/jjgastro/1123

A continuación, se agrega información que no se encuentra detallada en el artículo mencionado.

4.5.1 MS-MLPA (Methyl Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Este ensayo, al igual que las demás técnicas, permitió diferenciar claramente la población de muestras que presentaban o no metilación en el promotor de MLH1. El perfil del MS-MLPA para una muestra no metilada y para una muestra metilada se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente.

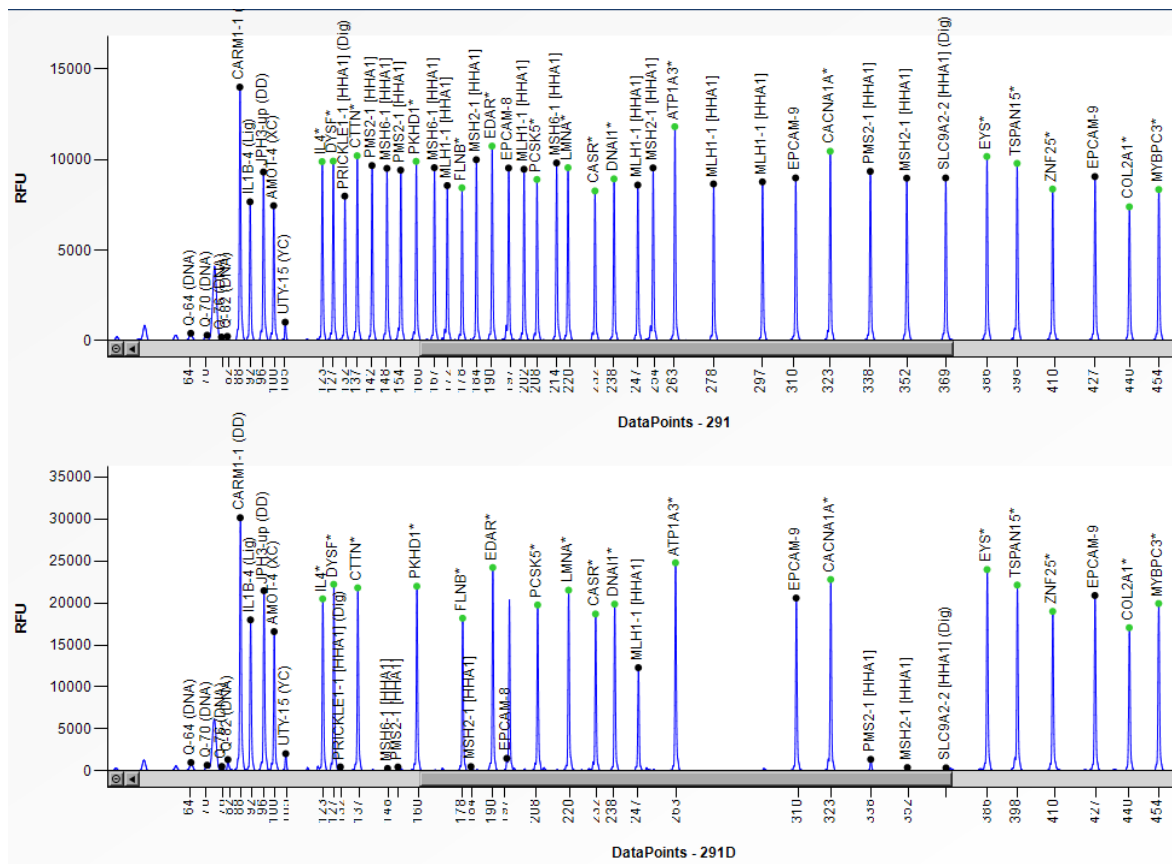


Figura 9: MS-MLPA para una muestra no metilada. Parte superior, perfil sin digerir donde se observa la amplificación de todos los fragmentos. Parte inferior, perfil luego de la digestión donde se observa la NO amplificación de los fragmentos conteniendo el sitio de reconocimiento de *HhaI* (indicada entre paréntesis en el nombre de cada sonda) y la amplificación del resto de los fragmentos control.

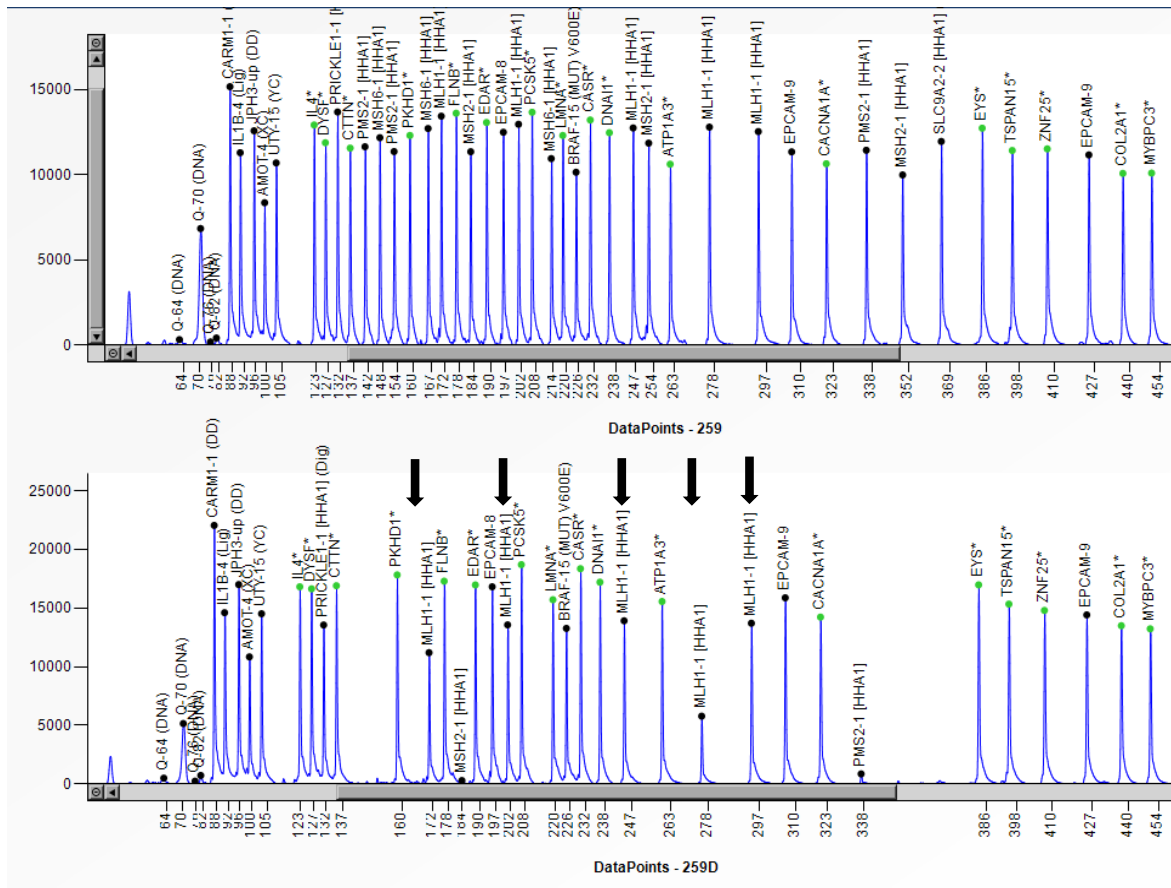


Figura 10: MS-MLPA para una muestra metilada. Parte superior, perfil sin digerir donde se observa la amplificación de todos los fragmentos. Parte inferior, perfil luego de la digestión con la enzima donde se observa la amplificación de los fragmentos del gen MLH1 (indicadas con la flecha), además de la amplificación del resto de los fragmentos control.

4.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación (MS-PCR)

En principio, esta técnica ampliamente usada, es la más sencilla de todas ya que, luego de la modificación con bisulfito, solamente se realizan las reacciones de PCR y se visualiza el resultado mediante una electroforesis. Entre las desventajas, está el efecto del bisulfito en el ADN, pudiendo afectar el rendimiento del ensayo y la inducción de sesgos en

la amplificación. Existe posibilidad de obtener resultados falsos positivos por una conversión incompleta del bisulfito, lo que lleva a que la secuencia no metilada pueda ser amplificada por el cebador específico para regiones metiladas.

A pesar de ser una técnica sencilla, no se logró su optimización. Se realizaron varias modificaciones a la reacción de PCR, pero no se pudo discriminar entre muestras metiladas o no metiladas. Las variables que se modificaron para lograr la amplificación específica fueron: 4 ADN polimerasas diferentes (Taq ADN polimerasa (Promega), Hot-Start Taq ADN polimerasa (Promega), Biomix (Bioline) y Platinum Taq (Invitrogen)), concentraciones de $MgCl_2$ entre 0.6-3mM, y de dNTP entre 0,4-2 mM, además de un amplio rango de temperaturas de hibridación. Todos los intentos mostraron resultados falsos positivos o falsos negativos. Las muestras controles fueron las mismas que se utilizaron para la optimización de las demás técnicas.

Como resultado final, de las 108 muestras analizadas, 10 muestras del grupo de tumores MSI-H presentaron metilación en el promotor del gen MLH1. Las 4 metodologías de análisis de metilación revelaron este patrón metilado en las mismas 10 muestras, mostrando la misma sensibilidad y especificidad. La técnica de SB permitió observar un patrón de metilación bialélico en 8/10 de las muestras. La heterocigosidad de las 2 muestras restantes probablemente se debió a la presencia de ADN de tejido no tumoral, ya que, al momento de realizar la extracción de ADN de la lámina de parafina, se pudo haber seleccionado una región conteniendo mezcla de células tumorales y tejido normal. Aunque la cantidad de ADN extraído de las muestras de parafina fue suficiente para realizar la SB, PCR-HRM y COBRA, el 8% de las muestras no pudo ser analizada por el ensayo MS-MLPA. La razón principal pudo ser la integridad del ADN, pues las sondas ligadas no pueden amplificarse si el ADN diana se encuentra degradado.

En resumen, luego de evaluar todos los parámetros en conjunto (sensibilidad, especificidad, tiempo de ejecución, complejidad, equipamiento y reactivos), el ensayo PCR-HRM parece ser el método de detección más conveniente para realizar un análisis de metilación, tanto de un número pequeño como de varias muestras de manera simultánea.

4.6 Determinación del estado de metilación del promotor de genes MMR y detección de deleciones / duplicaciones en las regiones promotoras de los genes MMR y en la región 3' de EPCAM.

A partir de datos bibliográficos y de un análisis bioinformático que permite realizar la identificación de islas CpG, observamos que los genes MMR que pueden presentar alteraciones epigenéticas son MLH1, MSH2, PMS2, PMS1, MLH3, MSH6, RFC3 y EXO1. Estos fueron los únicos genes del sistema MMR cuya región promotora presentó islas CpG y que por lo tanto fueron incorporados a los estudios de metilación.

4.6.1 Análisis del perfil de metilación de los principales genes MMR: MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2

El estudio del perfil de metilación de los genes MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 se llevó a cabo en dos etapas. En una primera instancia se estudió la metilación del promotor del gen MLH1. Los resultados son los detallados en el punto 4.5.

El análisis posterior de metilación de los genes MMR MSH2, MSH6 y PMS2 y de la presencia de deleciones / duplicaciones en las regiones promotoras de los estos genes y en la región 3' de EPCAM, se llevó a cabo mediante la técnica de MS-MLPA. No se observó ningún cambio ni en los perfiles de metilación ni el número de copia de estos genes.

El análisis del estado de metilación y del número de copia realizados en una muestra, se observan en las figuras 11 y 12, respectivamente.

muestra luego de la digestión. Panel A: Muestra de referencia (no metilada). En la parte superior se observan todos los fragmentos amplificados. En el panel inferior se observan los fragmentos de referencia y la ausencia de los fragmentos de los genes MMR no metilados. Panel B: Muestra metilada. En la parte superior se observan todos los fragmentos amplificados. En el panel inferior se observa la ausencia de los fragmentos no metilados y la presencia de aquellos que se encuentran metilados (indicados con flecha).

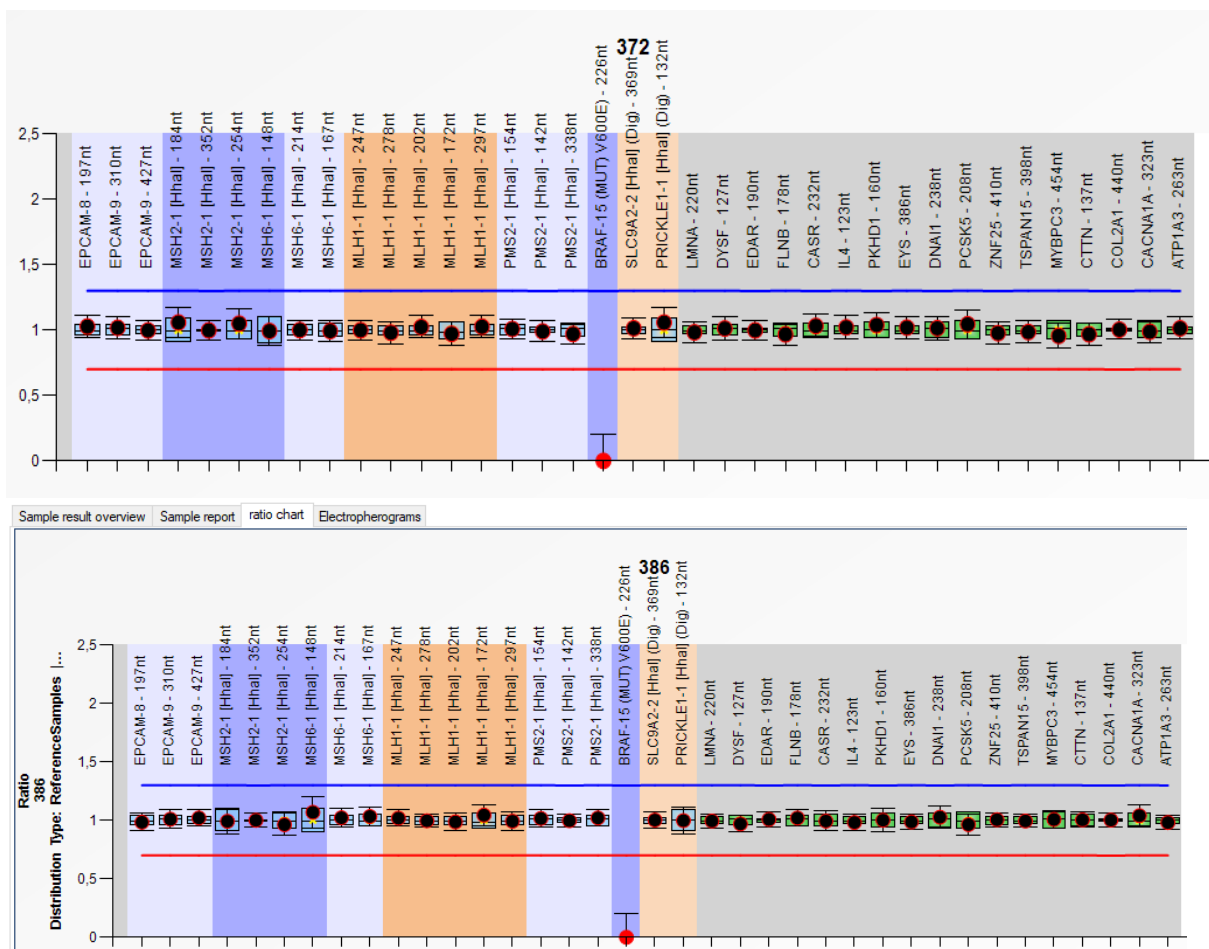


Figura 12: MS-MLPA para determinar el número de copias de los genes MMR. Panel superior: referencia, panel inferior: muestra problema. Se observa el mismo patrón entre ambas muestras indicando que hay no hay cambios de número de copias. Un valor de distribución $0.80 < DQ < 1.20$ indica número normal de copias.

El hecho de haber encontrado metilación aberrante solamente en el promotor de MLH1, va en el mismo sentido de lo reportado hasta el momento, ya que varios estudios

han demostrado metilación en este gen y solamente un reporte lo hizo en el gen MSH2¹⁴¹. Observamos una prevalencia de metilación de MLH1 del 9,25% (10/108). A su vez, todos los tumores metilados pertenecen al grupo de tumores con MSI-H, por lo que la prevalencia en este grupo fue del 18.5% ($p < 0,001$). Nuestra población mostró valores de metilación inferiores a la descrita en otras poblaciones. La frecuencia general promedio a nivel mundial se encuentra en el 20.3%, mientras que en el grupo de pacientes con MSI-H es del 62.6%¹⁴².

La edad media de los pacientes con tumores MLH1 metilados fue de 72.1 ± 8.3 años, mayor en comparación con la de los pacientes con tumores MLH1 no metilados (60.6 ± 13.6 años) ($p = 0,001$). Por otra parte, todos los tumores MLH1-metilados mostraron ubicación proximal, mientras que los MLH1-no metilados se encontraban en la región distal ($p < 0,001$). Estas características coinciden con las reportadas en un estudio multicéntrico realizado por Levine et al¹⁴³. Además, observamos una asociación entre el estado de metilación de MLH1 con tumores BRAF+ ($p < 0,001$), resultados que también van en el mismo sentido que lo reportado previamente^{144, 145}.

Por otro lado, analizamos las muestras de sangre de los pacientes con MLH1 tumoral metilado para investigar sobre la posibilidad de un patrón de metilación hereditario. Como ninguna muestra mostró un patrón de metilación aberrante en sangre, se descartó la presencia de epimutaciones constitucionales. En un trabajo realizado por Pinto y col, se encontró que la prevalencia de metilación constitucional en el promotor del gen MLH1 fue del 10.5%¹⁴⁶. Por lo tanto, se podía esperar esta ausencia de metilación en este bajo número de muestras.

Las alteraciones en el sistema de reparación MMR generan inestabilidad en los microsatélites constituyendo un marcador de inestabilidad genómica, que se observa en el 90% de casos de CCR hereditario no polipósico y en un 15% de casos esporádicos¹⁴⁷. Como se mencionó antes, en el CCR esporádico, la inestabilidad de microsatélites se debe principalmente a la deficiencia de MLH1 que resulta de la metilación a nivel tumoral de la región promotora del gen, mientras que en CCR hereditario no polipósico, la inestabilidad es debido a la presencia de mutaciones germinales en los genes MMR, principalmente

MLH1 y MSH2. Por lo tanto, al momento de realizar el screening para Síndrome de Lynch (CCR hereditario no polipósico más frecuente), antes de efectuar el análisis mutacional en línea germinal, es útil analizar el estado de metilación de MLH1 o determinar la presencia de la mutación BRAFV600E a nivel tumoral. De esta manera, un resultado positivo de metilación o la presencia de la mutación en BRAF, permiten descartar el estudio a nivel germinal de los genes MMR.

De nuestros resultados, la metilación de MLH1 resultó ser más sensible que la determinación de BRAFV600E. Los 7 tumores que encontramos BRAF positivos, pertenecían al grupo de los 10 tumores MLH1 metilados. De haber utilizado solamente la determinación de BRAF, 3 tumores no se hubiesen considerado como esporádicos. Por lo tanto, podemos concluir que sería más ventajoso realizar el análisis de metilación de MLH1 en lugar del análisis de BRAF, previo a la incorporación del paciente a un estudio de la línea germinal del panel de genes de SL.

4.6.2 Estudio de metilación de otros genes participantes del mecanismo MMR

Luego de analizar el estado de metilación de los genes MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, quedó un grupo de tumores MSI-H que mostró ausencia de metilación. Esto hizo plantearnos de estudiar otros genes candidato de estar metilados, que podrían estar silenciados epigenéticamente y producir el fenotipo MSI-H.

Se realizó la búsqueda de islas CpG en las regiones promotoras de los genes RFC-1, RFC-2, RFC-3, RFC-4 RFC-5 (Replication Factor Complex RFC1 to 5), EXO1 (Exonuclease 1), RPA (Replication Protein A), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), ADN polimerasa δ y ADN ligasa I mediante el programa <https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>. Observamos que, de estos 10 genes, solamente RFC3 y EXO1 eran los posibles candidatos para realizar el estudio de metilación.

RFC: luego de analizar todas las muestras de tumores, solamente 1 muestra con MSI-H mostró metilación en el promotor del gen RFC (ver figura 13).

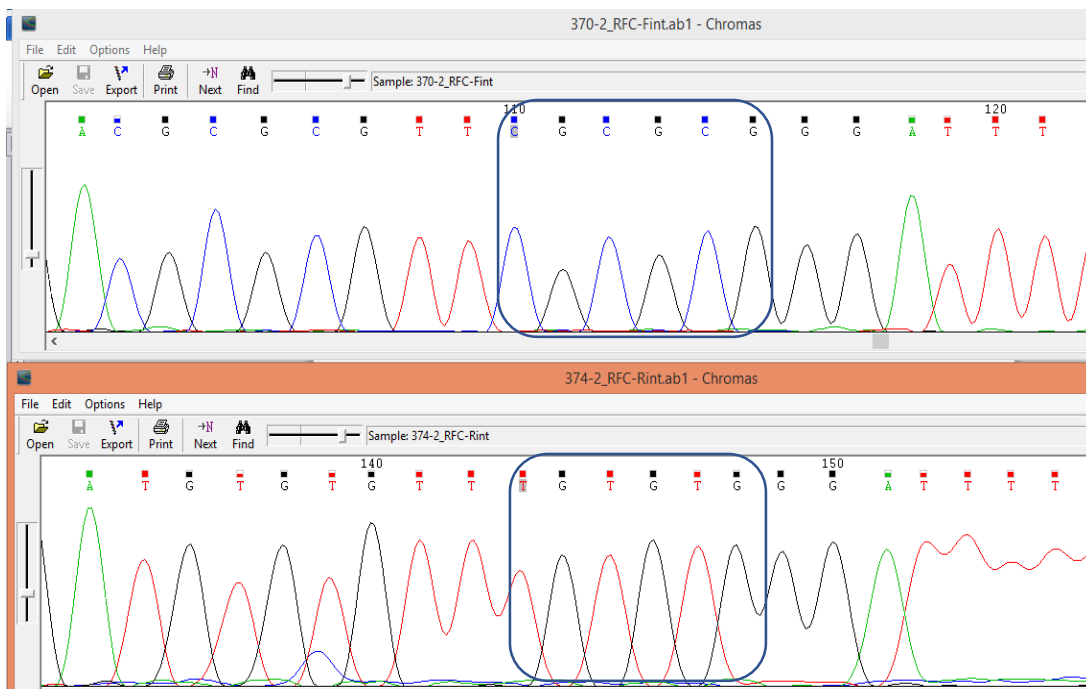


Figura 13: Electroferogramas correspondientes al promotor del gen RFC. En la parte superior de la figura se observa la región con un patrón de metilación positivo (recuadro), mientras que en la parte inferior se observa la misma región con un patrón de metilación negativo.

En cuanto al gen EXOI, no se encontró ningún tumor con la región promotora metilada (figura 14)

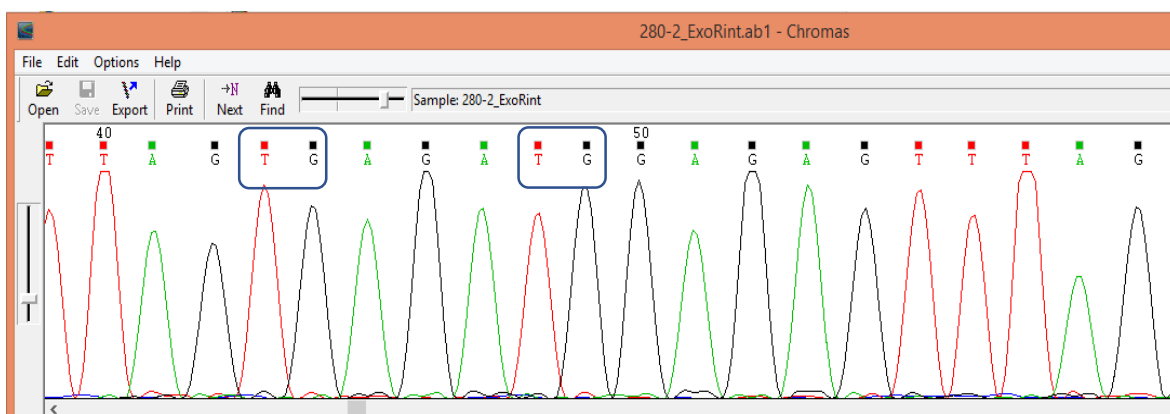


Figura 14: Electroferograma correspondientes al promotor del gen EXOI donde se indica la región con un patrón de metilación negativo (recuadro).

Nuestros resultados indican que, si bien RFC3 presenta una región promotora metilable, este no sería uno de los principales mecanismos involucrados en la aparición de inestabilidad de microsatélites, pero podría explicar este fenotipo en ese tumor en particular. Ninguno de los tumores MSI-L/S presentó metilación en la región promotora de RFC3. En cuanto a EXOI no podemos sacar ninguna conclusión ya que no observamos un patrón de metilación diferente entre los tumores MSI-H o estables.

Hasta la fecha, no hay reportes sobre la regulación de la expresión de ambos genes por metilación. Respecto al gen RFC3, se ha reportado la pérdida de expresión en CCR debido a mutaciones en regiones codificantes del gen, sugiriendo que estas alteraciones podrían contribuir a la patogénesis del cáncer al desregular la reparación y replicación del ADN¹⁴⁸. En el caso del gen EXOI, se ha descrito la presencia de variantes que afectan la actividad exonucleasa con un efecto patogénico que llevan a una actividad reducida del sistema MMR, generando una MSI-H^{149, 150, 151, 152}.

A partir de nuestros resultados, y dado que aún no se han reportado estudios de metilación sobre el gen RFC3, se abre una puerta para poder evaluar el efecto de la metilación de esta región sobre la expresión del gen y, en consecuencia, en la falla en el sistema de reparación MMR.

4.7 Determinación del estado de metilación de marcadores del fenotipo CIMP para CCR.

Como se mencionó en la sección “Introducción”, aunque el estado de CIMP ha sido reconocido como un tema de investigación crítico en CCR, todavía no hay consenso sobre la definición de CIMP con respecto al mejor panel de genes y a los valores de corte para determinar el estado de metilación de cada marcador¹⁵³. En nuestro caso, el estudio de metilación para determinar el fenotipo CIMP se llevó a cabo mediante MS-MLPA analizando un panel con los siguientes 8 marcadores: CACNA1G, CDKN2A, CRABP1, IGF2, MLH1, NEUROG1, RUNX3 y SOCS1. Estos ocho marcadores CIMP se pueden dividir en tres paneles de marcadores: CIMP-1 (CACNA1G, CDKN2A, CRABP1, MLH1 y

NEUROG1), CIMP-2 (CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3 y SOCS1), y CIMP-3, incluidos los ocho marcadores^{154, 155, 156}.

El estado de metilación de cada marcador se determinó analizando el % de metilación relativa de cada una de sus sondas. El límite para calificar una sonda como metilada fue $\geq 20\%$. Para considerar un marcador como metilado, el criterio utilizado fue que el 100% de sus sondas fueran metiladas. Los tumores sin marcadores metilados se clasifican como CIMP-0; aquellos con 1-4/8 se clasifican como CIMP-L y con 5-8/8 como CIMP-H.

Primeramente, se determinó la sensibilidad y la especificidad de cada marcador para determinar el fenotipo CIMP en nuestra población (tabla 11).

Marcador	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
RUNX3	93.3	76.8
MLH1	66.7	100
NEUROG1	93.3	69.5
CDKN2A	53.3	95.6
IGF2	86.6	49.3
CRABP1	86.6	86.9
SOCS1	20	100
CACNA1G	86.6	91.3

Tabla 11: Valores de sensibilidad y especificidad para cada marcador del fenotipo CIMP

Se encontró que los valores de sensibilidad y especificidad para alguno de los marcadores CIMP fueron similares a los obtenidos en muestras de pacientes de origen americano¹⁵⁷. Este grupo reportó valores de sensibilidad para RUNX3 (93%), MLH1 (62%), NEUROG1 (95%), IGF2 (96%), CRABP1 (99%) y CACNA1G (89%). La mayor diferencia se obtuvo con los marcadores SOCS1 (65%) y CDKN2A (87%), que en nuestra población reportó valores más bajos (20% y 53.3%, respectivamente). Tomando en cuenta todos los marcadores, estos resultados difieren de los reportados para la población asiática¹⁵⁸, revelando que los mismos marcadores CIMP estarían contribuyendo de manera diferente para determinar el fenotipo CIMP según las poblaciones. Las discrepancias

observadas entre los diferentes estudios pueden deberse a varios factores, como ser la definición CIMP, etnias o factores genéticos. Nuestros resultados van en el sentido de los que proponen que los paneles de marcadores CIMP deberían desarrollarse según las etnias, como sucede con otro tipo de paneles desarrollados para poblaciones específicas según las prevalencias¹⁵⁹.

Con respecto al % de metilación de cada marcador, este fue diferente en los grupos MSI-H y MSI-L/S. En el grupo MSI-H, la frecuencia de metilación fue 56.6% para IGF2, 52.8% para NEUROG1, 49.1% para RUNX3, 34% para CRABP1, 30.2% para CACNA1G, 18.5% para MLH1, 17% para CDKN2A y 5.7% para SOCS1. Estos valores fueron siempre mayores a los del grupo de MSI-L/S (figura 15).

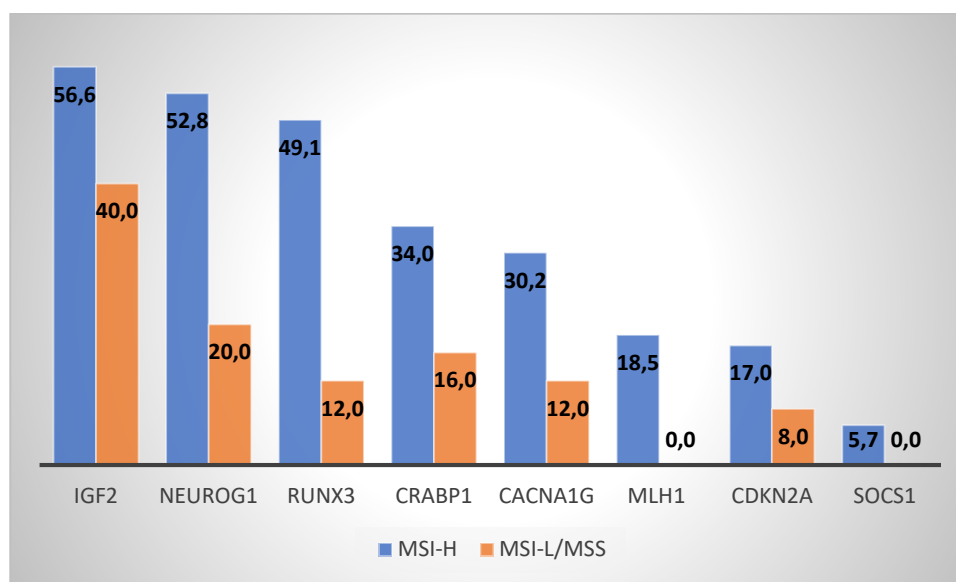


Figura 15. Comparación de frecuencias de cada marcador CIMP en los dos grupos de tumores, MSI-H y MSI-L/S.

Tomando el total de las muestras, encontramos que CIMP-H se observó en el 15,7% de los tumores, mientras que el 49,1% eran CIMP-L y el 35,2% CIMP-0 (ver tabla 12).

CIMP	Total (108) N(%)
High	17 (15.7)
Low	53 (49.1)
0	38 (35.2)

Tabla 12: distribución del fenotipo CIMP en el total de tumores.

Cuando las muestras se agruparon según el estado de microsatélites, en el grupo MSI-H la frecuencia de CIMP-H fue del 31,5 %, diferente a los valores reportados en población americana o asiática (73% y 10,2%, respectivamente)^{160, 161}.

En cuanto a las posibles asociaciones con las características clinicopatológicas y demográficas, no encontramos asociación significativa con el género ($p=0.611$) (Figura 16). Aquí se esperaba encontrar una asociación entre CIMP-H y sexo femenino, pero quizás el número bajo de casos CIMP-H no fue suficiente para demostrar esta asociación.

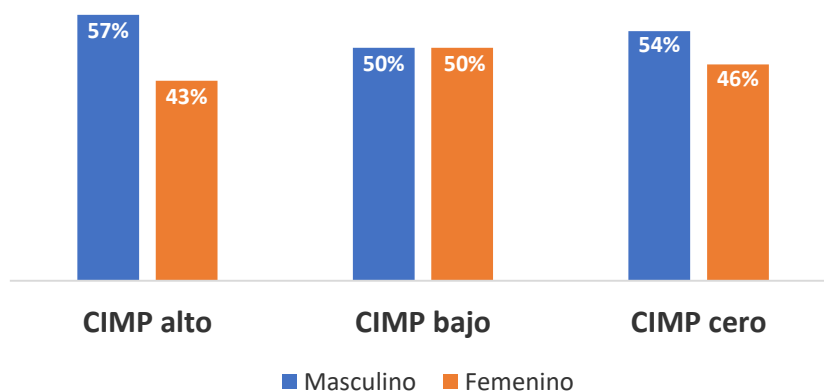


Figura 16: Distribución del género según el estado CIMP

Tampoco se encontró asociación con la edad, aun cuando se realizaron diferentes estratificaciones (figura 17), menores de 60 años y ≥ 60 años ($p=0.068$), o menores de 70 años y ≥ 70 años ($p=0.079$).

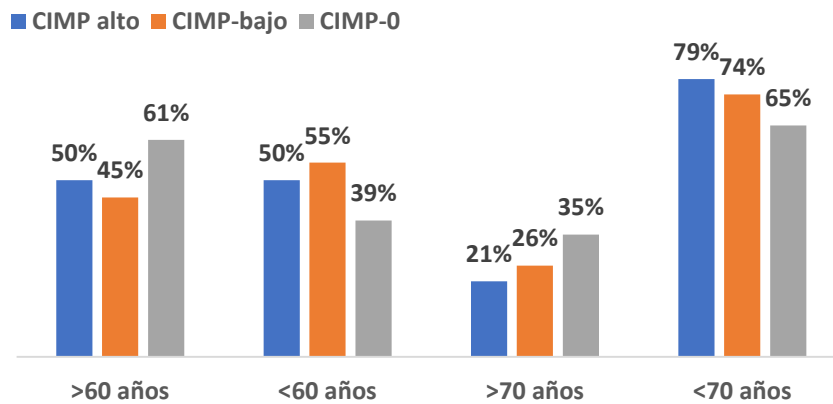


Figura 17: Distribución de los tumores según su estado CIMP y franja etaria.

Observamos que la mayoría de tumores CIMP-H (80%) fueron moderadamente diferenciados ($p < 0.001$), el 20% era pobremente diferenciado, mientras que se observó una ausencia de tumores bien diferenciados (Figura 18).

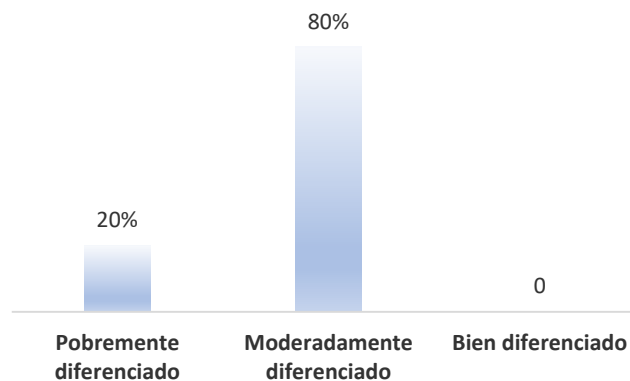


Figura 18: Distribución de los tumores según su estado CIMP-H y diferenciación tumoral.

Si bien se han reportado datos contradictorios acerca de la asociación de CIMP-H con el estado de diferenciación tumoral, nuestros resultados se suman a aquellos que demuestran una asociación significativa entre CIMP-H y tumores moderadamente diferenciados¹⁶².

No se observó asociación estadística entre el fenotipo CIMP y los diferentes estadios, ya sea, tomados por separado ($p=0.095$), o en conjunto, estadios (I + II) o (III + IV) ($p=0.105$), lo que concuerda con datos bibliográficos¹⁶³ (figura 19).

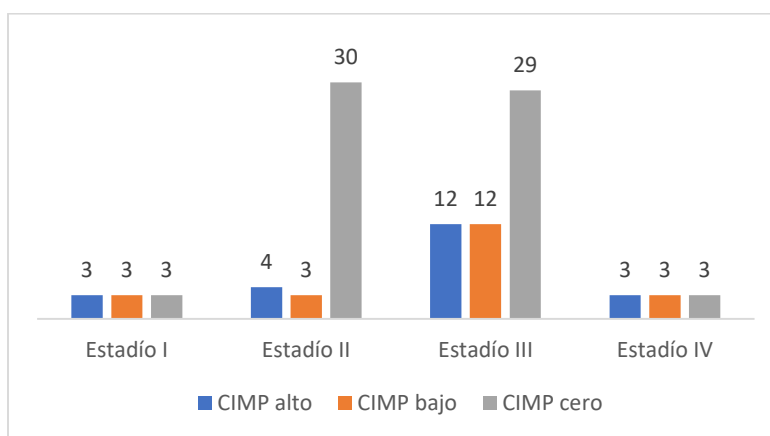


Figura 19: Distribución del estadio tumoral según el fenotipo CIMP.

La totalidad de los tumores con fenotipo CIMP-H presentaron una ubicación en el colon proximal, mostrando una fuerte asociación ($p<0.001$), dato ya reportado previamente¹⁶⁴.

En cuanto a las posibles asociaciones con las características moleculares tumorales, cuando se consideró el estado de los microsatélites, la distribución de tumores MSI-H fue 31,5 % CIMP-H, 46,3 % CIMP-L y 22,2 % CIMP-0, mientras que en el grupo MSI-L/S fue 0% CIMP-H, 51,9% CIMP-L y 48,1% CIMP-0 (ver figura 20). Encontramos una asociación significativa entre MSI-H y el fenotipo CIMP-H ($p<0.001$). Este dato va en el mismo sentido al reportado en un meta análisis llevado a cabo con 122 trabajos, representando una cohorte de 21994 pacientes con CCR, que mostró asociación entre el estado CIMP-H y MSI-H [$OR=10.95$, 95% $CI=8.49-14.13$]¹⁶⁵.

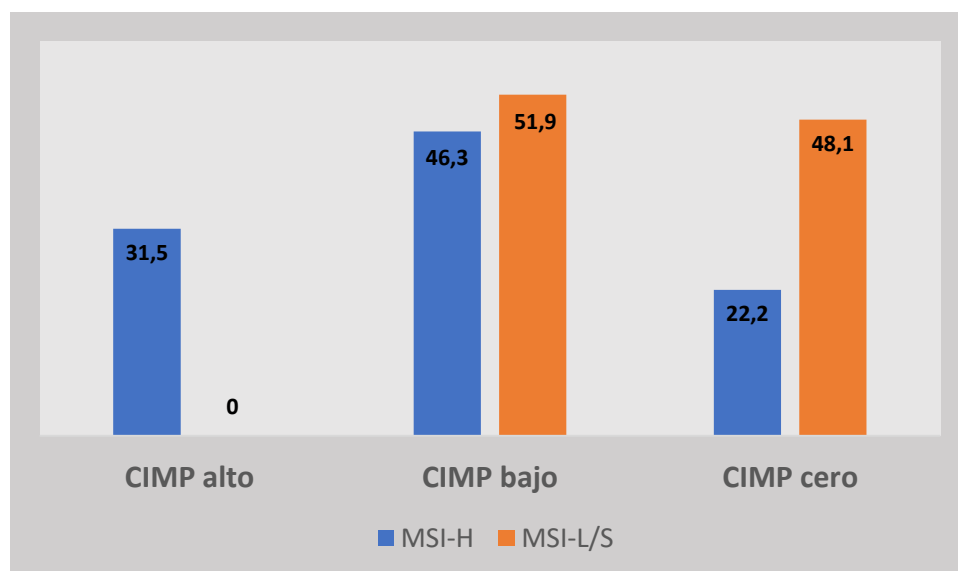
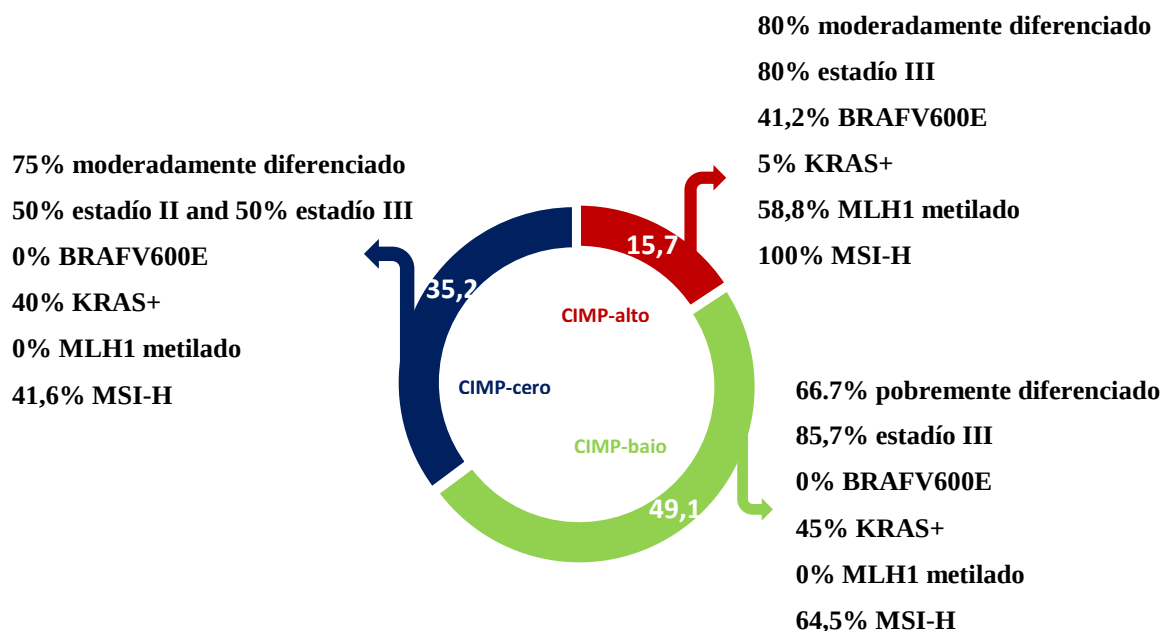


Figura 20: Distribución del estatus MSI-H o MSI-L/S según el fenotipo CIMP

Además, nuestros resultados revelaron una fuerte asociación entre tumores con fenotipo CIMP-H y la presencia de metilación en el promotor de MLH1 y la variante BRAFV600E ($p < 0,001$), resultados ya reportados previamente¹⁶⁶. Esta asociación se debe a que la metilación de MLH1 en tumores CIMP-H podría no ser un evento aleatorio, ya que existen algunos factores genéticos que producen un sesgo para metilar tanto el promotor del gen MLH1 así como el de otros genes asociados a CIMP. Weisenberger y col. observaron que la hipermetilación del gen MLH1 asociado con CIMP es el mecanismo principal para la evolución del CCR esporádico con MSI-H¹⁶⁷.

Por otra parte, encontramos una asociación significativa entre los fenotipos CIMP-L y CIMP-0 con KRAS mutado ($p < 0,001$). El 90% de las variantes de KRAS se encuentran en estos grupos CIMP. La posible asociación entre las variantes de KRAS y el estado de CIMP aún no está clara. Algunos estudios mostraron que las variantes de KRAS estaban asociadas con CIMP-L, mientras que otros describieron una asociación con CIMP-H^{168, 169}.

A continuación, se presenta un resumen de las características moleculares de los tumores según el fenotipo CIMP:



Si bien el estado de metilación basado en el fenotipo CIMP actualmente no tiene un impacto real en la toma de decisiones clínicas, su análisis permite realizar una categorización de los tumores en diferentes subtipos moleculares. Dada la falta de este tipo de datos en nuestro país, se propuso realizar un estudio del perfil molecular de las vías carcinogénicas MSI y CIMP en pacientes con CCR y, más adelante, poder determinar la prevalencia de los subtipos consenso CMS1-CMS-4.

NOTA: Parte de los resultados se presentan en el siguiente artículo (Anexo 3):

Vital M, Carusso F, Vergara C, Neffa F, Della Valle A, Esperón P. Genetic and epigenetic characteristics of patients with colorectal cancer from Uruguay. *Pathol Res Pract*. 2023 Jan;241:154264. doi: 10.1016/j.prp.2022.154264. Epub 2022 Dec 6. PMID: 36495761.

4.8 Estudio de metilación del gen SEPT9

Actualmente existen diferentes biomarcadores epigenéticos que han demostrado ser de utilidad para el diagnóstico y monitorización de diferentes tipos de cáncer. En el caso del CCR, uno de los marcadores estudiados es el gen SEPT9. Luego de analizar las 108 muestras mediante secuenciación Sanger, el 23.8% de los tumores presentó metilación en la región promotora (figura 21).

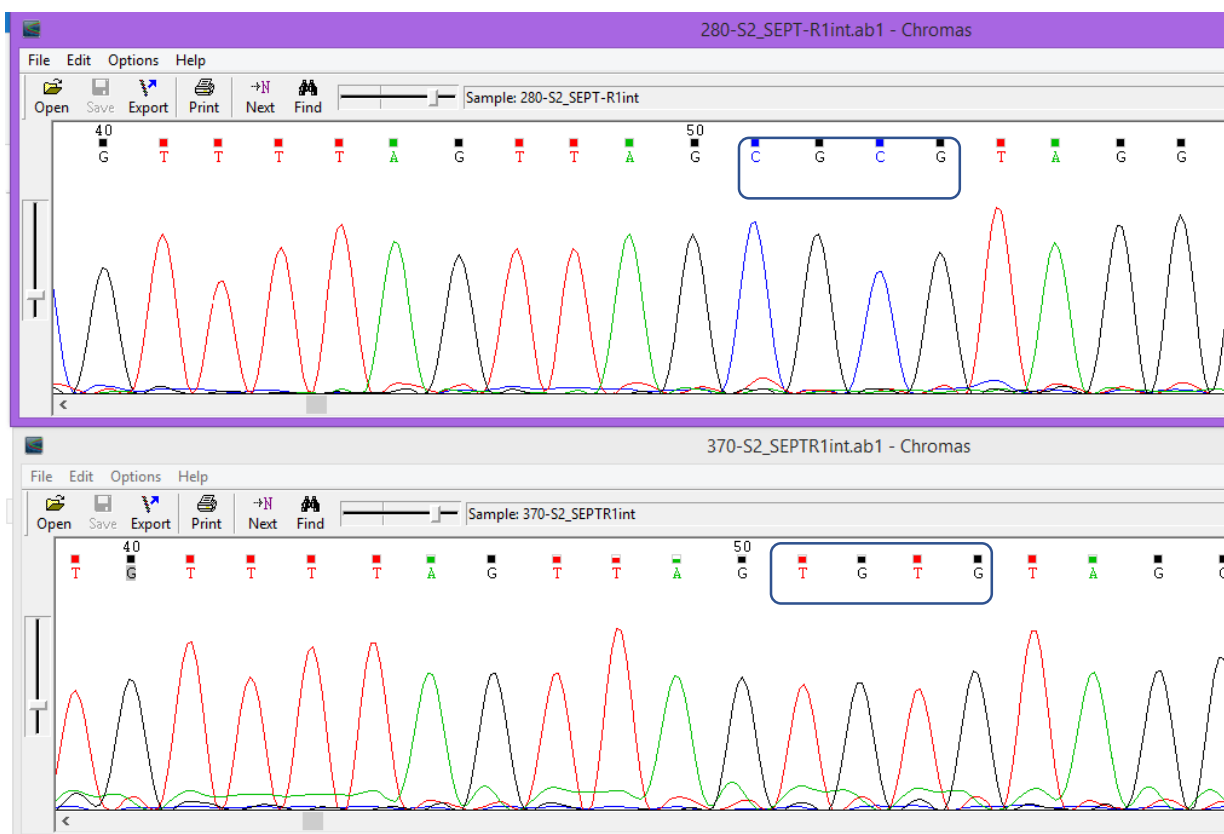


Figura 21: Electroferogramas de la región analizada del promotor del gen SEPT9. En la parte superior de la figura se observa la región con un patrón de metilación positivo (recuadro), mientras que en la parte inferior se observa la misma región con un patrón de metilación negativo.

SEPT9 es un gen supresor tumoral cuyo producto, la septina 9, participa en una variedad de procesos fisiológicos importantes, como la citocinesis, la reparación del ADN,

la migración celular y la apoptosis¹⁷⁰. Varios estudios han demostrado que el nivel de expresión de SEPT9 en células de CCR era significativamente menor que en células epiteliales normales, y que además ese nivel de expresión disminuía durante la transformación de adenoma a CCR^{171, 172, 173, 174}. La hipermetilación del ADN en la región promotora de SEPT9_V2 es un sello distintivo de la carcinogénesis del CCR¹⁷⁵. Los cambios importantes en el patrón de metilación de este gen se limitan solo una de las islas CpG, la CGI3¹⁷⁶. En CCR, la metilación aberrante se extiende desde el centro de CGI3 hacia el extremo 5' de la isla, mientras que, en las muestras de adenoma, el extremo 5' de CGI3 permanece libre de metilación.

Nuestra hipótesis fue que, por tratarse de un buen biomarcador de CCR, la mayor parte de los tumores (tanto MSI como MSS), presentarían metilación aberrante en este gen, hipótesis que no se cumplió.

Si bien en algunos estudios SEPT9 mostró una alta sensibilidad y especificidad para detectar CCR¹⁷⁷, nuestros resultados indican que habría que analizar otra región del promotor, ya que el análisis de esta isla CpG sugiere que no sería un buen biomarcador de CCR.

Luego de finalizado el análisis de metilación de todos los genes MMR y de la secuencia de la región promotora de MLH1, de las 54 muestras MSI-H, observamos que:

- 10 presentaron metilación en el promotor (2 de ellas presentaron la variante -93G>A en el promotor de MLH1)
- 12 presentaron las variantes -93G>A, -283A>G o -113 (G>A), que podrían estar asociadas con un MMR deficiente
- 1 presentó metilación en el gen RFC3

quedando así 31 muestras sin determinar la posible causa de la inestabilidad de microsatélite.

5- CONCLUSIONES

Sobre el objetivo general planteado:

Contribuir al estudio de eventos genéticos y epigenéticos en muestras de tumores gastrointestinales:

- Este trabajo contribuye con más información acerca de las bases genéticas del CCR. El conocimiento sobre las variantes en los genes estudiados resulta relevante para planificar una terapia personalizada frente a esta patología. Por otro lado, aporta información sobre las características moleculares de esta patología en nuestro país ya que es la primera vez que se realiza este estudio, contribuyendo con más reportes de países de América Latina de la cual hay escasos datos.

Sobre los objetivos específicos planteados:

1) Relevamiento de las características demográficas y clinicopatológicas de pacientes y tumores para la posterior realización de estudios de asociación.

Se realizó el relevamiento de datos demográficos e histopatológicos a partir de las historias clínicas para llevar a cabo el análisis de asociaciones estadísticas relevantes.

2) Secuenciación y caracterización de variantes localizadas en la región promotora del gen MLH1

Se analizó mediante secuenciación Sanger la región promotora del gen MLH1. Si bien algunas de las variantes encontradas ya habían sido reportadas y asociadas a CCR, otras no lo fueron. Queda pendiente realizar estudios de expresión para evaluar el efecto de la variante en cuestión sobre los niveles de transcripción del gen.

3) Búsqueda de variantes en los genes KRAS (exones 2, 3 y 4), NRAS (exones 2 y 3) y PIK3CA (exones 9 y 20) y determinación de la mutación BRAFV600E. Asociaciones con otros marcadores y características demográficas y clinicopatológicas.

Se analizaron las 108 muestras por diferentes métodos moleculares y se determinó la prevalencia de variantes en KRAS, NRAS y PIK3CA, y cuáles fueron las variantes más

comunes en nuestra población. Determinamos la frecuencia de la mutación V600E del gen BRAF en nuestra cohorte. Analizamos las asociaciones estadísticas con los demás marcadores y características demográficas y clinicopatológicas.

4) Puesta a punto de diferentes técnicas utilizadas para realizar estudios de metilación del ADN.

Describimos y comparamos los resultados de cuatro ensayos diferentes para análisis de metilación. Evaluamos las principales ventajas y desventajas (tiempo de respuesta corto, alto rendimiento, sensibilidad y facilidad de manipulación), y concluimos que PCR-HRM es el método de detección más conveniente para el estudio de metilación de MLH1.

5) Caracterización del estado de metilación de genes MMR y detección de deleciones / duplicaciones en las regiones promotoras de los genes MMR y en la región 3' de EPCAM

Determinamos el estado de metilación de los genes MLH1, MSH2, PMS2, MSH6, RFC3 y EXOI y analizamos la posible presencia de deleciones / duplicaciones en las regiones promotoras de los genes MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 y EPCAM. En el caso de RFC, se abre una posibilidad para seguir realizando estudios sobre su estado de metilación y su relación con el fenotipo MSI-H.

6) Determinación del estado de metilación de marcadores del fenotipo CIMP para CCR. Determinamos el estado de metilación de los tumores mediante el análisis de 8 marcadores CIMP, clasificándolos en CIMP-H, CIMP-L y CIMP-0. Correlacionamos el fenotipo CIMP con los demás biomarcadores y con las características clinicopatológicas. CIMP es una característica más que se toma en cuenta al momento de clasificar los tumores según los “subtipos moleculares consenso” en CMS1 (subtipo inmune MSI), CMS2 (subtipo canónico), CMS3 (subtipo metabólico) y CMS4 (subtipo mesenquimal). A pesar de que la categorización de CMS proporciona una visión detallada de la etiología del CCR, y que de varios estudios se ha visto que CIMP-H se asocia con un pronóstico significativamente malo en pacientes con CCR, especialmente en aquellos con tumores en estadio III-IV y MSI-L/S, actualmente CIMP no tiene un impacto real en la toma de

decisiones clínicas y no está incorporado aún en las guías de la NCCN (National Comprehensive Cancer Network).

7) Determinación el estado de metilación del gen de la septina 9 (SEPT9)

Se analizó el estado de metilación de las 108 muestras y encontramos que el 76.2% de los tumores no presentó un patrón de SEPT9 metilado. Se deberá seguir investigando acerca de la utilidad este biomarcador en la detección de CCR. Por un lado, se podría analizar una región del promotor diferente a la estudiada en este trabajo, y por otro, se lo podría evaluar en conjunto con otros biomarcadores, como, por ejemplo, BMP3 o NDRG4 (incorporados en test de screening de CCR aprobados por la FDA) o el ARN no codificante LINC00473, recientemente propuesto como nuevo biomarcador.

6- PERSPECTIVAS

Aunque pensamos que este trabajo proporcionó información sobre las bases genéticas del CCR, aún queda mucho por realizar para contribuir a una mejor comprensión de esta enfermedad.

En este trabajo, quedaron pendientes los siguientes puntos:

- Culminar con la caracterización de variantes localizadas en la región promotora del gen MLH1 mediante estudios de expresión.
- Incorporar el análisis de otras variantes (de menor frecuencia) en los genes ya estudiados, o de otros genes relacionados con proliferación, diferenciación y supervivencia celular, como por ejemplo el gen HRAS.
- Realizar el estudio de inestabilidad cromosómica de manera de poder clasificar los tumores dentro de los subtipos moleculares consenso CMS1-4.
- Se encuentra en proceso la elaboración de una revisión acerca de la prevalencia de variantes en los exones 9 y 20 del gen PIK3CA, resaltando el resultado obtenido para nuestra población.
- Evaluar los efectos de la metilación de la región analizada del promotor RFC sobre su expresión mediante ensayos de actividad transcripcional.
- Incorporar un mayor número de muestras de manera de tener resultados con un valor estadístico más fuerte.

Por otra parte, se puede plantear comenzar una línea de investigación acerca del análisis de biomarcadores que han sido sugeridos como prometedores para la detección temprana de CCR en ADN circulante. Además, continuar con el estudio de la metilación del gen SEPT9, y analizar la incorporación de los genes BMP3, NDRG4 o LINC00473, quienes también han sido sugeridos como marcadores potenciales para la detección temprana de lesiones neoplásicas.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>
- 2 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209-249.
- 3 <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Situacion-Epidemiologica-del-Uruguay-en-relacion-al-Cancer-Mayo-2022-uc108> (acceso en mayo 2023)
- 4 Bonilla F, Canessa C. Cáncer colorrectal. *Clin Quir Fac Med UdelaR*. 2018.
- 5 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>
- 6 Manrique, Javier E., Sullcahuamán-Allende, Yasser, & Limache-García, Abel. (2013). Asesoría genética sobre cáncer en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 30(1), 118-123.
- 7 Rahner N, Steinke V. Hereditary cancer syndromes. *Dtsch Arztebl Int*. 2008 Oct;105(41):706-14.
- 8 <https://www.cancer.gov/> (acceso mayo 2023)
- 9 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
- 10 Bozic, I., T. Antal, H. Ohtsuki, H. Carter, D. Kim, S. Chen, R. Karchin, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and M.A. Nowak (2010). "Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(43): 18545-50
- 11 Pon JR, Marra MA. Driver and passenger mutations in cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2015; 10:25–50
- 12 Jurriaan van Ginkel, Ian Tomlinson, Ignacio Soriano. The Evolutionary Landscape of Colorectal Tumorigenesis: Recent Paradigms, Models, and Hypotheses. *Gastroenterology* 2023;164:841–846
- 13 McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):613-628.
- 14 Mo H, Henriksson M. Identification of small molecules that induce apoptosis in a Myc-dependent manner and inhibit Myc-driven transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (16): 6344-6349.
- 15 J.N. Weitzel, K.R. Blazer, D.J. Macdonald, J.O. Culver, K. Offit Genetics, genomics, and cancer risk assessment: State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine *CA Cancer J Clin* (2011)
- 16 D. Hanahan, R.A. Weinberg The hallmarks of cancer *Cell*, 100 (2000), pp. 57-70
- 17 H.B. Forrester, J. Li, D. Hovan, A.N. Ivashkevich, C.N. Sprung DNA repair genes: alternative transcription and gene expression at the exon level in response to the DNA damaging agent, ionizing radiation *PLoS One*, 7 (2012), p. e53358
- 18 Pino, M. S. and D. C. Chung (2010). "The chromosomal instability pathway in colon cancer." *Gastroenterology* 138(6): 2059-72
- 19 Tijhuis, A.E., Johnson, S.C. & McClelland, S.E. The emerging links between chromosomal instability (CIN), metastasis, inflammation and tumour immunity. *Mol Cytogenet* 12, 17 (2019).
- 20 Garrido-Ramos MA. Satellite DNA: an evolving topic. *Genes*. 2017;8(9):230.
- 21 Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993 May 7;260(5109):812-6.
- 22 Kim JH, Kang GH. Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 21;20(15):4230-43.
- 23 Deng, G., I. Bell, S. Crawley, J. Gum, J. P. Terdiman, B. A. Allen, B. Truta, M. H. Sleisenger and Y. S. Kim (2004). "BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Clin Cancer Res* 10(1 Pt 1): 191-5.
- 24 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, et al. 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(22):5248–57
- 25 Park J, Shin S, Yoo HM, Lee SW, Kim JG. Evaluation of the Three Customized MSI Panels to Improve the Detection of Microsatellite Instability in Gastric Cancer. *Clin Lab*. 2017 Apr 1;63(4):705-716.
- 26 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. 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*. 1998;58:5248–57.

- 27 Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9:297-308.
- 28 Guo S, Zhang Y, Yuan F, et al. Regulation of replication protein A functions in mismatch repair by phosphorylation. *J Biol Chem*, 2006; 281:21607–21616.
- 29 Kunkel TA, Erie DA . DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:681–710.
- 30 Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P . Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* 2006; 126:297–308.
- 31 Gu L, Hong Y, McCulloch S, Watanabe H, Li GM . ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:1173–1178.
- 32 Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P . Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* 2006; 126:297–308.
- 33 Guo S, Zhang Y, Yuan F, et al. Regulation of replication protein A functions in mismatch repair by phosphorylation. *J Biol Chem*, 2006; 281:21607–21616.
- ³⁴ <https://www.genome.jp/entry/ko03430>
- ³⁵ Kim U, Lee DS. Epigenetic Regulations in Mammalian Cells: Roles and Profiling Techniques. *Mol Cells*. 2023 Feb 28;46(2):86-98.
- 36 Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2395-402
- 37 Veland N, Hardikar S, Zhong Y, Gayatri S, Dan J, Strahl BD, Rothbart SB, Bedford MT, Chen T. "The Arginine Methyltransferase PRMT6 Regulates DNA Methylation and Contributes to Global DNA Hypomethylation in Cancer". *Cell Rep.* 2017,21 (12): 3390–3397.
- 38 Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:1148-59.
- ³⁹ Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet.* 2010;70:27-56.
- 40 Grady WM. 2003. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology.* 124(6):1574–94
- 41 Rodríguez-Soler M, Pérez-Carbonell L, Guarinos C, Zapater P, Castillejo A, et al.2013. Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation. *Gastroenterology.* 144(5):926–32.
- 42 Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:1148-1159.
- 43 Deng G, Chen A, Hong UJ, et al. Methylation of CpG in a Small Region of the hMLH1 Promoter Invariably Correlates with the Absence of Gene Expression. *Cancer Res.* 1999;59:2029-2033.
- 44 Tsun Leung Chan, Siu Tsan Yuen, Chi Kwan Kong, et al. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genetics.* 2006;38:1178–1183.
- ⁴⁵ Tse JWT, Jenkins LJ, Chionh F, Mariadason JM. Aberrant DNA Methylation in Colorectal Cancer: What Should We Target? *Trends Cancer.* 2017 Oct;3(10):698-712
- ⁴⁶ 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.
- 47 Toyota, M. et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8681–8686 (1999).
- ⁴⁸ Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006;38:787–793
- 49 Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M, Fuchs CS: Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn* 2007, 9:305–314
- 50 Nosho K, Irahara N, Shima K, Kure S, Kirkner GJ, Schernhammer ES, Hazra A, Hunter DJ, Quackenbush J, Spiegelman D, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PLoS One.* 2008;3(11):e3698.
- ⁵¹ Jia, M., Gao, X., Zhang, Y. et al. Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin Epigenet* 8, 25 (2016)
- 52 Jia M, Gao X, Zhang Y, Hoffmeister M, Brenner H. Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin Epigenetics.* 2016 Mar 2;8:25.
- 53 Advani, S.M., Advani, P.S., Brown, D.W. et al. Global differences in the prevalence of the CpG island methylator phenotype of colorectal cancer. *BMC Cancer* 19, 964 (2019).
- 54 Jass J.R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007;50:113–130
- 55 Ogino S., Goel A. Molecular Classification and Correlates in Colorectal Cancer. *J. Mol. Diagn.* 2008;10:13–27.

- 56 Melo F.D.S.E., Wang X., Jansen M., Fessler E., Trinh A., De Rooij L.P.M.H., De Jong J.H., De Boer O.J., Van Leersum R., Bijlsma M.F., et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat. Med.* 2013;19:614–618.
- 57 Yagi K., Akagi K., Hayashi H., Nagae G., Tsuji S., Isagawa T., Midorikawa Y., Nishimura Y., Sakamoto H., Seto Y., et al. Three DNA Methylation Epigenotypes in Human Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009;16:21–33.
- 58 Guinney J., Dienstmann R., Wang X., De Reyniès A., Schlicker A., Soneson C., Marisa L., Roepman P., Nyamundanda G., Angelino P., et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* 2015;21:1350–1356.
- 59 Santos E. *Biología molecular del cáncer: del laboratorio a la clínica*. Libro Editado por la Real Academia de Medicina de Salamanca. CIC & IBMCC 2013.
- 60 Atanasova VS, Riedl A, Strobl M, Flandorfer J, Unterleuthner D, Weindorfer C, Neuhold P, Stang S, Hengstschläger M, Bergmann M, Dolznig H. Selective Eradication of Colon Cancer Cells Harboring PI3K and/or MAPK Pathway Mutations in 3D Culture by Combined PI3K/AKT/mTOR Pathway and MEK Inhibition. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 14;24(2):1668.
- 61 Roux P.P., Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: A family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004;68:320–344. doi: 10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004
- 62 Molina J.R., Adjei A.A. The ras/raf/mapk pathway. *J. Thorac. Oncol.* 2006;1:7–9. doi: 10.1016/S1556-0864(15)31506-9.
- 63 Toss, A., Cristofanilli, M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res* 17, 60 (2015).
- 64 Castellano E., Downward J. Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Phosphoinositide 3-Kinase Health Dis.* 2010;1:143–169.
- 65 Castellano E., Downward J. RAS interaction with PI3K: More than just another effector pathway. *Genes Cancer.* 2011;2:261–274. doi: 10.1177/1947601911408079
- 66 Toss, A., Cristofanilli, M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res* 17, 60 (2015).
- 67 Hamada T, Nowak JA, Ogino S. PIK3CA mutation and colorectal cancer precision medicine. *Oncotarget* 2017;8(14):22305–22306.
- 68 Samuels Y., Wang Z., Bardelli A., Silliman N., Ptak J., Szabo S., Yan H., Gazdar A., Powell S.M., Riggins G.J. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 2004;304:554. doi: 10.1126/science.1096502.
- 69 Thomas R.K., Baker A.C., DeBiasi R.M., Winckler W., LaFramboise T., Lin W.M., Wang M., Feng W., Zander T., MacConaill L.E. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat. Genet.* 2007;39:347–351. doi: 10.1038/ng1975.
- 70 Simi L., Pratesi N., Vignoli M., Sestini R., Cianchi F., Valanzano R., Nobili S., Mini E., Pazzagli M., Orlando C. High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008;130:247–253.
- 71 Molina J.R., Adjei A.A. The ras/raf/mapk pathway. *J. Thorac. Oncol.* 2006;1:7–9. doi: 10.1016/S1556-0864(15)31506-9.
- 72 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17384584/>
- 73 The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discovery.* 2017;7(8):818–831
- 74 Schiripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2015;136:83–90.
- 75 Schiripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2015;136:83–90
- 76 Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM. Mechanism of activation of the RAF- ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 2004;116:855–67.
- 77 Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417:949–54
- 78 Chen D, Huang JF, Liu K, Zhang LQ, Yang Z, Chuai ZR. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9:e90607.

- ⁷⁹ Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Shima K, Irahara N, Kure S. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:1477–84.
- ⁸⁰ Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* (2004) 304:554.
- ⁸¹ Ligresti G, Militello L, Steelman LS, Cavallaro A, Basile F, Nicoletti F, Stivala F, McCubrey JA, Libra M. PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle.* 2009 May 1;8(9):1352-8.
- ⁸² Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, Walters RJ, et al. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PLoS One* (2013) 8:e65479.
- ⁸³ Nosho K, Kawasaki T, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Zepf D, et al. PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia* (2008) 10:534–41 10.1593/neo.08336
- ⁸⁴ Day FL, Jorissen RN, Lipton L, Mouradov D, Sakthianandeswaren A, Christie M, et al. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* (2013) 19:3285–96 10.1158/1078-0432.CCR-12-3614
- ⁸⁵ Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5705-5712
- ⁸⁶ Loupakakis F, Ruzzo A, Cremolini C, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;101:715-721.
- ⁸⁷ Van Cutsem, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:1408–17.
- ⁸⁸ Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol.* 2011;22:1535–46.
- ⁸⁹ Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* (2009) 27:2091–6
- ⁹⁰ Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* (2013) 369:1023–34
- ⁹¹ Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* (2009) 69:1851–7
- ⁹² Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* (2009) 20:84–90
- ⁹³ Sood A, McClain D, Maitra R, Basu-Mallick A, Seetharam R, Kaubisch A, et al. PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* (2012) 11:143–50
- ⁹⁴ Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, De Roock W, Biesmans B, Claes B, et al. PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* (2009) 15:3184–8
- ⁹⁵ DellaValle AD, Neffa F, Esperon P, Vergara C, Carusso F, et al. (2019) Impact of Microsatellite Instability in Colon Cancer. *J Cancer Sci Ther* 11: 295-298.
- ⁹⁶ Eads C, Danenberg K, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:32.
- ⁹⁷ Eads C, Laird P. Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA). *DNA Methylation Protocols.* Volume 200 of the series *Methods in Molecular Biology™*. 2002;71-86.
- ⁹⁸ Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, et al. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:710–715.
- ⁹⁹ Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, et al. Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn* 2007;9:305–14
- ¹⁰⁰ Baraibar I, Ros J, Saoudi N, Salvà F, García A, Castells MR, Tabernero J, Élez E. Sex and gender perspectives in colorectal cancer. *ESMO Open.* 2023 Mar 31;8(2):101204

-
- 101 Huiping Chen¹, Nicholas P. Taylor², Kaisa M. Sotamaa et al. Evidence for heritable predisposition to epigenetic silencing of MLH1. *Int. J. Cancer*: 120, 1684–1688 (2007)
- 102 Manxue Mei, Dong Liu, Shuo Dong y col. The MLH1 _93 promoter variant influences gene expression. *Cancer Epidemiology* 34 (2010) 93–95
- 103 Sheron Perera, Miralem Mrkonjic, James B. Rawson y col. Functional effects of the MLH1-93G>A polymorphism on MLH1/EPM2AIP1 promoter activity. *Oncology Reports* 25: 809-815, 2011
- 104 Brenner C, Fuks F. DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;301:45–66
- 105 Jung P, Hermeking H. The c-MYC-AP4-p21 cascade. *Cell Cycle*. 2009 Apr 1;8(7):982-9. doi: 10.4161/cc.8.7.7949. Epub 2009 Apr 27. PMID: 19270520.
- 106 Maity, S.N., de Crombrughe, B., 1998. Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem. Sci.* 23, 174–178.
- 107 Mantovani, R., 1999. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239, 15–27.
- 108 Huang, H.S., Chen, C.J., Chang, W.C., 1999. The CCAAT-box binding factor NF-Y is required for the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human epidermoid carcinoma A431 cells. *FEBS Lett.* 455, 111–116.
- 109 Marziali, G., Perrotti, E., Ilari, R., Testa, U., Coccia, E.M., Battistini, A., 1997. Transcriptional regulation of the ferritin heavy-chain gene: the activity of the CCAAT binding factor NF-Y is modulated in hemetreated Friend leukemia cells and during monocyte-to-macrophage differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1387–1395.
- 110 Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. *PNAS* March 29, 2005 vol. 102 no. 13 4813– 4818
- 111 Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000; 355:1745-50.
- 112 Sporadic colorectal adenocarcinomas with high frequency microsatellitei. *Cancer* 2000;89:2025-37.
- 113 Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
- 114 Arakawa K, Hata K, Kawai K, et al. Predictors for high microsatellite instability in patients with colorectal cancer fulfilling the revised bethesda guidelines. *Anticancer Res.* 2018;38(8):4871–6.
- 115 Very low incidence of microsatellite instability in rectal cancers from families at risk for HNPCC. *Clin Genet* 2003;63:64-70.
- 116 p53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1343-9.
- 117 Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000 Jan 13;342(2):69-77. doi: 10.1056/NEJM200001133420201. PMID: 10631274.
- 118 Zekri J, Al-Shehri A, Mahrous M, Al-Rehaily S, Darwish T, Bassi S, El Taani H, Al Zahrani A, Elsamany S, Al-Maghrabi J, Sadiq BB. Mutations in codons 12 and 13 of K-ras exon 2 in colorectal tumors of Saudi Arabian patients: frequency, clinicopathological associations, and clinical outcomes. *Genet Mol Res.* 2017 Feb 16;16(1).
- 119 Sanchez-Ibarra HE, Jiang X, Gallegos-Gonzalez EY, Cavazos-González AC, Chen Y, Morcos F, et al. KRAS, NRAS, and BRAF mutation prevalence, clinicopathological association, and their application in a predictive model in Mexican patients with metastatic colorectal cancer: A retrospective cohort study. *PLoS One.* 2020;15(7):e0235490.
- 120 Gong J, Cho M, Sy M, Salgia R, Fakih M. Molecular profiling of metastatic colorectal tumors using next-generation sequencing: a single-institution experience. *Oncotarget.* 2017;8:42198–213
- 121 Dobre M, Dinu DE, Panaitescu E, Birla RE, Iosif CI, Boeriu M. KRAS gene mutations – prognostic factor in colorectal cancer? *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56(2 Suppl):671–8.
- 122 Kwak MS, Cha JM, Cho YH, Kim SH, Yoon JY, Jeon JW. Clinical predictors for KRAS codon 13 mutations in patients with colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2018;52:431–6.
- 123 Brule SY, Jonker DJ, Karapetis CS, et al. Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17. *Eur J Cancer.* 2015;51(11):1405–1414.
- 124 Missiaglia E, Jacobs B, D’Ario G, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Oncol.* 2014;25(10):1995–2001.
- 125 De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010;11(8):753-62.

- 126 Vaughn C, Zobell S, Furtado L, et al. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50(5):307-312.
- 127 Ogino S, Noshro K, Kirkner G, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009;58(1):90-96.
- 128 Liu J, Tang L, Yi J, et al. Unique characteristics of CpG island methylator phenotype (CIMP) in a Chinese population with colorectal cancer. *BMC Gastroenterol* 2019;19(1):173.
- 129 Seppälä T.T., Böhm J.P., Friman M., Lahtinen L., Väyrynen V.M., Liipo T.K. Combination of microsatellite instability and BRAF mutation status for subtyping colorectal cancer. *Br. J. Cancer*. 2015;112(12):1966–1975.
- 130 Natsume S., Yamaguchi T., Takao M., Iijima T., Wakaume R., Takahashi K. Clinicopathological and molecular differences between right-sided and left-sided colorectal cancer in Japanese patients. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2018;48(7):609–618.
- 131 Hanna M.C., Go C., Roden C., Jones R.T., Pochanard P., Javed A.Y. Colorectal cancers from distinct ancestral populations show variations in BRAF mutation frequency. *PLoS One*. 2013;8:e74950.
- 132 Qiu T., Lu H., Guo L., Huang W., Ling Y., Shan L. Detection of BRAF mutation in Chinese tumor patients using a highly sensitive antibody immunohistochemistry assay. *Sci. Rep.* 2015;5:9211
- 133 Yanus G.A., Belyaeva A.V., Ivantsov A.O., ESH Kuligina, Suspitsin E.N., Mitiushkina N.V. Pattern of clinically relevant mutations in consecutive series of Russian colorectal cancer patients. *Med. Oncol.* 2013;30:686.
- 134 Rozek L.S., Herron C.M., Greenson J.K., Moreno V., Capella G., Rennert G. Smoking, gender, and ethnicity predict somatic BRAF mutations in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010;19:838–843.
- 135 Hernández-Sandoval JA, Gutiérrez-Angulo M, Magaña-Torres MT, Alvizo-Rodríguez CR, Ramírez-Plascencia HHF, Flores-López BA, Valenzuela-Pérez JA, Peregrina-Sandoval J, Moreno-Ortiz JM, Domínguez-Valentín M, Ayala-Madrigal ML. Prevalence of the BRAF p.v600e variant in patients with colorectal cancer from Mexico and its estimated frequency in Latin American and Caribbean populations. *J Investig Med.* 2020 Jun;68(5):985-991.
- 136 Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut.* 2004;53:1137–44.
- 137 Fernando W, Miranda M, Worthley D, et al. The CIMP Phenotype in BRAF Mutant Serrated Polyps from a Prospective Colonoscopy Patient Cohort. *Gastroenterol Res Pract* 2014;2014:374926.
- 138 Chen D, Huang JF, Liu K, Zhang LQ, Yang Z, Chuai ZR. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9:e90607.
- 139 Madsen R, Vanhaesebroeck B, Semple R. Cancer-Associated PIK3CA Mutations in Overgrowth Disorders. *Trends Mol Med* 2018;(10):856-870.
- 140 Juan Jin, Yaqin Shi, Shu Zhang & Shuofei Yang (2020) PIK3CA mutation and clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and Meta-Analysis, *Acta Oncologica*, 59:1, 66-74,
- 141 Tsun Leung Chan, Siu Tsan Yuen, Chi Kwan Kong, et al. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genetics.* 2006;38:1178–1183.
- 142 Li X, Yao X, Wang Y, et al. MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. *PLoS One* 2013;8(3):e59064.
- 143 Levine A, Phipps A, Baron J, et al. Clinicopathologic Risk Factor Distributions for MLH1 Promoter Region Methylation in CIMP-Positive Tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016;25(1):68-75.
- 144 Kim JH, Bae JM, Cho NY, Kang GH. Distinct features between MLH1-methylated and unmethylated colorectal carcinomas with the CpG island methylator phenotype: implications in the serrated neoplasia pathway. *Oncotarget.* 2016 Mar 22;7(12):14095-111. doi: 10.18632/oncotarget.7374.
- 145 Hawkins N.J., Bariol C., Ward R.L. The serrated neoplasia pathway. *Pathology.* 2002;34:548–555.
- 146 Pinto D, Pinto C, Guerra J, Pinheiro M, Santos R, Vedeld HM, Yohannes Z, Peixoto A, Santos C, Pinto P, Lopes P, Lothe R, Lind GE, Henrique R, Teixeira MR. Contribution of MLH1 constitutional methylation for Lynch syndrome diagnosis in patients with tumor MLH1 downregulation. *Cancer Med.* 2018 Feb;7(2):433-444.
- 147 . Al-Sukhni, M. Aronson, S. Gallinger. Hereditary colorectal cancer syndromes: Familial adenomatous polyposis and Lynch syndrome. *Surg Clin N Am.*, 88 (2008), pp. 819-844
- 148 Kim YR, Song SY, Kim SS, An CH, Lee SH, Yoo NJ. Mutational and expressional analysis of RFC3, a clamp loader in DNA replication, in gastric and colorectal cancers. *Hum Pathol.* 2010 Oct;41(10):1431-7

- 149 Wu, Ying & Berends, Maran & Post, Jan & Mensink, Rob & Verlind, Edwin & Sluis, Tineke & Kempinga, Claudia & Sijmons, Rolf & Zee, A.G. & Hollema, Harry & Kleibeuker, Jan & Buys, Charles & Hofstra, Robert. (2001). Germline mutations of EXO1 gene in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and atypical HNPCC forms. *Gastroenterology*. 120. 1580-7. 10.1053/gast.2001.25117.
- 150 Jagmohan-Changur, Shantie & Poikonen, Taija & Vilkkii, Susa & Launonen, Virpi & Wikman, Friedrik & Orntoft, Torben & Møller, Pål & Vasen, Hans & Tops, Carli & Kolodner, Richard & Mecklin, Jukka-Pekka & Järvinen, Heikki & Bevan, Sarah & Houlston, Richard & Aaltonen, Lauri & Fodde, Riccardo & Wijnen, Juul & Karhu, Auli. (2003). EXO1 Variants Occur Commonly in Normal Population Evidence against a Role in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer research*. 63. 154-8.
- 151 Sun X., Zheng L., Shen B. Functional alterations of human exonuclease 1 mutants identified in atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Cancer Res*. 62:6026-6030 (2002)
- 152 Sascha Emilie Liberti and Lene Juel Rasmussen . Is hEXO1 a Cancer Predisposing Gene? *Mol Cancer Res* 2004;2:427-432.
- 153 Jia M, Gao X, Zhang Y, Hoffmeister M, Brenner H. Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin Epigenetics*. 2016 Mar 2;8:25.
- 154 Liu, J., Tang, L., Yi, J. et al. Unique characteristics of CpG island methylator phenotype (CIMP) in a Chinese population with colorectal cancer. *BMC Gastroenterol* 19, 173 (2019).
- 155 Ogino, S.; Kawasaki, T.; Kirkner, G.J.; Kraft, P.; Loda, M.; Fuchs, C.S. Evaluation of Markers for CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer by a Large Population-Based Sample. *J. Mol. Diagn.* 2007, 9, 305–314
- 156 Weisenberger D.J., Siegmund K., Campan M., Young J., I Long T., Faasse M., Kang G.H., Widschwendter M., Weener D., Buchanan D., et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 2006;38:787–793.
- 157 Ogino S, Kawasaki T, Kirkner G, Kraft P, Loda M, Fuchs C. Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn.* 2007;9(3):305–14.
- 158 Liu J, Tang L, Yi J, Li G, Lu Y, Xu Y, et al. Unique characteristics of CpG island methylator phenotype (CIMP) in a Chinese population with colorectal cancer. *BMC Gastroenterology* 2019;19:173
- 159 Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetzis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008 May;7(3):179-96.
- 160 S. Ogino, K. Nosho, G. Kirkner, et al., CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer, *Gut* 58 (1) (2009) 90–96
- 161 J. Liu, L. Tang, J. Yi, et al., Unique characteristics of CpG island methylator phenotype (CIMP) in a Chinese population with colorectal cancer, *BMC Gastroenterol.* 19 (1) (2019) 173.
- 162 Tapial S, Olmedillas-López S, Rueda D, Arriba M, García JL, Vivas A, Pérez J, Pena-Couso L, Olivera R, Rodríguez Y, García-Arranz M, García-Olmo D, González-Sarmiento R, Urioste M, Goel A, Perea J. Cimp-Positive Status is More Representative in Multiple Colorectal Cancers than in Unique Primary Colorectal Cancers. *Sci Rep.* 2019 Jul 19;9(1):10516.
- 163 Advani SM, Advani P, DeSantis SM, Brown D, VonVille HM, Lam M, Loree JM, Mehrvarz Sarshekeh A, Bressler J, Lopez DS, Daniel CR, Swartz MD, Kopetz S. Clinical, Pathological, and Molecular Characteristics of CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Transl Oncol.* 2018 Oct;11(5):1188-1201.
- 164 Liu, J., Tang, L., Yi, J. et al. Unique characteristics of CpG island methylator phenotype (CIMP) in a Chinese population with colorectal cancer. *BMC Gastroenterol* 19, 173 (2019)
- 165 Advani SM, Advani P, DeSantis SM, Brown D, VonVille HM, Lam M, Loree JM, Mehrvarz Sarshekeh A, Bressler J, Lopez DS, Daniel CR, Swartz MD, Kopetz S. Clinical, Pathological, and Molecular Characteristics of CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Transl Oncol.* 2018 Oct;11(5):1188-1201.
- 166 Kim JH, Bae JM, Cho NY, Kang GH. Distinct features between MLH1-methylated and unmethylated colorectal carcinomas with the CpG island methylator phenotype: implications in the serrated neoplasia pathway. *Oncotarget.* 2016 Mar 22;7(12):14095-111. doi: 10.18632/oncotarget.7374.

-
- 167 Weisenberger D.J., Siegmund K., Campan M., Young J., I Long T., Faasse M., Kang G.H., Widschwendter M., Weener D., Buchanan D., et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 2006;38:787–793.
- 168 M. Toyota, M. Ohe-Toyota, N. Ahuja, J. Issa, Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2) (2000) 710–715.
- 169 S. Ogino, T. Kawasaki, G. Kirkner, et al., CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations, *J. Mol. Diagn.* 8 (5) (2006) 582–588.
- 170 Wang Y, Chen PM and Liu RB: Advance in plasma SEPT9 gene methylation assay for colorectal cancer early detection. *World J Gastrointest Oncol.* 10:15–22. 2018
- 171 Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, Valcz G, Leiszter K, Molnár B and Tulassay Z: The influence of methylated septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res.* 17:503–509. 2011
- 172 Wasserkort R, Kalmar A, Valcz G, Spisak S, Krispin M, Toth K, Tulassay Z, Sledziewski AZ and Molnar B: Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer.* 13:398,2013
- 173 Hu J, Hu B, Gui YC, Tan ZB and Xu JW: Diagnostic value and clinical significance of methylated SEPT9 for colorectal cancer: A meta-analysis. *Med Sci Monit.* 25:5813–5822. 2019
- 174 Sun J, Zheng M, Li Y and Zhang S: Structure and function of Septin 9 and its role in human malignant tumors. *World J Gastro Oncol.* 12:619–631. 2020
- 175 P.A. Jones, S.B. Baylin, The epigenomics of cancer, *Cell* 128 (2007) 683–692.
- 176 R. Wasserkort, A. Kalmar, G. Valcz, S. Spisak, M. Krispin, K. Toth, et al., Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island, *BMC Cancer* 13 (2013) 398.
- 177 Hariharan R, Jenkins M
Utility of the methylated SEPT9 test for the early detection of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy *BMJ Open Gastroenterology* 2020;7:e000355

ANEXO 1

Clasificación por estadios del CCR

El grado de invasión es una medida de la progresión tumoral, correlacionado con una menor supervivencia y condicionando el tratamiento. Por ello, es necesaria la existencia de un sistema de clasificación que acote la progresión tumoral del CCR en diferentes etapas o estadios en base a criterios concretos. Actualmente, tras diferentes ampliaciones y modificaciones de clasificaciones anteriores, se utiliza el sistema propuesto por la American Joint Committee on Cancer (AJCC)¹⁷⁷.

La octava edición del sistema de estadificación del AJCC se implementó a nivel mundial en el 2018, e incluyó cambios significativos para los pacientes con CCR en estadio IV¹⁷⁷. El sistema propuesto, TNM, describe el grado de invasión del CCR en base al desarrollo o afectación del propio tumor primario (T), de los nódulos linfáticos (N) y de la presencia o no de metástasis (M).

Tumor primario (T):

Tx	no se puede evaluar el tumor primario
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	carcinoma <i>in situ</i> , limitado a la lámina propia intraepitelial o invasiva
T1	Tumor que invade la submucosa
T2	Tumor que invade la muscularis
T3	Tumor que penetra la muscularis y llega al tejido adiposo colorrectal
T4	Tumor que invade directamente otros órganos o estructuras
T4a	Tumor penetrante peritoneo visceral

T4b Tumor que invade o se adhiere directamente a otros órganos o estructuras

Ganglios linfáticos regionales (N)

Nx no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales

N0 sin metástasis en ganglios linfáticos y sin DT (deposito tumoral)

N1 metástasis en 1-3 ganglios linfáticos

N1a: 1 metástasis en ganglios linfáticos

N1b: metástasis en 2-3 ganglios linfáticos

N1c: aunque no hubo metástasis en los ganglios linfáticos regionales, los DT fueron tejido paracolorrectal submucoso, mesangial o cubierto de peritoneo.

N2: más de o igual a 4 metástasis en ganglios linfáticos

N2a: 4-6 metástasis en ganglios linfáticos regionales

N2b: más de o igual a 7 metástasis en ganglios linfáticos

Metástasis distante (M):

MX: no es posible medir la metástasis.

M0: el cáncer no se diseminó a otras partes del cuerpo.

M1: hay metástasis en ganglios linfáticos distantes

M1a: la metástasis se limita a un órgano o sitio (p. ej., metástasis en hígado, pulmón, ovario y ganglios linfáticos extrarregionales)

M1b: Transferir más de un órgano o sitio¹

M1c: metástasis peritoneales con o sin metástasis de otros órganos

El sistema TNM ayuda a describir el cáncer en mucho detalle, pero para muchos tipos de cánceres las combinaciones de TNM se agrupan en cinco estadios más generales. (tabla XXXX, Figura XXX).

8ª edición			
Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-4a	N1/N1c	M0
	T2-3	N2a	M0
	T1-2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-4a	N2b	M0
	T4b	N1-2	M0
IVA	Any T	Any N	M1a
IVB	Any T	Any N	M1b
IVC	Any T	Any N	M1c

ANEXO 2

Vital M, Vergara C, Carusso F, Neffa F, Valle AD, Esperón P. Analysis of MLH1 promoter methylation by different methods in colorectal tumors. Japanese J Gastroenterol Res. 2022; 2(15): 1123. www.doi.org/10.52768/jjgastro/1123

Research Article

Open Access, Volume 2

Analysis of MLH1 promoter methylation by different methods in colorectal tumors

Marcelo Vital^{1,2}; Carolina Vergara³; Florencia Carusso³; Florencia Neffa³; Adriana Della Valle³; Patricia Esperón^{2,3,4*}

¹Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

²Molecular Genetics Unit, School of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

³Uruguayan Collaborative Group, Dirección Nacional de Sanidad de las FFAA, Montevideo, Uruguay.

⁴Latin American Network for Implementation and Validation of Clinical Pharmacogenomics Guidelines (RELIVAF-CYTED), Madrid, Spain.

***Corresponding Author: Patricia Esperón**

Molecular Genetics Unit, School of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
Tel: 5982-9242426; Email: pesperon@fq.edu.uy

Abstract

Colorectal Cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related death worldwide, affecting both men and women. A genetic CRC characteristic is the presence of microsatellite instability (MSI). This instability could result from the inactivation of the Mismatch Repair (MMR) system by either MMR gene mutations, or MMR gene promoter hypermethylation, mainly in the *MLH1* gene promoter. Lynch Syndrome (LS), the most common form of hereditary colorectal cancer, is caused by germline mutations in MMR genes. When a tumor has a high MSI, prior to the germline genetic study of Lynch Syndrome, a methylation study is recommended to rule out the diagnosis of sporadic colorectal cancer. The *MLH1* gene promoter methylation status of sixty-three MSI colon tumors and ten normal colon tissues using different techniques was evaluated. DNA sequencing, Real-Time PCR-High Resolution Melting (PCR-HRM), methylation-specific-PCR, Combined Bisulphite Restriction Analysis (COBRA) and Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA) techniques were tested. The same ten MSI samples were found to be methylated using any of the four techniques. Since all the methods similarly evaluated the *MLH1* methylation status, which one to choose would depend on the convenience and availability of each laboratory. After our evaluation based on the main advantages (short turnaround time, high throughput, sensitivity, and ease of performance), we concluded that PCR-HRM was the most convenient screening method for the *MLH1* methylation study.

Keywords: Colorectal cancer; *MLH1* promoter.

Received: Nov 04, 2022

Accepted: Dec 07, 2022

Published: Nov 14, 2022

Archived: www.jjgastro.com

Copyright: © Esperón P (2022).

Introduction

Colorectal Cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related death worldwide, affecting both men and women [1,2]. Several risk factors are associated with an increased risk for CRC, some are modifiable (e.g., obesity; diet; long-term smoking), others hereditary (e.g. Lynch Syndrome or familial adenomatous polyposis) [3].

CRC results from the progressive accumulation over time of morphological, genetic and epigenetic changes that lead to the transformation from normal colonic epithelial cells to colon adenocarcinoma cells [4]. Some pathways can contribute to the carcinogenic process, e.g., Chromosomal Instability (CIN), microsatellite instability (MSI) or CpG island methylator phenotype (CIMP) [5]. CIN is the most common CRC pathway and consists of karyotypic abnormalities and an accumulation of a characteristic set of mutations in specific tumour suppressor genes and oncogenes [6]. MSI is a result of genetic instability in short nucleotide repeats that occurs spontaneously during DNA replication due to a defective DNA mismatch repair (MMR) system. Lynch Syndrome (LS), the most common form of hereditary CRC (3-5%), is mainly due to germline mutations in MMR genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2*) and more than 90% of tumours are MSI-High (MSI-H) [7,8]. The CIMP phenotype is due to gene promoter hypermethylation in CpG dinucleotide regions causing gene expression silencing. The bulk of MSI-H tumours are sporadic and only 15% have a hereditary origin.

10-15% of sporadic CRCs shows MSI-H being mainly due to epigenetic silencing of *MLH1* gene [9]. The methylation of regions C and D located in *MLH1* gene promoter (figure 1) was correlated to the absence of protein expression [10,11].

A large number of DNA methylation profiling techniques have been described. Most are PCR-based techniques, such as methylation-specific-PCR (MS-PCR) [9], real-time-PCR [12], Combined Bisulphite Restriction Analysis (COBRA) [13] or Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA) [14]. Bisulphite DNA sequencing method developed by Clark et al [15], is considered the gold standard for methylation analysis [16]. Most methods include a DNA modification treatment with sodium bisulphite before any further amplification round.

The aim of this study was to evaluate the performance of five methods (DNA sequencing, PCR-HRM, MS-PCR, COBRA and MS-MLPA) for the analysis of *MLH1* gene promoter methylation in MSI-High CRC tumours.

Material and methods

Samples and DNA isolation

Tumors DNA from 63 colorectal cancer patients were included. All tumors were classified as MSI-H by PCR using the Bethesda reference panel of microsatellites. Tumors were defined as MSI-H when at least two or more markers were positive [17]. When formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples were analyzed (42 samples), one or two 5µm sections were treated with xylene and ethanol before a proteinase K digestion, previous to the DNA purification using the QIAamp DNA FFPE Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer instructions (yield 10 to 40 ng/µL).

For the 21 frozen tissues tumors (starting amount <10mg), the PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used (yield 70 to 120 ng/µL). DNA concentration was quantified using a NanoDrop 2000c spectrophotometer. A control group of 10 normal tissues was also analyzed.

This study was approved by the Institutional Bioethical Board. Study procedures were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Informed consent was obtained from all individuals included in this study.

DNA bisulphite conversion

Bisulphite conversion was performed using the EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) following the manufacturer's protocol.

The sodium bisulphite treatment consists of a two-step reaction. First, the sulfonation at C-6 position of the cytosine produces a cytosine sulfonate that then became an uracil sulfonate by hydrolytic deamination. Finally, the removal of the sulfonate group, under alkaline conditions, leads to the conversion into uracil. If the CpG site is methylated, the methyl group at C-5 position blocks the sulphonate cytosine formation. In short, after the sodium bisulphite treatment, unmethylated cytosines converted into uracil, while methylated cytosines remain intact.

DNA sequencing

The bisulphite-modified DNA was amplified using two rounds of PCR with nested primers (table 1). The first PCR round was done in 1X PCR buffer, 0.2 µM of each primer, 0.8 nM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl₂, 1 µL of modified genomic DNA, and 0.3 U of Hot Start DNA polymerase (Promega) in a final volume of 10 µL. A second amplification with 1 µL of DNA obtained from the first round was carried out with the same reagents but with 2 mM of MgCl₂ final concentration.

The thermal cycler program was set up as: 95°C for 5 minutes, 40 cycles of 95°C 30 sec, 52°C 30 sec, 72°C 30 sec, with a final extension for 5 min at 72°C.

PCR products were purified from 2% agarose gels using a commercial kit (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Valencia, USA).

Purified fragments were sequenced using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) and the ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc., USA). Sequences were analyzed using BioEdit software (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

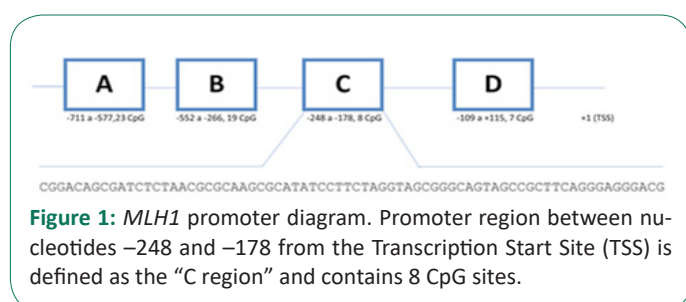


Table 1: PCR primers list. Primers used in bisulphite DNA sequencing, PCR-HRM and COBRA assays.

Name	Sequence	Length (bp)
C-FE	TAGGGTTAACGTTAGAAAGGTCGTAAGG	544
C-RE	ATAACATTAACCTACCGCTAATAACTT	
C-FI	AAAGGTCGTAAGGGGAGAGGAGGAGTT	
C-RI	AACCTACGCCATCAACCCACCCTTC	336

PCR-HRM

This technique was carried out in a Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen, USA). The bisulphite-modified DNA was first amplified with primers C-FE and C-RE (Table 1). The second amplification round was set up with 0.7 μ M of each primer [18], with 1 μ L of DNA template obtained from the first round of PCR (544bp), in a master mix (Type IT HRM kit, Qiagen, Valencia, CA, USA). The optimized thermal cycling conditions included an initial hold at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 10s, 55°C for 15 s and 72°C for 10 s. The subsequent HRM analysis was performed with a continuous fluorescence acquisition mode from 73°C to 80°C at a ramp rate of 0.1°C/s.

MS-PCR

The bisulphite-modified DNA was amplified using primers specific for both methylated and unmethylated sequences [19]. Primers were designed with at least one CpG dinucleotide placed at the 3' end to maximize the discrimination between both alleles. Fragments of 91bp or 102bp length were expected for the methylated or unmethylated alleles, respectively.

COBRA

After DNA amplification (see section 2.3) PCR products were digested with the BstUI restriction enzyme (New England Biolabs) that cleaves CGCG sites. Digested PCR products were analyzed on 6% polyacrylamide gels by silver nitrate staining.

MS-MLPA

The SALSA MS-MLPA Probemix ME011-C1 kit MMR genes (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) was performed as described by the manufacturer. 50-100 ng of genomic DNA was required. Fragments were analysed in an ABI 3500 System and the Coffalyser. Net software was used for data analysis.

All experiments were conducted in duplicate.

Results

Four different methods were employed to evaluate the *MLH1* promoter methylation status of DNA obtained from both FFPE and frozen tissues.

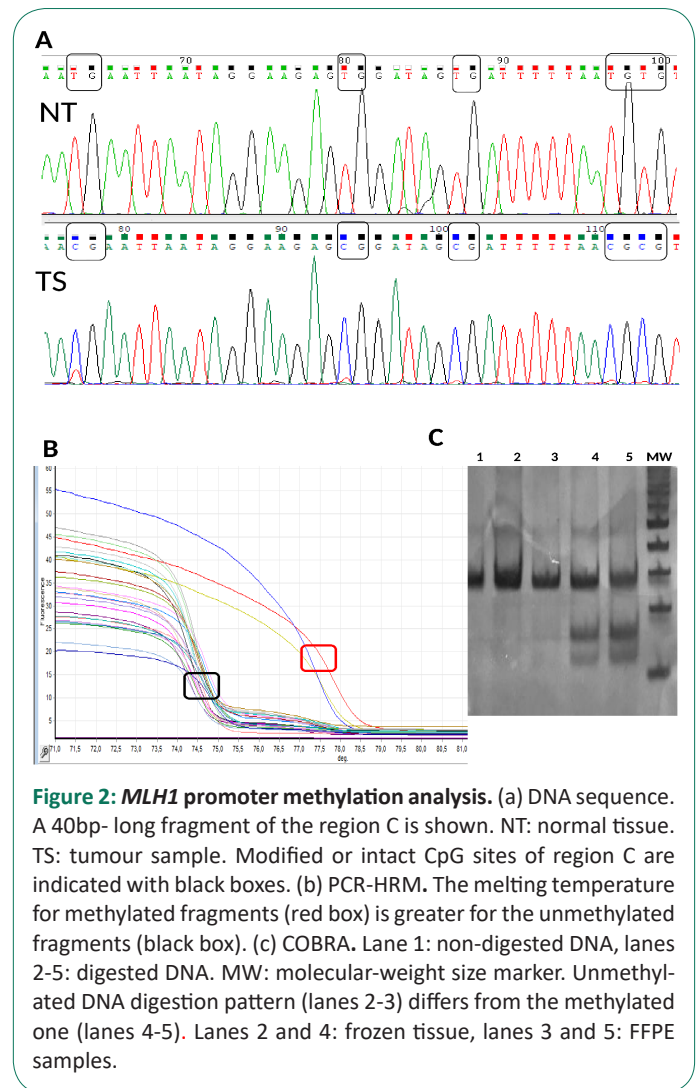
After the DNA sequencing, the electropherogram showed full conversion of cytosine into thymine or an unchanged cytosine pattern at CpG sites from normal or tumour samples, respectively (Figure 2a). The PCR-HRM melting curves analysis showed different melting temperatures for methylated and unmethylated fragments, which allowed their discrimination (Figure 2b). Fragments that kept methylated cytosine, showed a greater melting temperature than unmethylated fragments in which cytosine was converted into thymine. The COBRA assay allowed fully differentiate DNA methylation since methylated fragments maintained the CGCG motif and were digested by BstUI enzyme (Figure 2c, lanes 4 and 5). MS-MLPA only amplified by PCR those fragments from methylated regions that could not be digested

by the methylation-sensitive HhaI restriction enzyme (Figure 3). These last three methods were validated using methylated and non-methylated DNA samples, previously checked by DNA sequencing.

We found that methylated samples showed the expected profile curve at the PCR-HRM output, agreed with the methylation profile in the COBRA assay, and showed the predicted fragments in the MS-MLPA electropherograms.

These methods were performed successfully and harmonized results were obtained. Unfortunately, non-conclusive results were obtained with the MS-PCR technique.

In most cases (80%) biallelic methylation of *MLH1* gene promoter was found. The heterozygosity pattern found in some samples is surely due to the coexistence of tumoral and normal cells.



Discussion

In this work, we evaluated the performance of DNA sequencing, PCR-HRM, COBRA, and MS-MLPA methods for the *MLH1* promoter methylation study of DNA samples obtained from both FFPE and frozen tissues.

A strength of this work was to obtain good-quality DNA from FFPE blocks that can subsequently be modified by bisulphite and amplified. Otherwise, DNA degradation would have made amplification difficult after bisulphite treatment.

The main advantage of DNA sequencing is that provides

information on the methylation status of each CpG sites. However, like all sequencing technologies, the whole process requires a laborious protocol and a DNA sequencer. In addition, further bioinformatics analysis must be performed, that lead to a longer turnaround time.

COBRA is easily manipulated, only requires PCR reagents and equipment that can be found in any molecular biology laboratory.

Although MS-MLPA does not require sodium bisulphite treatment, a discrimination based on the methylation-sensitive HhaI enzyme is used. It involves multiple manipulation steps, a capillary electrophoresis device, and specific software for data analysis. Moreover, this assay evaluates the methylation profile of some other MMR genes, BRAFV600E among other gene variant analysis. The PCR-HRM assay can be implemented in resource-limited laboratories, and requires less laboratory working time than any of the techniques evaluated. Main advantages such as the absence of manual post-PCR treatment, a complete process in a closed-tube in a Real-Time thermal cycler, short turnaround time, high throughput, and quick analysis, make this assay, in our opinion, the most convenient screening method.

Conclusion

CRC tumours with *MLH1* promoter hypermethylation have almost certainly a sporadic origin and excludes LS. Therefore, to determine the *MLH1* methylation profile, a reliable technique must be performed. PCR-HRM, COBRA, MS-MLPA and DNA sequencing methods evaluated similarly the *MLH1* methylation status. Then, which of the technique to choose will depend on the equipment and reagent availability, turnaround time, number of samples to be analysed, as well as staff laboratory skills.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin*. 2018; 68: 394-424.
2. Vaccaro CA, Sarroca C, Rossi B, Lopez-Kostner F, Dominguez M, et al. Lynch syndrome in South America: past, present and future. *Fam Cancer*. 2016; 15: 437-445.
3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta, GA: American Cancer Society.
4. Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer*. 2016; 35: 4.
5. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int J Mol Sci*. 2013; 14: 16365-16385.
6. Pino N, Chung D. The chromosomal instability pathway in colon-cancer. *Gastroenterol*. 2010; 138: 2059-2072.
7. Duraturo F, Liccardo R, De Rosa M, Izzo P. Genetics, diagnosis and treatment of Lynch syndrome: Old lessons and current challenges. *Oncol Lett*. 2019; 17: 3048-3054.
8. Bacher J, Sievers Ch, Albrecht D, Grimes I, Weiss J, et al. Improved Detection of Microsatellite Instability in Early Colorectal Lesions. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0132727.
9. Herman J, Umar A, Polyak K, Graff J, Ahuja N, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 6870-6875.
10. Deng G, Chen A, Hong J, Chae H, Kim Y. Methylation of CpG in a Small Region of the hMLH1 Promoter Invariably Correlates with the Absence of Gene Expression. *Cancer Res*. 1999; 59: 2029-2033.
11. Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Sleisenger M, et al. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2002; 86: 574-579.
12. Eads CD, Danenberg K, Kawakami K, Saltz L, Blake C, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28: E32.
13. Xiong Z, Laird P. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25: 2532-2534.
14. Nygren A, Ameziane N, Duarte H, Vijzelaar R, Waisfisz Q, et al. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33: e128.
15. Clark S, Harrison J, Paul C, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22: 2990-2997.
16. Li Q, Hermanson P, Springer N. Detection of DNA methylation by whole-genome bisulphite sequencing. In *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc. 2018; 185-196.
17. Murphy KM, Zhang S, Geiger T, Hafez MJ, Bacher J, et al. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *J Mol Diagn*. 2006; 8: 305-311.
18. Gausachs M, Mur P, Corral J, González S, Benito L, et al. MLH1 promoter hypermethylation in the analytical algorithm of Lynch syndrome: a cost-effectiveness study. *Eur J Hum Genet*. 2012; 20: 762-768.
19. Grady W, Rajput A, Lutterbaugh J, Markowitz S. Detection of Aberrantly Methylated hMLH1 Promoter DNA in the Serum of Patients with Microsatellite Unstable Colon Cancer. *Cancer Res*. 2001; 61: 900-902.

ANEXO 3

Vital M, Carusso F, Vergara C, Neffa F, Della Valle A, Esperón P. Genetic and epigenetic characteristics of patients with colorectal cancer from Uruguay. *Pathol Res Pract*. 2023 Jan;241:154264. doi: 10.1016/j.prp.2022.154264. Epub 2022 Dec 6. PMID: 36495761.



Genetic and epigenetic characteristics of patients with colorectal cancer from Uruguay

Marcelo Vital^a, Florencia Carusso^b, Carolina Vergara^b, Florencia Neffa^b, Adriana Della Valle^b, Patricia Esperón^{a,b,c,*}

^a Molecular Genetic Unit, School of Chemistry, Universidad de la República, General Flores 2124, CP1800 Montevideo, Uruguay

^b Uruguayan Collaborative Group, Dirección Nacional de Sanidad de las Fuerzas Armadas, 8 de Octubre 3020, CP1600 Montevideo, Uruguay

^c Latin American Network for Implementation and Validation of Clinical Pharmacogenomics Guidelines (RELIVAF-CYTED), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Colorectal cancer
Epigenetics
KRAS
BRAF
NRAS
PIK3CA

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC), the 3rd most frequent cancer worldwide, affects both men and women. This pathology arises from the progressive accumulation of genetic and epigenetic alterations. In this study, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, and *BRAF* gene mutations, mismatch repair (MMR) genes methylation profile, microsatellite instability (MSI) and CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) status were assessed. The associations of these molecular features with clinicopathological data were also investigated. A hundred and eight unselected CRC samples and their histological and clinical data, were gathered between 2017 and 2020. The prevalence of *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* gene mutations was similar to that described in other populations. 28.7% of tumors were *KRAS*-mutated, mostly in men, distal location, with a CIMP-negative status. *BRAF*V600E frequency was 6.5% and associated with MSI ($p = 0.048$), *MLH1*-methylated ($p < 0.001$) and CIMP-High ($p < 0.001$) status. We also confirmed that *BRAF*V600E tumors were more prevalent in older women and proximal location. A striking different result was the lack of most common variants in the *PIK3CA* gene. A complete absence of *PIK3CA*-mutated tumors in a population has not been previously reported. Among MMR genes, the only with an aberrant methylation pattern was *MLH1* gene. Its frequency was 9.25%, lower than previously reported. Methylated tumors were most frequent in patients older than 70 years old and proximal tumor location. Finally, CIMP-High status was mainly observed in moderately differentiated tumors with a rate of 15.7%. Our findings were consistent with previous reports in other populations, but also showed some features unique to our cohort. This study is the first to report the analysis of a large number molecular biomarkers of CRC in Uruguay and one of the few performed in Latin-America.

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequent cancer worldwide. It is the second leading cause of cancer-related death, affecting both men and women [1]. CRC represents, in Uruguay, the 2nd and 3rd cause of cancer death in women and men, respectively [2].

CRC is a molecularly heterogeneous disease. It is a consequence of the progressive accumulation of morphological, genetic, and epigenetic changes that drive to the transformation from normal colonic epithelial cells to an adenocarcinoma cancer [3].

Three pathways contribute to the carcinogenic process: chromosomal instability (CIN), microsatellite instability (MSI) and CpG island

methylation pathway [4].

CIN is the most common CRC pathway and consists of karyotype abnormalities and an accumulation of a characteristic set of variants in specific tumor suppressor genes and oncogenes [5].

MSI is a result of genetic instability in short nucleotide repeats that occurs during DNA replication due to a defective DNA mismatch repair (MMR) system. MSI is a hallmark of Lynch Syndrome (LS), mainly caused by germline inactivating variants in the MMR genes. However, MSI is also detected in sporadic CRCs, mainly due to hypermethylation of the *MLH1* gene promoter [6].

The CpG island methylation pathway consists in an extensive aberrant promoter hypermethylation of several tumor suppressor genes or

* Correspondence to: General Flores 2124, CP:11800 Montevideo, Uruguay.

E-mail addresses: mvital@fq.edu.uy (M. Vital), florencia.carusso@gmail.com (F. Carusso), carovergara@vera.com.uy (C. Vergara), floneffa@gmail.com (F. Neffa), adrianadellav@gmail.com (A. Della Valle), pesperon@fq.edu.uy (P. Esperón).

<https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154264>

Received 21 October 2022; Received in revised form 2 December 2022; Accepted 3 December 2022

Available online 6 December 2022

0344-0338/© 2022 Published by Elsevier GmbH.

other tumor-linked genes that drive to their transcriptional silencing and loss of function [7]. This pathway triggers the CpG island methylator phenotype (CIMP), considered a distinct molecular subtype of sporadic CRC.

Cell signaling deregulation transforms normal into cancer cells [8]. The intracellular mitogen-associated protein kinase (MAPK) signaling cascades are key pathways and respond to diverse extracellular stimuli and control a large number of fundamental cellular processes [9]. Variants in *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), *NRAS* (Neuroblastoma ras viral oncogene homolog), and *BRAF* (B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase) have been involved in CRC development by the abnormal activation of the ERK/MAPK pathway, an important downstream effector of epidermal growth factor receptor (EGFR). The PI3K/AKT pathway is an alternative intracellular signaling pathway up-regulated by *PIK3CA* (phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) gene variants [10]. RAS proteins regulate both, the ERK/MAPK and the PI3K/AKT pathways [11]. This forked system is constitutively activated by variants in *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, and *PIK3CA* genes leading to cell proliferation, differentiation and apoptosis inhibition [12]. At present, a constantly increasing number of these molecular markers have been translated to patient care management and contribute to the implementation of precision oncology medicine [13].

The aim of this work was to assess *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* and *PIK3CA* gene variants, microsatellite status, methylation profile of MMR genes and CIMP markers in 108 samples of patients with CRC. Moreover, we also examined the association between these molecular abnormalities and clinicopathological characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Samples

108 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples were included. Samples, histological and clinical data were gathered between 2017 and 2020 in the Tumor Bank of Uruguay.

The Bioethical Board of the School of Chemistry approved the study and is in accordance with the current version of the Helsinki Declaration. A signed informed consent was obtained from all individual participants.

2.2. Genomic DNA extraction

one or two 5 µm sections with more than 80% of tumor cells from FFPE blocks were treated with xylene, ethanol, and proteinase K. Then, DNA was extracted using the QIAamp DNA FFPE Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). DNA concentration was quantified in a NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer.

2.3. Microsatellite instability analysis

The microsatellite status was assessed as previously described by our group [14]. The international criteria used for tumor microsatellite classification is as follows: tumors that exhibit a high degree of MSI are considered when at least two or more markers are unstable (MSI-H); otherwise, they are considered stable markers (MSI-L/S).

2.4. *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* and *BRAF* variant screening

The screening was performed for clinical relevant variants in exon 2 (codons 12, 13), exon 3 (codons 59, 61), and exon 4 (codons 117, 146) of *KRAS* gene, exon 2 (codons 12, 13), and exon 3 (codons 59, 61) of *NRAS* gene and exons 9 and 20 of *PIK3CA* gene. Amplified fragments were analyzed by DNA sequencing in an ABI 3730xl System (Macrogen Inc service). All primer sequences are available upon request.

The *BRAF*V600E was analyzed using a TaqMan® Mutation Detection

Assay (Thermo Fisher Scientific, USA) in a Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen, USA) using the allelic discrimination interface. Both SALSA MS-MLPA Probemix assays employed in epigenetic studies also detect this variant (see below).

2.5. Epigenetic studies

SALSA MS-MLPA Probemix ME011 MMR, a semi-quantitative assay, provides information about the methylation pattern of four MMR genes (*MLH1*, *MSH2*, *PMS2* and *MSH6*).

SALSA MS-MLPA Probemix ME042-C1 CIMP, allows CIMP classification by quantifying DNA methylation in eight CIMP markers (*CACNA1G*, *CDKN2A*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* and *SOCS1* genes). Tumors with none methylated regions were classified as CIMP-0; those with 1–5/8 were classified as CIMP-low (CIMP-L) and with 6–8/8 as CIMP-H. The cut-off for scoring a probe as methylated was 20% (relative methylation of the sample when compared to a normal reference). MS-MLPA fragments were analyzed in an ABI 3500 System and the data analysis was performed with the Coffalyser.Net software.

2.6. Statistical analysis

For statistical analysis, cross tabs and the Pearson Chi-square test for discrete variables were evaluated using the SPSS software version 23.0. Comparisons of continuous variables were conducted using the t-test. Two-sided *P*-values below 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Demographic and clinicopathological characteristics

Patient age ranged from 32 to 92 years (mean 61.7 ± 13.7). The proportion of males was higher than females (56.5% vs 43.5%).

The analysis of the anatomical site revealed that the 37% of tumors were located at proximal colon, 35.2% at the distal colon, and 25.8% at the rectum. Neither the patient age nor the tumor location showed significant differences between men and women.

The histologic grade determination showed that 65.8% of tumors were moderately differentiated, while 27.7% were poorly differentiated.

Nearly half of patients had stage III tumors.

3.2. Analysis of the frequency of molecular markers and their statistical associations

3.2.1. *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* and *BRAF* variants

The prevalence of *KRAS* variants was 28.7%, with the highest variation rate in codon 12 (18.5%) followed by codon 13 (9.3%).

No variants in the *NRAS* or *PIK3CA* genes were observed in the 108 samples.

KRAS variants were observed similarly in both MSI groups: 14 in MSI-H and 17 in MSI-L/S. Although no statistical significance was found, a slightly tendency towards males, distal location, well-differentiated, and CIMP negative status was observed in *KRAS*-mutated tumors.

*BRAF*V600E was found with a frequency of 13% (7/54) and was only detected in MSI-H samples ($p = 0.016$). All *BRAF*V600E samples were *MLH1*-methylated, *KRAS* wildtype, proximal tumor location and mostly moderately differentiated. A significant association between *BRAF*V600E and CIMP-H ($p < 0.001$) was found.

3.2.2. Microsatellite status

MSI-L/S tumors were mainly within the distal location or rectum, and were moderately differentiated ($p < 0.001$). By contrast, MSI-H tumors were preferentially proximal tumor location and poorly or moderately differentiated.

Neither tumor location nor histologic grade showed any statistical

association with the microsatellite status. However, a statistical association between MSI-H and age lower than 70 years ($p = 0.006$) was observed.

3.2.3. MMR genes methylation profile

MLH1 was the only gene with an aberrant methylation pattern. The prevalence of methylation was 9.25%.

The mean age of patients with *MLH1*-methylated tumors (72.1 ± 8.35 yo) moved towards an older age compared to that of patients with *MLH1*-unmethylated tumors (60.6 ± 13.6 yo) ($p = 0.001$). All *MLH1*-methylated tumors were proximal location, while *MLH1*-unmethylated were mainly distal location. *MLH1* methylation status was statistically associated with both MSI-H ($p = 0.001$) and CIMP-H ($p < 0.001$) tumors.

3.2.4. CIMP status

CIMP-H was observed in 15.7% of tumors, while 49.1% were CIMP-L and 35.2% CIMP-0. However, when the microsatellite status was considered, these proportions changed. CIMP distribution among MSI-H samples was 31.5% CIMP-H, 46.3% CIMP-L, and 22.2% CIMP-0, while in the MSI-L/S group, it was 0% CIMP-H, 51.9% CIMP-L and 48.1% CIMP-0.

We observed that all CIMP-H tumors belong to the MSI-H group, while CIMP-negative tumors were found within both MSI-H (40.6%) and MSI-L/stable groups (59.4%). Mostly of CIMP-H tumors (80%) were moderately differentiated. Demographic, clinicopathological and molecular characteristics of tumors are shown in Table 1.

4. Discussion

The integration of genetic and/or epigenetic profiling with clinical data will be indispensable for improving precision medicine in oncologic patients in the near future. More precisely, CRC markers including *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* gene variants and microsatellite status have

Table 1
Demographic, tumor location, histopathological differentiation, disease stage and molecular characteristics of CRCs tumors.

Characteristics		Total (108) N (%)	MSI-H (54) N (%)	MSI-L/S (54) N (%)
Gender	F	47 (43.5)	24 (44.4)	23 (42.6)
	M	61 (56.5)	30 (55.6)	31 (57.4)
Age	≤50	27 (25)	19 (35.2)	8 (14.8)
	>50	81 (75)	35 (64.8)	46 (85.2)
Tumor location	Proximal colon	40 (37)	32 (59.2)	8 (14.8)
	Distal colon	38 (35.2)	14 (25.9)	24 (44.4)
Differentiation	Rectum	30 (25.8)	8 (14.8)	22 (40.7)
	Well-differentiated	7 (6.5)	0 (0)	7 (12.8)
	Moderately differentiated	71 (65.8)	26 (48.1)	45 (83.3)
	Poorly differentiated	30 (27.7)	28 (51.9)	2 (3.7)
Stage	I	9 (8.3)	3 (5.5)	6 (11.1)
	II	37 (34.3)	17 (31.5)	20 (37)
	III	53 (49.1)	31 (57.4)	22 (40.7)
	IV	9 (8.3)	3 (5.6)	6 (11.1)
MLH1	Unmethylated	98 (90.75)	44 (81.5)	54 (100)
	Methylated	10 (9.25)	10 (18.5)	0 (0)
BRAF	Wt	101 (93.5)	47 (87)	54 (100)
	V600E	7 (6.5)	7 (13)	0 (0)
KRAS	Wt	77 (71.3)	40 (74.1)	37 (68.5)
	G12D	10 (9.3)	5 (9.25)	5 (9.25)
	G12S	6 (5.6)	3 (5.5)	3 (5.5)
	G12C	3 (2.8)	1 (1.9)	2 (4.4)
	G12A	1 (0.9)	0 (0)	1 (1.9)
	G13D	10 (9.3)	4 (7.4)	6 (11.1)
	A146T	1 (0.9)	1 (1.9)	0 (0)
CIMP	High	17 (15.7)	17 (31.5)	0 (0)
	Low	53 (49.1)	25 (46.3)	28 (51.9)
	0	38 (35.2)	12 (22.2)	26 (48.1)

already been translated into patient care management, leading to higher responses and survival rates [15].

The present study aimed to describe and analyze the tumor molecular and clinicopathological characteristics as well as their possible relationships in Uruguayan patients with CRC. The cohort included 108 CRC samples from a 3.5 million inhabitant population, with a peculiar trihybrid genetic composition [16].

We found that *KRAS* variant frequency was 28.7%. This frequency value differs worldwide, from around 40% in Caucasians and Asians to 21% in Africans [17]. The most common *KRAS* variants were G12D and G13D, consistent with previous reports [18].

In our cohort, *KRAS* variants were more frequent in men and distal location. In contrast, a large study performed by Tong et al. showed that *KRAS*-mutated CRCs were more frequently observed in women and proximal location [19]. Besides, we found *KRAS* variants regardless the CRC microsatellite status (25.9% in MSI-H and 31.5% in MSI-L/S), similarly to previous reports [20].

The possible association between *KRAS* variants and CIMP status remains unclear. Some studies showed that *KRAS* variants were associated with CIMP-L, while others described an association with CIMP-H [21,22]. In our study a tendency toward CIMP-L was found, but this association did not reach a statistical significance.

NRAS variants are mainly located at codons 12–13 (exon 2) and 59–61 (exon 3) [23]. A large study reported that *NRAS* variants have a prevalence of 1–2% [24]. By contrast, in this work, no variants in *NRAS* gene were found.

Previous studies have shown that frequency of *BRAF*V600E is variable among populations. We found a frequency of 6.25% similar to that of other Latin American populations but different from Eastern or Western populations [25–27].

When analyzing the relationships between *BRAF*V600E and clinicopathological features, *BRAF* mutated tumors were described in older patients (> 60yo), high prevalent in women and proximal tumor location [28]. Although no statistical approach could be done due to the small number of patients, we found a similar tendency. In addition, we found that *BRAF* mutated tumors belonged to the MSI-H group ($p = 0.048$) and presented a *MLH1*-methylated status ($p < 0.001$), similar to previous reports [29]. This finding was consistent with the model proposed by Fang et al. in which tumor suppressor genes were transcriptionally silenced during cancer development. The authors showed that in *BRAF*-positive human CRC cell lines and tumors, the *MLH1* promoter was hypermethylated, leading to MMR deficiency and resulting in MSI-H [30].

Moreover, none of the *BRAF*V600E was *KRAS*-mutated, consistent with previous reports showing that both variants were mutually exclusive [31].

Another critical player in colorectal carcinogenesis, and one of the most frequently mutated gene in cancer, is the *PIK3CA* gene [32]. More than 80% of *PIK3CA* gene variants were described in two hotspots, the helicase domain (codons 542 and 545) and the kinase domain (codon 1047) [33]. The prevalence of these variants was reported from 10% to 20% among different populations [34]. It turned out striking that no variants in the *PIK3CA* gene were found in our cohort.

Although CIMP status has been recognized as a hotspot research topic in CRC, there is still no consensus on CIMP definition concerning the best gene panel or cut-off values. Different gene panels allow to classify CIMP tumors according to the number of methylated genes in three categories: CIMP-H, CIMP-L or CIMP-0. We found that the rate of CIMP-H among MSI-H tumors was 31.5%, which differed from values reported in American or Asian population (73% and 10.2%, respectively) [26,27]. These differences could be explained not only by our different ethnic composition, but also by the CIMP gene panels or quantification technologies employed [35].

It was reported that CIMP-H showed an association with MSI-H, *BRAF* variant, and poor differentiation characteristics [36]. In our cohort, an association between CIMP-H tumors, MSI-H and *BRAF*V600E

was found, but mainly (80%) in moderately differentiated tumors.

In our work, *MLH1*-methylated tumors were found with a frequency of 9.25%, quite lower than the described in other populations [37]. *MLH1*-methylated tumors showed a tendency towards older age at CRC onset (72.1 vs 60.6yo), proximal tumor location and *BRAF*V600E variant as found in a large multicenter study reported by Levine et al. [38]. To rule out a hereditary methylation pattern, normal tissue from patients with *MLH1*-methylated tumors was also analyzed but no methylation was found (data not shown). Although *BRAF* variant testing has been considered the more advantageous genetic testing in the algorithm for Lynch Syndrome [39], of our results *MLH1* methylation analysis turned out more sensitive. In our opinion, it is more advantageous to always perform the *MLH1* methylation analysis before the patient incorporation into a LS germline gene panel study.

As previously reported, the 100% of CIMP-H tumors that were *MLH1*-methylated and *BRAF*V600E belonged to the MSI-H group [40]. This group also included 57.4% of stage III tumors as well as 59.2% located in proximal colon. By contrast, MSI-L/S tumors were mainly distal location, moderately differentiation, *BRAF* wild type and unmethylated.

Although a group of 108 tumor samples could represent the three and a half million Uruguayan inhabitants, the study's main limitation was the low statistical power due to the small sample size divided into subgroups, which sometimes made statistical analysis impossible.

We believe this work will provide more information on the genetic basis of CRC and contribute to a better understanding of the disease, which could translate into more suitable treatment decision-making.

5. Conclusions

This study reports, for the first time, the analysis of an extensive number of genetic and/or epigenetic CRC features in a Uruguayan population. Moreover, it is one of few studies on molecular markers in CCR performed in Latin-America. While most of the findings were consistent with previous reports in other populations, some of them turned out to be unique to our cohort.

CRedit authorship contribution statement

Adriana Della Valle and Patricia Esperón: Conception and Design. **Marcelo Vital:** Methodology and Data analysis, Writing – original draft. **Florencia Carusso, Florencia Neffa and Carolina Vergara:** Sample preparation, Data collection. **Patricia Esperón:** Writing – review & editing, Supervision. All authors reviewed the manuscript.

Declarations of interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Uruguay: VUSP_2017_ID125.

References

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, et al., Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 71 (3) (2021) 209–249.
- [2] (<https://www.comisioncancer.org.uy/home>) Accessed: June 2022.
- [3] H. Yamagishi, H. Kuroda, Y. Imai, et al., Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers, *Chin. J. Cancer* 35 (2016) 4.
- [4] D. Colussi, G. Brandi, F. Bazzoli, et al., Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (8) (2013) 16365–16385.
- [5] N. Pino, D. Chung, The chromosomal instability pathway in coloncancer, *Gastroenterology* 138 (6) (2010) 2059–2072.
- [6] J. Leclerc, C. Vermaut, M.P. Buisine, Diagnosis of Lynch syndrome and strategies to distinguish Lynch-related tumors from sporadic MSI/dMMR tumors, *Cancers* 13 (3) (2021) 467.
- [7] M. Toyota, N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, et al., CpG island methylator phenotype in colorectal cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (15) (1999) 8681–8686.
- [8] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* 100 (2000) 57–70.
- [9] A. Plotnikov, E. Zehorai, S. Procaccia, et al., The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation, *BBA* 1813 (9) (2011) 1619–1633.
- [10] T. Hamada, J.A. Nowak, S. Ogino, PIK3CA mutation and colorectal cancer precision medicine, *Oncotarget* 8 (14) (2017) 22305–22306.
- [11] J. Downward, Targeting RAS and PI3K in lung cancer, *Nat. Med.* 14 (2008) 1315–1316.
- [12] F. Ciardiello, G. Tortora, EGFR antagonists in cancer treatment, *N. Engl. J. Med.* 358 (11) (2008) 1160–1174, 13.
- [13] F. Di Nicolantonio, P.P. Vitiello, S. Marsoni, et al., Precision oncology in metastatic colorectal cancer - from biology to medicine, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8 (8) (2021) 506–525.
- [14] A. Della Valle, F. Neffa, P. Esperon, et al., Impact of microsatellite instability in colon cancer, *J. Cancer Sci. Ther.* 11 (2019) 295–298.
- [15] A. Benson, A. Venook, M. Al-Hawary, et al., Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology, *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 9 (3) (2021) 329–359.
- [16] M. Sans, F. Salzano, R. Chakraborty, Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems, *Hum. Biol.* 69 (1997) 161–170.
- [17] M. Cefali, S. Epistolio, M. Palmrocchi, et al., Research progress on KRAS mutations in colorectal cancer, *J. Cancer Metastas. Treat.* 7 (2021) 26.
- [18] H. Sanchez-Ibarra, X. Jiang, E. Gallegos-Gonzalez, et al., KRAS, NRAS, and BRAF mutation prevalence, clinicopathological association, and their application in a predictive model in Mexican patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective cohort study, *PLoS One* 15 (7) (2020), e0235490.
- [19] J. Tong, R. Lung, F. Sin, et al., Characterization of rare transforming KRAS mutations in sporadic colorectal cancer, *Cancer Biol. Ther.* 15 (6) (2014) 768–776.
- [20] C. Oliveira, S. Velho, C. Moutinho, et al., KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression, *Oncogene* 26 (1) (2007) 158–163.
- [21] M. Toyota, M. Ohe-Toyota, N. Ahuja, J. Issa, Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2) (2000) 710–715.
- [22] S. Ogino, T. Kawasaki, G. Kirkner, et al., CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations, *J. Mol. Diagn.* 8 (5) (2006) 582–588.
- [23] W. De Rooch, B. Claes, D. Bernasconi, et al., Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis, *Lancet Oncol.* 11 (8) (2010) 753–762.
- [24] C. Vaughn, S. Zobel, L. Furtado, et al., Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer, *Genes Chromosomes Cancer* 50 (5) (2011) 307–312.
- [25] J. Hernández-Sandoval, M. Gutiérrez-Angulo, M. Magaña-Torres, et al., Prevalence of the BRAF p.V600E variant in patients with colorectal cancer from Mexico and its estimated frequency in Latin American and Caribbean populations, *J. Invest. Med.* 68 (5) (2020) 985–991.
- [26] S. Ogino, K. Nishio, G. Kirkner, et al., CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer, *Gut* 58 (1) (2009) 90–96.
- [27] J. Liu, L. Tang, J. Yi, et al., Unique characteristics of CpG island methylator phenotype (CIMP) in a Chinese population with colorectal cancer, *BMC Gastroenterol.* 19 (1) (2019) 173.
- [28] G. Fanelli, C. Dal Pozzo, I. Depetris, et al., The heterogeneous clinical and pathological landscapes of metastatic Braf-mutated colorectal cancer, *Cancer Cell Int.* 20 (2020) 30.
- [29] W. Fernando, M. Miranda, D. Worthley, et al., The CIMP phenotype in BRAF mutant serrated polyps from a prospective colonoscopy patient cohort, *Gastroenterol. Res. Pract.* 2014 (2014), 374926.
- [30] M. Fang, J. Ou, L. Hutchinson, et al., The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG island methylator phenotype, *Mol. Cell* 55 (6) (2014) 904–915.
- [31] H. Rajagopalan, A. Bardelli, C. Lengauer, et al., Tumorigenesis: RAS/RAS oncogenes and mismatch-repair status, *Nature* 418 (2002) 934.
- [32] G. Mendiratta, E. Ke, M. Aziz, et al., Cancer gene mutation frequencies for the U.S. population, *Nat. Commun.* 12 (2021) 5961.
- [33] R. Madsen, B. Vanhaesebroeck, R. Semple, Cancer-associated PIK3CA mutations in overgrowth disorders, *Trends Mol. Med.* 10 (2018) 856–870.
- [34] J. Jin, Y. Shi, S. Zhang, et al., PIK3CA mutation and clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and Meta-Analysis, *Acta Oncol.* 59 (1) (2020) 66–74.
- [35] S. Advani, P. Advani, D. Brown, et al., Global differences in the prevalence of the CpG island methylator phenotype of colorectal cancer, *BMC Cancer* 19 (2019) 964.
- [36] S. Advani, M. Swartz, J. Loree, et al., Epidemiology and molecular-pathologic characteristics of CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer, *Clin. Colorectal Cancer* 20 (2) (2021) 137–147, e1.
- [37] X. Li, X. Yao, Y. Wang, et al., MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features, *PLoS One* 8 (3) (2013), e59064.

- [38] A. Levine, A. Phipps, J. Baron, et al., Clinicopathologic risk factor distributions for MLH1 promoter region methylation in CIMP-positive tumors, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 25 (1) (2016) 68–75.
- [39] M. Jin, H. Hampel, X. Zhou, et al., BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome, *Am. J. Clin. Pathol.* 140 (2) (2013) 177–183.
- [40] J. Kim, J. Bae, N. Cho, et al., Distinct features between MLH1-methylated and unmethylated colorectal carcinomas with the CpG island methylator phenotype: implications in the serrated neoplasia pathway, *Oncotarget* 7 (12) (2016) 14095–14111.

AGRADECIMIENTOS

PEDECIBA-Química: por haberme brindado fondos para financiar materiales para el desarrollo de este trabajo (compra de material de laboratorio e informático), y para financiar la asistencia a congresos

CSIC: por haber financiado el proyecto con el que se comenzó este trabajo de tesis: “Inclusión del análisis epigenético en el algoritmo de identificación de Síndrome de Lynch”. Sector Productivo, 2017, Responsable: Dra. Patricia Esperón.

Banco de Tumores del Hospital Central de las FFAA: por haber aportado las muestras de tejido tumoral con las que realizamos este trabajo y por habernos facilitado los datos de las historias clínicas.