

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR EN INDIVIDUOS CON CÁNCER COLORRECTAL

CARLOS HUMBERTO AFANADOR AYALA

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas
con énfasis en Genética.

Tutor

Carlos Mario Muñetón Peña. Biólogo. MSc.
Profesor Titular
Unidad Genética Médica
Departamento de Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Antioquia

Comité tutorial

Alonso Martínez, Biólogo. MSc, PhD.
Gonzalo Vásquez, Biólogo. Esp citogenética, MSc
Gabriel Bedoya Berrio, Biólogo. MSc.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
CORPORACIÓN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
GRUPO GENÉTICA MÉDICA
FACULTAD DE MEDICINA

MEDELLÍN
JUNIO 2017

Dedicatoria

Especialmente y con todo el amor de mi corazón dedico este logro profesional a mis padres **Carlos Alberto Afanador Cáceres** y **Magda María Ayala Mendoza**, por brindarme su amor, por apoyar todos mis proyectos, por enseñarme que todo en la vida se logra con esfuerzo y trabajo duro, y por ser el pilar central de mi vida.

Agradecimientos

- A mi familia, especialmente a mis abuelos. Por su apoyo durante estos años y amor incondicional.
- A los profesores Carlos Mario Muñeton Peña y Gonzalo Vásquez Palacio por su dedicación, paciencia y apoyo académico, recibido durante este proceso formativo.
- A los compañeros de la Unidad de Genética Médica que me apoyaron durante este proceso, gracias por compartir parte de su tiempo y sus conocimientos.
- A los miembros del Comité Tutorial por sus consejos y valiosos aportes, de manera especial al profesor Alonso Martínez por el tiempo dedicado en las correcciones del texto.
- A los profesionales del área de la salud, que participaron como co-investigadores, por su colaboración en la recolección de las muestras.
- Al profesor Jorge Botero por su paciencia y ayuda en los análisis estadísticos.
- A los pacientes que participaron voluntariamente en esta investigación.

Tabla de Contenido

1. RESÚMEN.....	9
2. ABSTRACT	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. MARCO TEÓRICO	20
5.1 FACTORES DE RIESGO DEL CCR	21
5.2 BASES MOLECULARES DEL CANCER COLORECTAL.....	22
5.2.1 Vía de la inestabilidad cromosómica (CIN “ <i>Chromosomal Instability</i> ”).....	24
5.2.2 Vía de la Inestabilidad Microsatelital (MSI)	31
5.2.3 Vía Epigenética	33
6. OBJETIVOS.....	38
6.1 OBJETIVO GENERAL	38
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
7. MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1 TIPO DE ESTUDIO.....	39
7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	39
7.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	40
7.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	40
7.3 MUESTRA	40
7.4 EXTRACCIÓN DE ADN	41
7.5 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>APC</i> , <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> y <i>BRAF</i>	42
7.6 SECUENCIAMIENTO	46
7.7 ANALISIS DE INESTABILIDAD MICROSATELITAL (MSI)	46
7.9 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	50
8. RESULTADOS	52
8.1 CARACTERIZACION DE LA POBLACION DE ESTUDIO.....	52
8.2 CLASIFICACION HISTOPATOLOGICA DE LAS MUESTRAS TUMORALES	52
8.3 RESULTADOS MOLECULARES	54
8.3.1 ANALISIS MOLECULAR DEL GEN <i>APC</i>	58
8.3.2 ANALISIS MOLECULAR DEL GEN <i>KRAS</i>	60

8.3.3 ANALISIS MOLECULAR DEL GEN <i>TP53</i>	62
8.3.4 ANALISIS DE INESTABILIDAD MICROSATELITAL (MSI)	63
8.3.5 ANALISIS DE METILACION DEL PROMOTOR DEL GEN <i>MLH1</i>	67
9. DISCUSIÓN	73
10. CONCLUSIONES	92
11. PERSPECTIVAS	94
12. BIBLIOGRAFIA	95
13. ANEXOS	113

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los primers de los genes analizados y el tamaño en pares de bases (pb) del fragmento amplificado por PCR.

Tabla 2. Marcadores STRs y secuencia de primers utilizados para llevar a cabo el análisis de la inestabilidad microsatelital.

Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados para la amplificación de la región metilada y no metilada en el promotor del gen *MLH-1* en las muestras de CCR analizadas.

Tabla 4. Condiciones de la MS- PCR para el análisis de metilación en el promotor del gen *MLH-1* en las muestras de CCR analizadas.

Tabla 5. Descripción de los hallazgos histopatológicos y moleculares en los 44 pacientes con CCR estudiados.

Tabla 6. Estadio y TNM de las 38 muestras de CCR analizadas de acuerdo con el resultado histopatológico.

Tabla 7. Mutaciones identificadas en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en los 44 pacientes CCR analizados.

Tabla 8. Polimorfismos identificados en los tres genes evaluados en los 44 individuos con CCR.

Tabla 9. Distribución y frecuencia de la Inestabilidad Microsatelital por marcador STR en las 44 muestras de CCR analizadas.

Tabla 10. Distribución y frecuencia de los marcadores STRs inestables en las 12 muestras de CCR que presentaron MSI positiva.

Tabla 11. Descripción de las características de las 12 muestras de CCR con MSI+ y la relación con los hallazgos de mutaciones y de metilación en el gen *MLH1*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo clásico de la carcinogénesis colorrectal.

Figura 2. Metilación de la citosina en el carbono 5 mediante la enzima DNA metiltransferasa (DNMTs).

Figura 3. Productos amplificados por PCR para cada uno de los genes evaluados.

Figura 4. Polimorfismos identificados en el exón 15 del gen *APC* en muestras provenientes de personas con CCR.

Figura 5. Cromatograma que presenta los polimorfismos concomitantes identificados en el gen *TP53*.

Figura 6. Polimorfismo identificado en *KRAS* en muestras provenientes de personas con CCR.

Figura 7. Cromatogramas que muestran algunos ejemplos de mutaciones identificadas en el gen *APC* en muestras de CCR.

Figura 8. Cromatogramas que muestran algunos ejemplos de mutaciones identificadas en el gen *KRAS* en muestras de CCR.

Figura 9. Resultados del análisis molecular del exón 3 del gen *KRAS*.

Figura 10. Cromatogramas que muestran las mutaciones sin sentido identificadas en el gen *TP53* en CCR.

Figura 11. Imagen de la electroforesis capilar de una muestra de CCR con MSI-H.

Figura 12. Imagen de la electroforesis capilar de una muestra de CCR con MSI-L.

Figura 13. Imagen de la electroforesis capilar de una muestra con CCR resultado MSS.

Figura 14. Resultados del análisis molecular del gen *BRAF*.

Figura 15. Electroforesis que muestra los productos amplificados de algunas muestras por MS-PCR.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de los análisis estadísticos entre las variables edad, sexo y hallazgos histopatológicas con las alteraciones moleculares analizadas.

Anexo 2. Descripción general de las características clínico patológicas de las 44 muestras de CCR analizadas y de los hallazgos de mutaciones en los genes analizados, MSI y metilación en el gen MLH1.

Anexo 3. Consentimiento informado

Anexo4. Formato empleado para obtener la información clínico patológica de la historia clínica de los pacientes CCR incluidos en el estudio.

1. RESÚMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es una neoplasia que presenta altas tasas de incidencia en la población mundial. En Colombia, es el cuarto tipo de cáncer más frecuente y el tercero en mortalidad para ambos sexos. Diversas vías moleculares están involucradas en el desarrollo del CCR esporádico como la inestabilidad cromosómica, la inestabilidad microsatelital y la epigenética. El modelo de Fearon y Vogelstein en 1990, describe la carcinogénesis del CCR en múltiples pasos, por la acumulación de mutaciones en los genes *APC*, *KRAS*, *TP53*, entre otros, que promueven la transformación del epitelio normal hasta carcinoma. El objetivo de este estudio fue realizar una caracterización molecular en 44 individuos con CCR, de las principales vías de la carcinogénesis mediante diferentes técnicas de biología molecular. Se encontró una frecuencia de mutación para el gen *APC* del 18,1%, *KRAS* del 25% y *TP53* del 4,5%. También se identificaron varios polimorfismos con alta frecuencia, el más común fue el T1493T localizado en el gen *APC*. Por otra parte, se determinó la frecuencia de MSI del 27,2% y alta frecuencia de metilación del promotor del gen *MHL1* del 73,1%. El 91,6% de los casos con MSI tenían el gen *MLH1* metilado. En el gen *BRAF* no se identificaron mutaciones. En conclusión, mediante diferentes técnicas de biología molecular se logró caracterizar 44 individuos diagnosticados con CCR, este es el primer estudio en Colombia que informa las frecuencias de las alteraciones moleculares en las principales vías de la carcinogénesis CCR. En los pacientes con CCR evaluados la alteración molecular más común fue la metilación del gen *MLH1*. Además, se encontró una frecuencia de mutaciones particular en los genes *APC*, *KRAS*, *TP53*

y *BRAF*. En estos pacientes se demostró que tenían alteraciones en las vías moleculares de la CIN, MSI y la epigenética. Los hallazgos obtenidos en este estudio confirman la heterogeneidad molecular que se presenta en el desarrollo del CCR.

Palabras Clave: Cáncer colorrectal, mutación, polimorfismo, *APC*, *KRAS*, *TP53*, *BRAF*, heterogeneidad genética, inestabilidad microsatelital, *MLH1*, metilación.

2. ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a neoplasm with high incidence rates in the world population. In Colombia, CRC it is the fourth most frequent type of cancer and the third in mortality for both sexes. Several molecular pathways are involved in the development of sporadic CRC, such as chromosomal instability, microsatellite instability and pathway epigenetic. Fearon and Vogelstein model in 1990 described the carcinogenesis of CRC in multiple steps, by the accumulation of mutations in *APC*, *KRAS*, *TP53* genes, which promote the transformation from normal epithelium to carcinoma. The aim of this study was to perform molecular characterization, in 44 individuals with CRC, of the main pathways of carcinogenesis using diverse molecular techniques. *APC* mutation frequency was 18.1%, *KRAS* and *TP53* were mutated in 25% and 4.5% respectively. Several polymorphisms were also identified with a high frequency, the most common was T1493T located in *APC* gene. On the other hand, MSI frequency was 27.2% and high methylation frequency of the promoter of *MHL1* gene was 73.1%. 91.6% of MSI cases had methylated *MLH1* gene. No mutations were identified in *BRAF* gene. In conclusion, different molecular biology techniques were used to characterize 44 patients diagnosed with CRC. This is the first study in Colombia to report the frequencies of molecular alterations in the main pathways of CRC carcinogenesis. The most common molecular alteration in evaluated patients with CRC was the methylation of *MLH1* gene. In addition, a particular mutations frequency were found in *APC*, *KRAS*, *TP53* and *BRAF* genes. In these patients were demonstrated that they had alterations in the molecular pathways of CIN, MSI

and epigenetic. The findings obtained in this study confirm the molecular heterogeneity that occurs in the development of CRC.

Key words: Colorectal cancer, mutation, polymorphism, *APC*, *KRAS*, *TP53*, *BRAF*, genetic heterogeneity, microsatellite instability, *MLH1*, methylation.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CCR es considerado un problema de salud pública global debido a las altas tasas de incidencia y mortalidad que presenta. En el mundo, el CCR es el tercer cáncer más frecuente y el cuarto en mortalidad, la situación es alarmante en países en vía de desarrollo, donde las tasas de incidencia y mortalidad presentan una tendencia al aumento (1).

En Colombia, el CCR es el cuarto en incidencia y el tercero en mortalidad en ambos géneros, es más frecuente en hombres que en mujeres, con 2632 casos nuevos en mujeres y 3031 en hombres. Sin embargo, presenta una mortalidad anual un poco mayor en mujeres, causando la muerte en 1727 casos y en 1480 hombres (2). En los últimos años, las tasas de incidencia y mortalidad del CCR en Colombia han aumentado (3).

Un estudio realizado por el grupo Genética Médica de la Universidad de Antioquia, se reportó una frecuencia de CCR del 20% en una población menor de 40 años, proveniente de los departamentos de Antioquia y Huila; esta cifra es alta y casi el doble de lo informado para este grupo de edad (4).

En Colombia son limitados los programas de prevención en cáncer, así como también, el acceso oportuno, calidad de diagnóstico y tratamientos en el sistema de salud; por lo anterior, la mayoría de los pacientes con CCR son detectados en estadios avanzados y en consecuencia la supervivencia de estos pacientes disminuye (5).

Por lo anterior, en Colombia es de gran importancia la implementación de técnicas de tamizaje, diagnóstico y clasificación molecular del CCR, con el fin de brindar la oportunidad a los pacientes de tener un diagnóstico preciso y oportuno; así como también, tener la posibilidad de aumentar la eficacia de terapias dirigidas a blancos moleculares, y lograr aumentar la tasa de supervivencia de estos pacientes (5).

Por otra parte, el cáncer es una enfermedad con mecanismos moleculares heterogéneos. Se caracteriza principalmente por daños en el ADN que permiten la acumulación de diversas alteraciones en genes supresores de tumor (GST) y oncogenes, los cuales tienen una función fundamental en el inicio y progresión del cáncer (6). Uno de los modelos de carcinogénesis mejor estudiados es el del CCR, ya que se ha logrado identificar cada uno de los cambios histopatológicos durante la transformación de la mucosa normal hacia carcinoma, lo que facilita el estudio de las alteraciones moleculares que se encuentran al inicio, desarrollo y progresión del CCR. Adicionalmente, varias de las alteraciones moleculares que se encuentran en el desarrollo del CCR tienen una valiosa utilidad para el diagnóstico genético, pronóstico y la respuesta a determinadas terapias de la enfermedad (7).

Mutaciones en los genes *APC*, *KRAS*, *TP53* y *BRAF*, así como, las alteraciones en los genes del sistema de reparación MMR (*mismatch repair system*) y las modificaciones epigenéticas, son algunos de los cambios moleculares más comunes en el desarrollo del CCR y son esenciales durante la transformación de las células normales hacia carcinoma; por esta razón la detección y

caracterización molecular de los pacientes con CCR es de gran importancia, debido a que permitiría correlacionarlas con las características clínico-patológicas, orientar determinados tratamientos y conocer el pronóstico de la enfermedad (7).

En Colombia, en el departamento de Antioquia, el grupo de Genética Médica dentro de la línea de investigación en tumores sólidos, viene desarrollando desde hace más de una década diferentes proyectos sobre la caracterización genética del cáncer gastrointestinal, y con este estudio busca dar continuidad a esta línea, con el análisis molecular de las principales vías genéticas relacionadas con el desarrollo del CCR como son: análisis de mutaciones en genes de la vía clásica, análisis de inestabilidad microsatelital en la vía mutadora y la vía epigenética, con el fin de tener una mejor caracterización molecular de este cáncer en nuestra población; por consiguiente, este trabajo pretende complementar estudios previos y proporcionar metodologías moleculares que podrán ser utilizadas con diferentes propósitos, principalmente en la caracterización de tumores colorrectales en nuestro medio.

En el presente trabajo se formularon las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es la frecuencia de mutación del gen *APC* en el exón 15; *KRAS* en los exones 2 y 3 y *TP53* en los exones 5 al 8 en los pacientes con CCR a estudiar?
2. ¿Cuáles son los tipos de mutaciones más frecuentes en estos genes?
3. ¿Qué tan frecuente es la mutación V600E en el exón 15 del gen *BRAF* en los tumores analizados?

4. ¿Existen diferencias entre las frecuencias y tipo de mutaciones en los genes analizados, con las informadas en otras poblaciones y en estudios anteriores?
5. ¿Cuál es la frecuencia de inestabilidad microsatelital en las muestras de CCR a evaluar?
6. ¿Existen diferencias entre la frecuencia de Inestabilidad microsatelital de las muestras analizadas con las informadas en otras poblaciones?
7. ¿Cuál es la frecuencia de la metilación del gen *MLH1* en las muestras de CCR analizados?

4. JUSTIFICACIÓN

El CCR es una enfermedad con alta tasa de incidencia en nuestro país y con mortalidad en aumento; la mayoría de los casos se diagnostica en estadios avanzados de la enfermedad (2). La sobrevivencia a cinco años de los pacientes con CCR oscila entre el 40 y 50%; este porcentaje aumenta de acuerdo con el estadio en que se detecte el cáncer, tipo de tratamiento y respuesta del paciente (8).

El CCR es una enfermedad heterogénea en el campo de la biología molecular como se indica en el atlas del genoma del cáncer, en el que se incluye una amplia variedad de alteraciones genéticas como aneuploidías, inserciones, deleciones, mutaciones puntuales y epigenéticas, las cuales son responsables de la inestabilidad del genoma y por consiguiente del desarrollo y la progresión del CCR (7).

Adicionalmente, factores externos relacionados con el estilo de vida, como la dieta, el consumo de tabaco y alcohol, acompañados de una baja actividad física, son factores que predisponen al desarrollo del CCR; de igual manera, factores no modificables, como la composición genética del individuo y las alteraciones epigenéticas, son factores que se relacionan con el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer (9).

Debido a las altas tasas de incidencia y mortalidad del CCR en Colombia, sumado a la variabilidad genética de esta población y la heterogeneidad tumoral, es de

gran importancia realizar estudios genéticos y moleculares en nuestra población para caracterizar mutaciones, polimorfismos y otras alteraciones comunes en las vías asociadas con el desarrollo del CCR; determinar sus frecuencias, y comparar los resultados con los informados en otras poblaciones y estudios previos. Cabe anotar que en nuestro país hasta el presente son pocos los estudios genéticos en individuos con CCR que se han realizado y por tanto, se desconoce en detalle cuales genes y vías moleculares están alteradas frecuentemente.

De acuerdo con lo anterior, este trabajo aporta conocimientos básicos sobre la genética del CCR y complementará hallazgos de estudios en nuestra población. Por otra parte, se implementaran metodologías que permitirán caracterizar varias de las alteraciones genéticas relacionadas con el desarrollo de CCR en Colombia, lo que aumenta la posibilidad de establecer técnicas de diagnóstico y tamizaje molecular útiles en la detección temprana de este cáncer en los casos esporádicos; así como también, en los casos hereditarios con alto riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. Adicionalmente, este tipo de estudio permitiría la implementación de programas de asesoramiento genético en familias con síndromes de tipo hereditario, con el objetivo de brindarles un diagnóstico molecular de mayor precisión que permita identificar los individuos que tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad antes del inicio y de las manifestaciones clínicas, sumado al establecimiento de estrategias de seguimiento y monitoreo para la detección precoz del CCR.

Por último, la caracterización molecular del CCR es de gran ayuda para los cirujanos y oncólogos, ya que les proporciona información importante acerca del pronóstico y la respuesta de los pacientes a determinados tratamientos, orientándolos a seleccionar la terapia más eficaz para cada individuo y de esta manera se podría aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes con CCR en nuestro medio.

5. MARCO TEÓRICO

El CCR es considerado un problema de salud pública en el mundo, porque es una de las principales causas de muerte en países industrializados (10,11); es el tercer cáncer más frecuente con una tasa de incidencia ajustada por edad de 17.2/100.000 habitantes año; es más frecuente en hombres que en mujeres, con 746000 y 614000 casos respectivamente (2, 3,11).

La variación de la incidencia de acuerdo con la distribución geográfica es similar para ambos sexos. Aproximadamente, el 55% de los casos de CCR ocurre en países desarrollados. Las tasas de incidencia más altas se encuentran en Australia y Nueva Zelanda en hombres y mujeres de 44.8 y 32.3 por 100.000 habitantes año respectivamente. Algunos países de Europa, así como, Estados Unidos, también presentan altas tasas de incidencia (2, 3,11).

Por otra parte, países de África Occidental, presentan las tasas más baja de incidencia, con 4.5 y 3.8 por 100.000 habitantes año para hombres y mujeres respectivamente. Así mismo, países del sur y centro de Asia también presentan bajas tasas. Estas diferencias geográficas son atribuibles a diferentes factores ambientales, la dieta y el estilo de vida de cada población (2, 3,11).

En cuanto a la mortalidad, se puede afirmar que el CCR es el cuarto cáncer de mayor mortalidad en el mundo para ambos sexos, con una tasa ajustada por edad de 8.4 por 100.000 habitantes año; más del 52% de las muertes por este cáncer ocurre en países menos desarrollados. La tasa de mortalidad más alta se observan en Europa central y oriental, con 20.3 y 11.7 por 100.000 habitantes año

para hombres y mujeres respectivamente. Por otra parte, las tasas de mortalidad más bajas para hombres y mujeres se encuentran en países de África occidental con 3.5 y 3.0 por 100.000 habitantes año respectivamente. En países desarrollados, la mortalidad ha disminuido progresivamente, posiblemente por una mayor disponibilidad de técnicas para la detección precoz (2, 3,11).

En Colombia, según datos de GLOBOCAN 2012, el CCR es el cuarto cáncer más frecuente para ambos sexos, con una tasa de incidencia ajustada por edad de 12.9 por 100.000 habitantes año. Por otra parte, es el tercero en mortalidad con una tasa ajustada por edad de 7.2 por 100.000 habitantes año para ambos sexos (2).

En nuestro país el CCR presenta mayor incidencia en: Antioquia, Caldas, Quindío, Risaralda, Cundinamarca y Santander y es menos frecuente en: Atlántico, Bolívar, Magdalena, Guajira y Choco. En cuanto a la mortalidad, se puede afirmar que presenta una mayor tasa de mortalidad en: Caldas, Quindío, Risaralda y Cundinamarca; y baja tasa en Chocó, Amazonas y la Guajira (12,13).

5.1 FACTORES DE RIESGO DEL CCR

Diversos factores se asocian con el riesgo de desarrollar esta enfermedad. Algunos factores son modificables, tales como la dieta, la obesidad, el sedentarismo, el consumo de cigarrillo y de alcohol (14,17). En el año 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó, que el consumo de 50 gr de carnes frías o procesados (salchicha, jamón, carne en conserva, embutidos)

aumenta hasta en un 18% el riesgo para desarrollar CCR (15,18). Por el contrario, se informa que una dieta rica en fibra (hortalizas, cereales integrales y frutas), vegetales y ácido fólico tiene un efecto protector (16,19).

De otro lado, algunos factores no son modificables y son propios de cada individuo, condiciones hereditarias por mutaciones germinales en algunos genes de reparación como en el síndrome de Lynch o la poliposis adenomatosa familiar, el componente étnico, y la diabetes tipo 2 son factores de riesgo que favorecen el desarrollo del CCR (19).

Aunque el CCR se presenta en algunas personas jóvenes (< 50 años), específicamente en aquellos individuos que tienen predisposición hereditaria, la mayoría de los casos son de tipo esporádico y ocurre después de los 50 años, en los que se diagnostica el 90% de los casos nuevos y se reporta el 94% de las muertes asociadas con este tipo de cáncer. El tamizaje genético de personas con alto riesgo cercanas a los ≥ 50 años de edad, proporciona la oportunidad de detectar a tiempo la enfermedad (19,20).

5.2 BASES MOLECULARES DEL CANCER COLORECTAL

El CCR es una enfermedad heterogénea porque se origina por diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas, que están involucradas con el inicio y desarrollo de esta (21). Dichas alteraciones afectan la expresión de múltiples genes, promoviendo la transformación de la mucosa normal hacia un pólipo

benigno, el cual progresa hacia adenoma temprano, luego intermedio, hasta avanzar a un adenocarcinoma (21).

Cerca del 80% de los casos ocurren de forma esporádica (22), el porcentaje restante (20%) son de tipo familiar; dentro de estos están los que presentan un patrón de herencia autosómico dominante; los cuales ocurren por mutaciones germinales en el gen *APC* que causa la poliposis adenomatosa familiar (por sus siglas en inglés FAP “*familial adenomatous poliposis*”) y en los genes del sistema de reparación de bases mal apareadas MMR (*mismatch repair*) como son *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* que originan el cáncer colorrectal no polipósico (HNPC “*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*”) o síndrome de Lynch (23,24).

Por otro lado, se conocen diferentes vías moleculares para el desarrollo del CCR esporádico. Inicialmente, se propuso el modelo clásico de progresión de adenoma hacia carcinoma por Fearon y Vogelstein (25); el cual se denomina la vía tradicional o supresora e involucra la inactivación de los GST *APC*, *TP53*, *SMAD* y *DCC* y mutaciones en los oncogenes *KRAS* y *BRAF* (25). La segunda vía se denomina mutadora, se relaciona con mutaciones en los genes del sistema MMR, principalmente *MLH1* y *MSH2*, que inducen la inestabilidad microsatelital (*MSI*, *Microsatellite Instability*) en las células tumorales (26). Otra vía implicada es la epigenética, que consiste en la inactivación de la expresión génica por la metilación de la región promotora de determinados genes (27).

A continuación se describen las principales vías moleculares involucradas en el inicio y desarrollo del CCR esporádico.

5.2.1 Vía de la inestabilidad cromosómica (CIN “*Chromosomal Instability*”)

También denominada tradicional o vía supresora. Es el tipo de inestabilidad genómica más común en los casos de CCR esporádico y se presenta en el 85% de los casos. Esta vía se caracteriza por la acumulación de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales como aneuploidías, deleciones, translocaciones, pérdida de heterocigosidad (LOH “*loss of heterozygosity*”); así como también, de mutaciones en GST *APC*, *TP53* y *DCC*, y protooncogenes como *KRAS*, *BRAF* y *SMAD* (28,29).

La CIN es la base del modelo clásico del desarrollo de cáncer CCR propuesto por Fearon y Vogelstein en los años 90, denominado adenoma-carcinoma. En este modelo la transformación se inicia por mutaciones en el gen *APC* y ocurre simultáneamente con la pérdida alélica en las regiones cromosómicas 5p, 18q y 17p; lo que conduce a la formación de un adenoma benigno; posteriormente, ocurre una mutación en el gen *KRAS*, lo que confiere la ventaja de proliferar a las células y causa la transformación hacia un adenoma intermedio; luego, se presentan mutaciones en genes como *SMAD*, *DCC* y *TP53*, para transformarse finalmente en un carcinoma (Figura 1) (28,30).

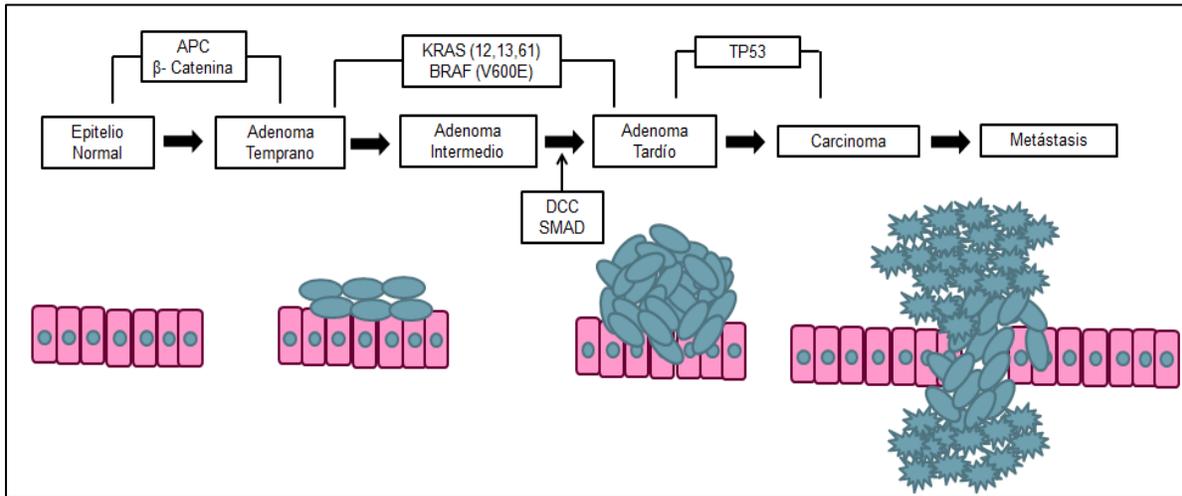


Figura 1. Modelo clásico de la carcinogénesis colorrectal. Secuencia del modelo genético propuesto por Fearon y Vogelstein (25). La mucosa normal del colon se transforma por la acumulación de diversas alteraciones genéticas en un carcinoma.

Se describe a continuación los principales genes involucrados en la vía CIN:

- **APC**

APC (Adenomatous Poliposis Coli) es un GST localizado en la región 5q21-q22, la inactivación de este es una de las principales alteraciones moleculares iniciales en el desarrollo del CCR y por tanto de la transformación en la secuencia adenoma- carcinoma. Posee 15 exones y codifica la proteína APC de 312 KD, que contiene 2842 aminoácidos (31). El exón 15 representa el 75% de la región codificante de *APC* y en el que se encuentran con mayor frecuencia mutaciones, incluidas las somáticas y germinales (32).

La proteína es multifuncional con varios dominios que interactuar con otras como GSK3 β , CSNK1A1, Kap3, MCAK, microtúbulos MT; de esta forma, APC participa en procesos celulares importantes como: la vía de señalización Wnt/ β -catenina, adhesión intracelular, estabilización del citoesqueleto, regulación del ciclo celular y apoptosis (33).

Aproximadamente el 90% de las mutaciones identificadas en este gen ocurren en una región ubicada entre los codones 1286 y 1513 del exón 15 denominada “*mutation clustal región*” (MCR), las cuales originan una proteína truncada (34). Las mutaciones somáticas son comunes en el 70% de los casos de CCR esporádicos; mientras que, en el 90% de los casos de FAP, se presentan mutaciones germinales (32,34).

En condiciones normales, APC forma un complejo con GSK3 β , CSNK1A1 y axina, que se unen y fosforilan residuos específicos de serina y treonina de la β -catenina; esta proteína fosforilada es un blanco para la ubiquitinación por la E3 ubiquitina ligasa β -TrCP; posteriormente la β -catenina fosforilada es degradada vía proteosoma (35,36).

La pérdida de función del gen *APC* produce la acumulación de la β -catenina en el citoplasma, se transloca al núcleo y se acopla al factor de transcripción TCF-LEF, activando la transcripción de genes como *c-MYC*, *CCND1* *ciclina D1* y *CRD-BP*; de esta manera, se estimula el crecimiento y proliferación celular (35,36).

El gen *APC* es considerado un biomarcador para la detección temprana del CCR, por tal razón, el tamizaje de mutaciones suministra información de importancia

clínica, útil para el diagnóstico de FAP; mientras que en los casos esporádicos, aunque no se encuentra asociación entre alteraciones en este gen y respuesta a determinado tratamiento, algunas mutaciones no sinónimas y SNPs proporcionan información sobre un mayor riesgo de desarrollar cáncer (37).

- **KRAS**

El gen *KRAS* es un proto-oncogén que pertenece a la familia *RAS* (*KRAS*, *NRAS* y *HRAS*); codifica una proteína de 21KD, está ubicado en la región cromosómica 12p 12.1; posee seis exones, presenta dos variantes *KRAS4A* y *KRAS4B*, de 188 y 189 aminoácidos respectivamente. La proteína es una GTPasa que actúa como interruptor molecular y su principal función es participar en la transducción de señales extracelulares (38).

KRAS es un componente importante de la vía de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR “*epidermal growth factor receptor*”). El estímulo del EGFR fosforila los dominios tirosina-quinasa ubicados en la región intracelular de este receptor, que a su vez, promueve la activación de los factores de intercambio de guanina (GEFs “*guanine nucleotide exchange factor*”) y como consecuencia *KRAS* pasa desde su forma inactiva unida a GDP, hacia un estado activo, en el cual se une a GTP, que inicia una cascada de señalización que regula funciones celulares claves como regulación del ciclo celular, proliferación, diferenciación y apoptosis (38,39).

Este gen se encuentra mutado en una amplia variedad de tumores como: páncreas (40), pulmón (41) y tiroides (42). En el CCR *KRAS* se encuentra mutado

entre el 13% y 40% de los casos esporádicos. Las mutaciones somáticas identificadas ocurren en su mayoría en el exón 2, específicamente en los codones 12 y 13; mientras que en el exón 3 se encuentra el codón 61 donde se reporta baja frecuencia. Las mutaciones que ocurren en los codones 12, 13 y 61 afectan aminoácidos que intervienen en el intercambio GDP-GTP, como consecuencia el gen queda activado de manera constitutiva afectando las vías de señalización de MAPK (“*Mitogen Activated Protein Kinases*”) y PI3K (“*fosfatidilinositol-3-kinasa*”) (43,44).

El gen *KRAS* es considerado un biomarcador importante para predecir la respuesta para algunos tratamientos antineoplásicos; en la terapia para el CCR se recomienda el uso de anticuerpos monoclonales como panitumumab o cetuximab, los cuales tienen la capacidad de bloquear la activación del EGFR en las células cancerosas. De esta manera, los pacientes con CCR metastásico (CCRm) que tienen mutado el *KRAS* no responderán a este tipo de terapia y tienen un mal pronóstico; mientras que, los pacientes sin mutaciones en *KRAS* tienen una mejor respuesta. Por esta razón, la detección de mutaciones en *KRAS* tiene gran importancia como biomarcador predictivo en la selección de terapias más eficaces; debido a esta utilidad clínica a todos los pacientes con diagnóstico de CCRm se les recomienda realizar la prueba molecular de *KRAS* (43,44).

- **Gen *BRAF***

El gen *BRAF* es un proto-oncogén, se ubica en la región 7q34, posee 18 exones y codifica para proteína del mismo nombre con un peso molecular entre 75 a 100 KDa. Perteneciente a la familia de proteínas treonina quinasa RAF (A-RAF, B-RAF

y C-BRAF) Esta proteína cumple una función importante en la transducción de señales intracelulares, ya que participa en la vía de señalización de las MAPK quinasas (RAS-RAF-MEK-ERK), siendo BRAF el activador más importante de esta cascada de señalización (45,46).

Una vez KRAS es activado mediante un estímulo extracelular recibido en un receptor de la membrana celular, la proteína KRAS captura a la proteína BRAF del citoplasma a la membrana celular, con ayuda de proteínas adaptadoras, luego KRAS fosforila los residuos T599 y el S602 de BRAF que lo activan; posteriormente este último fosforila y activa MEK1/2 los cuales a su vez fosforilan y activan ERK1 y ERK2, que activan factores de transcripción que regulan procesos celulares claves como: la proliferación celular, diferenciación y crecimiento (46,47).

Este gen se encuentra mutado en tumores como: tiroides (48), melanoma (49), próstata (50) y pulmón (51); en CCR se reporta mutaciones en cerca del 5% de los casos esporádicos. Las principales mutaciones en *BRAF* se localizan en los exones 11 y 15; particularmente la mutación V600E en el exón 15, es la más frecuente y se encuentra en el 90% de los casos; esta es una mutación no sinónima, que produce la sustitución del aminoácido valina por ácido glutámico en el codón 600, como consecuencia la vía de señalización MAPK se activa constitutivamente (45).

Similar a lo informado en *KRAS*, la detección de la mutación V600E en *BRAF* es importante para predecir la respuesta a terapias con anticuerpos monoclonales

contra el EGFR, por que los pacientes que tienen tumores con esta mutación no responden a este tipo de tratamiento (47).

Por otra parte, en los casos de CCR las mutaciones en *BRAF* son excluyentes de mutaciones en *KRAS*, debido a que se encuentran en la misma vía de señalización. Adicionalmente, se ha informado que se encuentran con mayor frecuencia en mujeres con tumores ubicados en el colon ascendente, que exhiben inestabilidad microsatelital; y tienen mal pronóstico (45-47).

- ***TP53***

El gen *TP53*, es un GST, que se ubica en la región 17p13, contiene 11 exones, los exones 1 y 11 no codifican; los otros codifican la proteína p53 de 53KD, que posee 393 aminoácidos. Esta proteína se une formando un tetrámero, que actúa como factor de transcripción, regulando la expresión de diversos genes en respuesta al estrés celular. p53 tiene varias funciones como son la regulación del ciclo celular, apoptosis, reparación, senescencia, angiogénesis y diferenciación celular (52,53).

Por otra parte, *TP53* se encuentra alterado aproximadamente en el 50% de todos los tipos de tumores malignos, como los de ovario, cabeza y cuello, mama, tiroides, estómago y colorrectal, entre otros. De las mutaciones identificadas cerca del 93% se encuentran en el dominio de unión al ADN, entre los exones 5-8 que codifican los codones 130 al 286. Estas mutaciones se asocian con estadios avanzados. En CCR la frecuencia de mutación de *TP53* varía desde el 34 % en colon ascendente al 45% en colon descendente, los codones 175, 245, 248, 273 y 282 son considerados puntos calientes de mutaciones (54,55).

En cuanto a la asociación de mutaciones en *TP53* y el pronóstico de los pacientes con CCR, se ha encontrado que las mutaciones se asocian con invasión a ganglios linfáticos regionales, presentan resistencia a la quimioterapia y tienen un mal pronóstico (54,55).

5.2.2 Vía de la Inestabilidad Microsatelital (MSI)

Esta vía, también conocida como mutadora, se relaciona con la inactivación o defectos en los genes MMR ("*Mismatch repair*") que está conformado por: *hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* y *hPMS2*. Estos genes actúan en la fase S del ciclo celular reparando el apareamiento erróneo de bases o en respuesta al deslizamiento de la polimerasa en secuencias altamente repetitivas. Los defectos en estos genes conducen a la aparición de mutaciones puntuales, inserciones o deleciones que cambian el marco de lectura, produciendo un codón de parada prematuro, que genera una proteína no funcional (56).

Por otra parte, los microsatélites son secuencias de ADN altamente repetitivas que varían de uno a seis nucleótidos de longitud, se encuentran distribuidos por todo el genoma y son propensos a mutaciones, inserciones o deleciones durante la replicación del ADN. Por lo anterior, la inestabilidad microsatelital (MSI) se define como el cambio en la longitud de las secuencias microsatelitales (56).

En CCR esporádico la MSI se presenta en cerca del 20% de los individuos y se relaciona con el silenciamiento del gen *MLH1* por la metilación de la región promotora. En individuos con CCR hereditario como el síndrome de Lynch, la MSI

se observa en el 90% de los casos y ocurre como producto de mutaciones germinales en los genes de reparación *MLH1* y *MSH2* (58).

El análisis de la MSI se lleva a cabo comparando los perfiles alélicos generados mediante la amplificación de marcadores tipo STRs (*short tandem repeat*) a partir de ADN tumoral y normal del mismo individuo. La variación o aparición de nuevos alelos en la muestra tumoral, que no se observen en el perfil alélico de su contraparte normal, indica un estado de inestabilidad microsatelital (58).

Diversos paneles de microsatélites STRs se han empleado para el análisis de la MSI en el CCR. El panel de Bethesda establecido en 1997 fue uno de los primeros y comúnmente utilizado hasta hace unos años, está compuesto por dos marcadores mononucleótidos BAT-26 y BAT-25 y tres marcadores dinucleótidos D5S346, D2S123 y D17S250 (57). Estudios posteriores desarrollaron paneles compuestos solo por marcadores mononucleótidos como: BAT-25, BAT-26, NR-21/22, NR-27 y NR-24, los cuales establecen el estado de MSI con un 100% de especificidad y sensibilidad (59,60).

De acuerdo con el estado de inestabilidad de cada uno de los marcadores, los tumores se clasifican de la siguiente forma: alta, MSI-H (High level) si dos o más marcadores están alterados; baja, MSI-L (Low Level) si solo uno de los marcadores está alterado; y estable, MSS (microsatellite stable) si ninguno de los 5 marcadores están alterados (58,61).

La MSI se observa con frecuencia en los casos de CCR esporádicos principalmente localizados en el colon derecho y en mujeres de edad avanzada.

Adicionalmente, el 50% de los casos con MSI presentan la mutación V600E en *BRAF*. Por lo anterior, el análisis de MSI es importante dentro del tamizaje genético para una adecuada caracterización molecular de cada individuo. Además, tiene una gran utilidad en el diagnóstico molecular de los pacientes y en familias con sospecha del síndrome de Lynch. Otro aspecto importante del análisis de la MSI, tiene que ver con los hallazgos de diferentes estudios clínicos que informan que estos pacientes no responden a la quimioterapia con 5-Fluorouracilo, pero sí tienen mejor respuesta al Oxiplatino (56,61). De estos hallazgos se resalta la importancia de determinar la MSI para predecir la respuesta de los pacientes con CCR a determinadas terapias antineoplásicas.

5.2.3 Vía Epigenética

El desarrollo del CCR también se da por mecanismos epigenéticos que inactivan la expresión de diversos genes, principalmente por la metilación de los promotores. La metilación del ADN es otra vía común en el CCR esporádico; se presenta aproximadamente en el 15% de todos los casos y consiste en la unión covalente de un grupo metilo (CH_3) en el carbono 5' de la citosina por medio de las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) (Figura 2) (21).

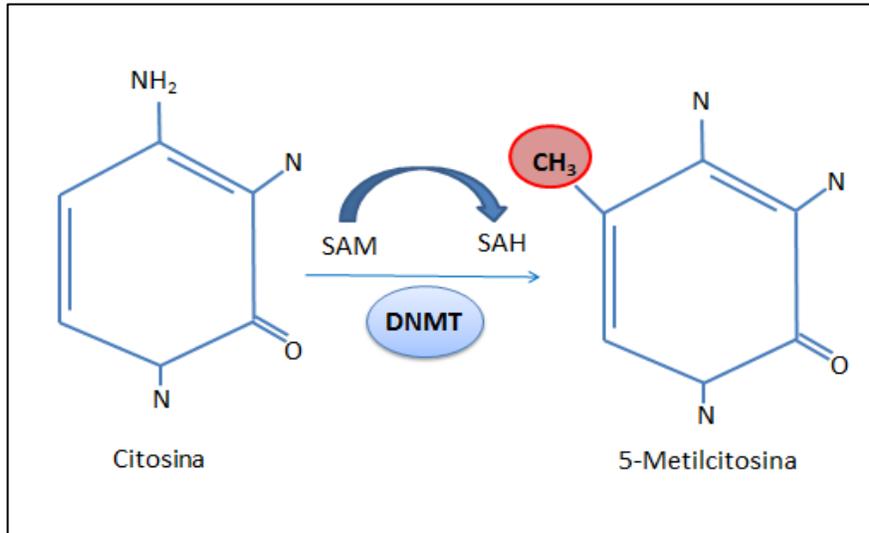


Figura 2. Metilación de la citosina en el carbono 5 mediante la enzima DNA metiltransferasa (DNMTs). La enzima DNA metiltransferasa cataliza la unión de un grupo metilo CH_3 en el carbono 5 de la citosina, empleando como molécula donadora del grupo CH_3 la S- adenosil metionina (SAM) y dejando como subproducto la S- adenosil homocisteína (SAH) (21).

La metilación ocurre en secuencias ricas en GC del genoma denominadas islas CpG. En células humanas normales el 60% de los genes codificantes tienen en la región promotora una región rica en islas CpG (21,62). La metilación del ADN reprime la transcripción por la unión de proteínas MBPs (*"Methyl CpG Binding Protein"*) que interactúan con las secuencias CpG metiladas, lo que impide la unión de los factores de transcripción con el ADN, e inhibe la expresión de los genes (72). Es importante mencionar que las islas CpG que no están dentro de un gen activo se mantienen en su mayoría metiladas; mientras que las islas CpG que

no se encuentran metiladas, hacen parte de la región promotora de genes que se expresan activamente (21).

En las células cancerosas la hipermetilación de las islas CpG genera la represión transcripcional de diferentes GST y genes MMR como por ejemplo: *RB1*, *APC*, *MLH1*, *MGMT*, *CDH1*, *CDKN2A*, *RUNX3*, y *RASSF1A*, entre muchos otros (65-71).

La hipermetilación de la región promotora, se conoce como fenotipo metilador de islas CpG CIMP (“*CpG Island Methylator Phenotype*”). El fenotipo CIMP, fue propuesto por Toyota y colaboradores, quienes clasificaron el CCR en dos categorías: una de baja metilación (CIMP -, pocos genes metilados) y otra que exhibe alta metilación en varios genes evaluados simultáneamente (CIMP+) (73,74).

Los autores seleccionaron cinco genes para determinar el estado CIMP en muestras de CCR: *CDKN2A*, *MINT1*, *MINT2*, *MINT31* y *MLH1*, (60). Adicionalmente, otros autores han propuesto otros paneles en los que se incluyen genes como: *CACNA1G*, *CRABP1*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOCS1*, *HIC1*, *IGFBP* y *WR*. Sin embargo, no existe un consenso de cuáles y cuantos genes deberían utilizarse para una mejor clasificación epigenética del CCR (73,74).

Por otra parte, con base en las tecnologías novedosas de secuenciamiento en paralelo o micromatrices, en las cuales se pueden analizar simultáneamente más de 800 genes y aproximadamente 1000 islas CpG, en la actualidad se puede

lograr una caracterización epigenómica más completa y precisa; puesto que los tumores con CIMP podrían dividirse a su vez en dos subgrupos: CIMP 1 y CIMP 2 (75). Los tumores CIMP1 presentan MSI+ ,mutaciones en *BRAF* y se localizan con mayor frecuencia en el colon ascendente; mientras que los tumores CIMP2, se caracterizan por mutaciones en *KRAS* y baja frecuencia de mutaciones en *TP53* y *BRAF* (76).

De otro lado, las modificaciones epigenéticas han estado en constante investigación debido a su potencial terapéutico y su utilidad para predecir la respuesta a la quimioterapia. Además, la metilación de la región promotora de diversos genes podría ser una de las razones a tener en cuenta en la resistencia de los pacientes con cáncer a determinadas terapias antineoplásicas. Una de las ventajas de la terapia epigenética, es que medicamentos desmetilantes, actúan simultáneamente en diversos genes metilados (77,78).

Por último, a diferencia de otras alteraciones moleculares involucradas en el inicio y progresión del CCR, como aneuploidías, mutaciones y la pérdida alélica; la metilación es potencialmente reversible. Esta característica ha permitido el desarrollo de nuevas terapias moleculares para restablecer la actividad de genes silenciados, inhibiendo la metilación del ADN. En la actualidad, la 5-Azacitidina y la 5-Azadeoxicitidina son medicamentos inhibidores de la metilación ampliamente investigados y aprobados por la FDA para ser utilizados en pacientes con síndrome mielodisplásico y con leucemia mielocítica crónica (77,78); en ellos se ha observado que esta terapia es más eficaz comparada con otras y que además,

mejora la calidad de vida y la supervivencia. Por los anteriores hallazgos, las terapias epigenéticas proporcionan una gran oportunidad para desarrollar nuevos fármacos con el objetivo de diseñar tratamientos más efectivos contra el cáncer.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las alteraciones moleculares en las vías supresora, de inestabilidad microsatelital y epigenética en individuos con cáncer colorrectal esporádico.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar mutaciones en la región MCR, ubicada en el exón 15 del gen *APC*, en muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal esporádico.
2. Identificar mutaciones en los exones 2 y 3 del gen *KRAS* en una muestra de individuos con cáncer colorrectal.
3. Identificar mutaciones en los exones 5 al 8 del gen *TP53* en la población a estudiar.
4. Determinar el estado de inestabilidad microsatelital con los marcadores genéticos BAT-25, BAT-26, NR21, NR24 y NR27 en las muestras de individuos con CCR.
5. Determinar la mutación V600E en el exón 15 del gen *BRAF* en las muestras con inestabilidad microsatelital positiva.
6. Determinar el estado de metilación en la región promotora del gen *MLH1* en los pacientes con CCR a estudiar.
7. Explorar la asociación entre el resultado genético con variables sociodemográficas como edad y sexo, diagnóstico histopatológico y estadio del cáncer, en las muestras a examinar.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 TIPO DE ESTUDIO.

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, de corte transversal. Las muestras de CCR esporádico se recolectaron entre febrero del año 2015 y diciembre del 2016 en varias instituciones médicas de la ciudad de Medellín: Hospital San Vicente Fundación, Clínica León XIII y Clínica Las Vegas. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética para experimentación en humanos de la Universidad de Antioquia.

7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.

El estudio incluyó 44 individuos con diagnóstico clínico e histopatológico de CCR esporádico. Las muestras de los tejidos tumorales y sanos se obtuvieron de los pacientes sometidos a resección quirúrgica o biopsias del tumor. En este estudio se incluyeron 27 mujeres y 17 hombres con una mediana de edad de 60,5 años. A cada paciente se le solicitó la participación voluntaria en el proyecto y su autorización con la firma del consentimiento informado. Ninguno de los pacientes tenía antecedentes de cáncer y no recibieron tratamiento antineoplásico previamente.

7.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes con diagnóstico de CCR esporádico confirmado por estudio histopatológico; no tener antecedentes de cáncer; no haber tenido quimioterapia o radioterapia antes de la cirugía y firmar el consentimiento informado.

7.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Paciente que no autoriza su participación en el estudio; pacientes que no presenten CCR y pacientes que hayan tenido tratamiento antineoplásico.

7.3 MUESTRA

Se estudiaron un total de 44 muestras de tejidos tumorales primarios de CCR, todas confirmadas por estudio histopatológico realizado por un patólogo experto. Además, de cada caso también se tomó una muestra de tejido sano.

Las muestras del tejido tumoral y sano se obtuvieron por resección quirúrgica por los cirujanos de las instituciones de salud participantes. Una porción del tejido tumoral y otra del tejido sano se recolectaron por separado en dos recipientes estériles que contenían medio de transporte (RPMI 1640 suplementado con antibióticos, antimicóticos y heparina; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA); y otra porción de tejido tumoral se envió al departamento de Patología de la Universidad de Antioquia para realizar el diagnóstico histopatológico. Las muestras se transportaron al laboratorio de la Unidad de Genética Médica para realizar el

lavado y procesamiento de las mismas; luego se almacenaron a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN.

En todos los casos se revisaron las historias clínicas de los pacientes para verificar el diagnóstico histopatológico completo y obtener información personal como edad, género, antecedentes de cáncer, entre otros.

7.4 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de las muestras del tejido tumoral primario y sano de cada paciente, utilizando el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden Germany), según las recomendaciones del fabricante, con algunas modificaciones como se describe a continuación:

Se cortaron aproximadamente 25 mg de los tejidos tumoral y sano en pequeños fragmentos y se transfirieron a un tubo de 1.5 ml. Posteriormente, se adicionaron 180 μl del buffer ATL y 20 μl de Proteinasa K; se sometió a agitación con vortex por 30 s y se incubó a 56°C por 12 h; durante este tiempo se realizaron homogenizaciones periódicas mediante vortex para favorecer la lisis celular completa. Luego de la lisis se adicionaron 200 μl de Buffer AL y se mezcló por inversión durante 20 s, se incubó la muestra por 15 min a 70°C . Pasado este tiempo, se adicionaron 200 μl de etanol (96-100%), se mezcló por inversión durante 15 s y se transfirió la mezcla a una columna QIAamp Mini Spin. Posteriormente, se centrifugó por 3 min a 6000 x g; después, se transfirió la columna a un nuevo tubo colector y se descartó el filtrado, se adicionaron 500 μl

del Buffer AW1, se centrifugó por 3 min a 6000 x g, se transfirió la columna a un nuevo tubo colector, se adicionaron 500µl del Buffer AW2 y se centrifugó a máxima velocidad (20000 x g) durante 3 min. Finalmente, se trasladó la columna en un tubo de 1.5 ml y se adicionaron 100 µl del Buffer AE; se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 2 min a 6000 x g. Se repitió el paso anterior una vez más.

Posteriormente, se cuantificó el ADN de cada muestra en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar la integridad del ADN. De cada muestra se hizo una alícuota de 50 µl y se almacenó a 4°C para facilitar la manipulación y evitar la degradación por congelación y descongelación.

7.5 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *APC*, *KRAS*, *TP53* y *BRAF*

El ADN extraído de las muestras tumorales se amplificó por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA), utilizando primers específicos para cada gen (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de los primers de los genes analizados y el tamaño en pares de bases (pb) del fragmento amplificado por PCR.

Gen	Primers	Forward	Reverse	No. Pb
APC	APC1 Exón15	5' CAGACTTATTGTGTAGAAGA3'	5' CTCCTGAAGAAAATTCAACA3'	587
	APC2 Exón15	5' AGGGTTCTAGTTTATCTTCA3'	5' TCTGCTTGGTGGCATGGTTT3'	539
KRAS	KRAS Exón 2	5' TTTTATTATAAGGCCTGCT3'	5' AAGTCTTAGTAAAACACCTG3'	446
	KRAS Exón 3	5' GCACTGTAATAATCCAGACTGTGT3	5' TGCCAAATACACAAAGAAAGC3'	177
TP53	Exones 5-6	5' TTCCTCTTCCTGCAGTACTC3'	5' AGACCTCAGGCGGCTCATAG3'	397
	Exones 7-8	5' GTGTTATCTCCTAGGTTGGC3'	5' TCCTGCTTGCTTACCTCGCT3'	618
BRAF	BRAF Exón 15	5' CTCTTCATAATGCTTGCTCTGATAGG3	5' TAGTAACTCAGCAGCATCTCAGG3	250

Para el gen *APC* se utilizaron dos pares de primers informados previamente en la literatura (31), para amplificar la región "Mutation Cluster Region" (MCR) del exón 15. La PCR se realizó en un volumen final de 35 µl que contenía 300 ng de ADN tumoral, en una mezcla de reacción con concentraciones de 1X para el buffer de reacción 10X, 1,05 mM de MgCl₂, 2 µM de dNTPs, 0,4 µM de cada primer y 1,4 U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen).

Los ciclos para los primers APC1 y APC2 consistían en: 94°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min; 51,5°C por 1 min para APC1 y 55,5°C por 1 min para APC2, 72°C por 40 s; por último, una extensión final a 72°C por 7 min.

Del gen *KRAS* se amplificaron los codones 12 y 13 del exón 2 y el codón 61 del exón 3, utilizando, para cada exón, un par de primers diseñados previamente en el grupo de Genética Médica (100). Las mezclas de las reacciones de PCR se

realizaron en las mismas condiciones que se describieron para el gen *APC*. El programa de amplificación utilizado fue: 94°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 seg; 56°C por 30 seg y 72°C por 30 seg, con la extensión final a 72°C por 7 min.

Para el gen *TP53* se amplificaron los exones 5 al 8, utilizando dos pares de primers, uno que amplifica los exones 5-6 (T 5-6) y otro par para los exones 7 y 8 (T 7-8) (100). La reacción se llevó a cabo en 35µl de la mezcla de la reacción similar a la de *APC*, pero con una concentración de $MgCl_2$ de 1.5mM. Las condiciones de la PCR fueron: 93°C por 3 min, posteriormente 35 ciclos de 95°C por 1 min, 1 min a 56°C para el primer T 5-6 y de 59°C para T 7-8, 72°C por 40 seg; finalmente, 7 min a 72°C.

En cuanto al gen *BRAF* se utilizó un par de primers para amplificar el exón 15 reportados en la literatura (49). Las mezclas de las reacciones de PCR se realizaron como se describieron para el gen *APC*. El programa de amplificación utilizado fue: 94°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 45 seg; 58°C por 30 seg y 72°C por 30 seg, con la extensión final a 72°C por 10 min.

Posteriormente, los productos amplificados por PCR se examinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y coloreados con 2 µl de GelRed, para determinar el tamaño y calidad del fragmento amplificado. Cada gel se registró empleando un fotodocumentador de imágenes (UVP, USA) (Figura 3). Los productos amplificados se almacenaron a -20°C hasta el momento de realizar el secuenciamiento.

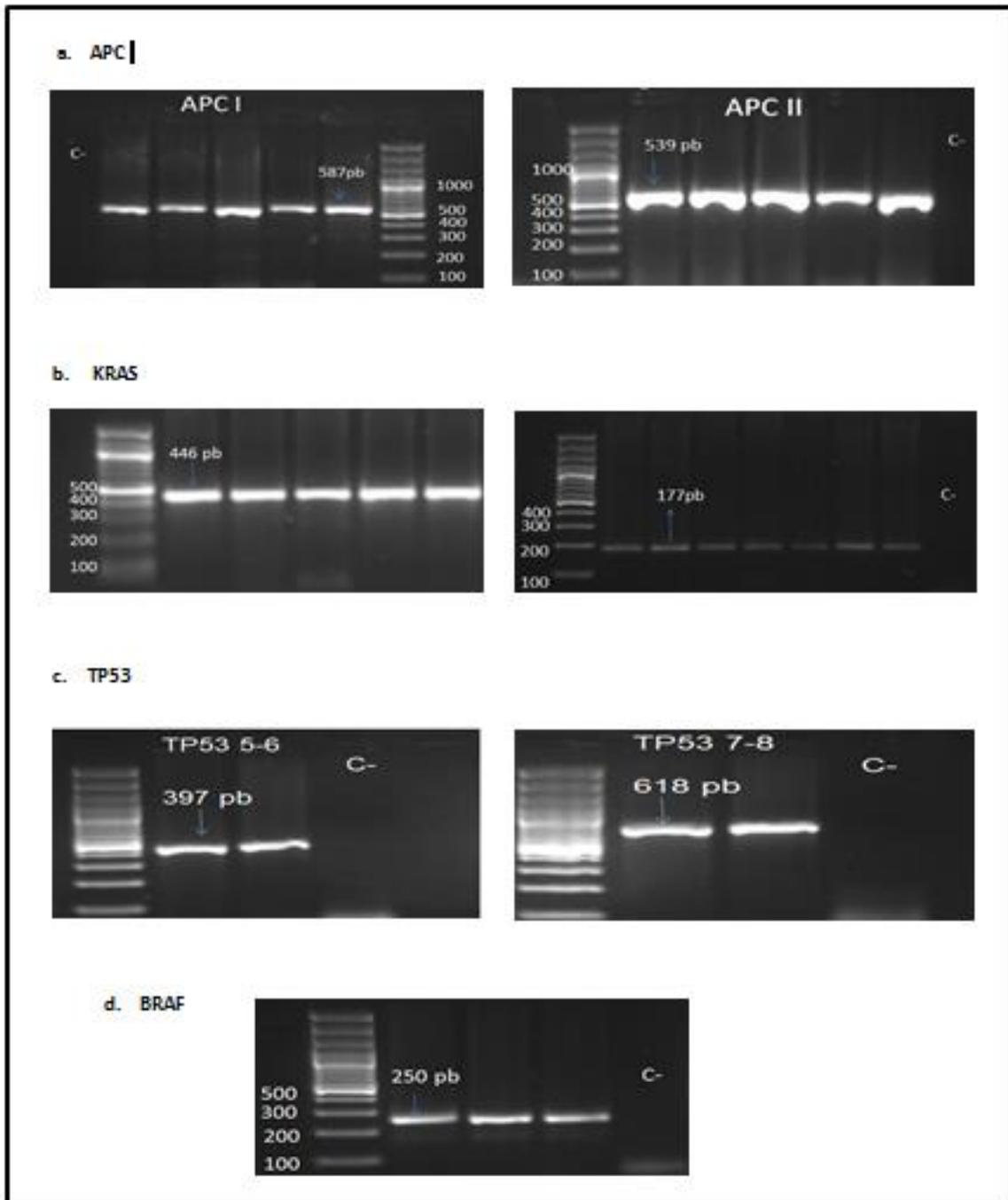


Figura 3. Productos amplificados por PCR para cada uno de los genes evaluados. Se muestra las electroforesis de las PCR con los primers de los genes *APC*, *KRAS*, *TP53* y *BRAF* obtenidas de las muestras de CCR. (a). Amplificación de un fragmento del exón 15 de *APC* con los primers *APC1* y *APC2*.

(b). Amplificación del exón 2 del gen *KRAS* de 446pb y amplificación del exón 3 del mismo gen de 177pb. (c). Amplificación de los exones 5-6 y 7-8 de *TP53* en dos reacciones diferentes con los primers *TP53* 5-6 y *TP53* 7-8. (d). Amplificación de un fragmento del exón 15 del gen *BRAF* de 250 pb. C-: Control negativo. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb (Fermentas).

7.6 SECUENCIAMIENTO

Los fragmentos amplificados se secuenciaron en ambas cadenas con los mismos primers utilizados en la PCR. El secuenciamiento directo se realizó en un analizador genético 3730xl DNA Analyzer de Applied Biosystems. Todas las muestras amplificadas fueron enviadas a MACROGEN (Seúl, Corea) para su purificación y posterior secuenciamiento. Los cromatogramas obtenidos en el secuenciamiento se editaron con el programa Chromas Pro, además se analizó detalladamente la calidad de los cromatogramas, las puntuaciones Phred asignadas a cada base, y la presencia de dobles picos, para realizar la edición manual de las secuencias (“forward” y “reverse”) por medio de la comparación de cada una con su secuencia complementaria y los valores Phred de ambas.

7.7 ANALISIS DE INESTABILIDAD MICROSATELITAL (MSI)

A partir del ADN extraído del tejido tumoral y sano de cada individuo incluido en el estudio, se llevó a cabo la amplificación por PCR de un panel de cinco marcadores STRs descritos por Suraweera *et al* (59), con algunas modificaciones: en una PCR dúplex se amplificaron los marcadores BAT 25 y BAT 26; en otra PCR se

amplificaron los marcadores NR-21 y NR 27; mientras que, el marcador NR-24 se amplificó en una sola reacción de PCR (Tabla 2).

Las PCR se realizaron en un volumen final de 10 μ l en una mezcla de reacción con concentraciones de 1X para el buffer de reacción 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 0.2 μ M de dNTPs, y 0.05 μ l de Taq DNA polimerasa; para los primers BAT- 25 y BAT-26 se emplearon 0.2 μ M y 0.15 μ M de cada primer respectivamente; para los primers NR-21 y NR 27 se emplearon 0.15 μ M de cada primer respectivamente y para el marcador NR-24 la concentración final de los primers fue 0.16 μ M.

El programa de amplificación para los marcadores BAT-25, BAT-26 y NR-24 fue: 94°C por 5 min, seguido de 28 ciclos de 94°C por 30 s; 55°C por 30 s, 72°C por 30 s; por último, una extensión final a 72°C por 20 min. Por otra parte, el programa de amplificación para los marcadores NR-21 y NR-27 fue: 94°C por 5 min, seguido de 29 ciclos de 94°C por 30 s; 55°C por 30 s, 72°C por 30 s; por último, una extensión final a 72°C por 20 min.

Los tamaños alélicos se resolvieron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI 3770. Se consideró la presencia de MSI cuando se detectaron alelos en la muestra de ADN tumoral que no estaban presentes en la muestra de ADN control (tejido sano). Los tumores se clasificaron como MSI alta (MSI-H), cuando presentaron dos o más marcadores inestables; sí se observó inestabilidad en un sólo marcador se denominó MSI baja (MSI-L) y los casos donde no se observó inestabilidad en ninguno de los cinco marcadores STRs analizados se clasificaron como MSI estable (MSS).

Tabla 2. Marcadores STRs y secuencias de los primers utilizados para el análisis de la inestabilidad microsatelital. También, se presenta el fluorocromo con que se marcó cada primer y el tamaño aproximado en pares de bases.

Primer	Forward	Reverse	Fluorocromo	Pb
BAT-25	5'TCGCCTCCAAGAATGTAAGT3'	5'TCTGCATTTTAACTATGGCTC3'	5' NED	± 124
BAT-26	5'CTGCGGTAATCAAGTTTTAG 3'	5'AACCATTCAACATTTTAAACCC3'	5' FAM	± 182
NR-21	5'CTCCGCATTACACTTTCTG3'	5'GACACATCCCTTTCAGCAGA3'	5' HEX	± 151
NR-27	5'AGTTGAAAAGCCCAACGTCTGT3'	5'AAAGAGGTTCTGAGTCGATAAATACT3'	5' FAM	± 137
NR-24	5'GCAGTGAGCGGAGATTGTG3'	5'CCTTAACGTGATCCCCATTG3'	5' HEX	± 160

7.8 ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL GEN *MLH-1*

Conversión del ADN tumoral con Bisulfito de Sodio

Una vez extraído el ADN, se procedió a realizar la conversión con bisulfito de sodio mediante el kit comercial EZ- DNA Methylation Direct Kit de Zymo Research, siguiendo las recomendaciones del fabricante como se describe a continuación:

Se adicionaron 20 µl de ADN a 130 µl de CT-conversion reagent solution en un tubo de PCR. Se mezcló la muestra por inversión y se centrifugó brevemente. Posteriormente, el tubo de PCR se llevó al termociclador y se realizó el siguiente ciclo térmico: 98°C por 8 min, 64°C por 3.5 h y finalmente se colocó a 4°C por 20 h. Una vez terminado este proceso, se adicionó 600 µl de buffer M-binding a la muestra y se depositó en una columna Zymo-spinIC; posteriormente se centrifugó a 10.000 g por 30 s. Luego, se agregó 100 µl de buffer M-wash a la columna y se

centrifugó nuevamente a 10.000 g por 30 s. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de buffer M-desulphonation a la columna y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente, pasado este tiempo, se volvió a centrifugar a 10.000 g por 30 s. Seguidamente, se realizaron dos lavados con 200 µl de buffer M-wash centrifugando en cada uno a 10.000 g por 30 s. Para terminar, se colocó la columna en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se adicionaron 10 µl de M-elution buffer directamente a la columna, posteriormente se centrifugó a 10.000 g X 30 s. En este paso, el ADN está listo para ser amplificado inmediatamente por PCR.

La técnica MS-PCR se utilizó para determinar la metilación del promotor del gen *MLH1*. El ADN tumoral modificado con bisulfito de sodio se amplificó por PCR en un termociclador Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA). La MS-PCR se realizó en un volumen final de 10 µl que contenía 2 µl de ADN modificado, buffer 1X, 1,5 µM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada cebador y 0,8 µl de Taq polimerasa. Se utilizó un par de cebadores que reconocen en el promotor regiones metiladas y otro par para regiones no metiladas (Tabla 3 y Tabla 4). Los productos amplificados por la MS-PCR se corrieron en una electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed. Las bandas se visualizaron directamente en un fotodocumentador de geles.

Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados para la amplificación de la región metilada y no metilada en el promotor del gen *MLH1* en las muestras de CCR analizadas.

Gen	Primers	Forward	Reverse	pb
MLH-1	Metilado	5'CGTTATATATCGTTCGTAGTATTCGTGTTT3'	5'CTATCGCCGCCTCATCGT3'	100
	No Metilado	5'GAAGAGTGGATAGTGATTTTAAATGT3'	5'ATCTCTTCATCCCTCCCTAAAACA3'	100

Tabla 4. Condiciones de la MS- PCR para el análisis de metilación en el promotor del gen *MLH1* en las muestras de CCR analizadas.

Ciclo	Desnaturación inicial	Desnaturación	Alineamiento	Extensión	Extensión final
		35 ciclos			
Temperatura T°C	95	95	60	72	72
Tiempo	3 min	30 seg	45 seg	10 seg	10 min

7.9 ANÁLISIS DE RESULTADOS.

El análisis de mutaciones en los genes *APC*, *KRAS*, *TP53* y *BRAF*, se realizaron en los cromatogramas obtenidos del secuenciamiento, los cuales se editaron mediante el programa Chromas Pro. Adicionalmente, se realizó un análisis detallado de la calidad de cada uno de los cromatogramas obtenidos de las muestras, mediante los valores Phred asignados a cada base.

Con el programa CAP3 (A DNA sequence assembly program), se realizó un “contig” con la secuencia “Forward” y “Reverse” para cada muestra de CCR; luego se utilizó el programa Clustal Omega para realizar la comparación del contig con la secuencia de referencia reportada en el Genbank para cada gen analizado. El

gen *APC* se comparó con la secuencia codificada como NT_034772.6; *KRAS* con NT_009714.17; *TP53* con NT_010718.16 y *BRAF* con NM_004333.4.

Todos los resultados obtenidos se registraron en tablas con el programa Excel y para el análisis de estadística descriptiva se utilizó el programa SPSS versión 23 (IBM Corp). Para las variables cualitativas como las sociodemográficas y las genéticas se hicieron tablas de frecuencias y para la edad en años se informó la media y su desviación estándar, debido a que se distribuyó normalmente, lo cual fue verificado mediante la prueba Shapiro-Wilk.

Mediante las pruebas de chi-cuadrado o por corrección de continuidad por Yates y la prueba exacta de Fisher se exploró la asociación entre las mutaciones, polimorfismos, inestabilidad microsatelital y la metilación identificados en las muestras analizadas con el diagnóstico histopatológico del paciente, la edad y el sexo. Para todas las pruebas estadísticas realizadas se utilizó una significancia del 95%; es decir, $p < 0.05$, la prueba se consideró estadísticamente significativa.

8. RESULTADOS

8.1 CARACTERIZACION DE LA POBLACION DE ESTUDIO

Se estudiaron 44 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de CCR, provenientes de diferentes instituciones médicas de la ciudad de Medellín. El 61,4% (27/44) eran mujeres con una edad media de 58,6 años (rango 12-90) y el 38,6 % (17/44) eran hombres con una edad media de 64 ± 12 años (rango 42-81). La edad promedio en ambos géneros fue de $60,5 \pm 17,3$ años. Nueve pacientes tenían menos de 50 años de edad.

8.2 CLASIFICACION HISTOPATOLOGICA DE LAS MUESTRAS TUMORALES

De los 44 pacientes, el 81,8% (36/44) tenían cáncer de colon y el 11,3% (5/44) de recto, en tres casos (6,9%) no fue posible determinar la localización del tumor. Las muestras se clasificaron según el tipo histológico como adenocarcinoma bien diferenciado en el 54,5 % (24/44), adenocarcinoma moderadamente diferenciado el 22,7% (10/44), adenocarcinoma mucinoso en el 11,4% (5/44) y sarcoma miofibroblástico el 2,2% (1/44). En cuatro casos no fue posible clasificar el tumor (9%) (Tabla 5).

Tabla 5. Descripción de los hallazgos histopatológicos y moleculares en los 44 pacientes con CCR estudiados.

	n (%)	APC n (%)		KRAS n (%)		TP53 n (%)		MSI n (%)		
		Normal	mutado	Normal	mutado	Normal	mutado	MSI-H	MSI-L	MSS
No. De pacientes	44	36 (81,8)	8 (18,1)	33 (75)	11 (25)	42 (95,4)	2 (4,5)	5 (11,3)	7 (15,9)	32 (72,7)
Edad media	60,5	57	58,5	57	47,5	57	62,5	68	57,1	61
Genero										
Masculino	17 (38,6)	15 (34)	2 (4,5)	13 (29,5)	4 (9)	17 (38,6)	-	4 (9)	4 (9)	9 (20,4)
Femenino	27 (61,3)	21 (47,7)	6 (13,6)	20 (45,4)	7 (15,9)	25 (56,8)	2 (4,5)	1 (2,2)	3 (6,8)	23 (52,2)
Estadio del CCR										
I	8 (21,1)	7 (15,9)	1 (2,2)	7 (15,9)	1 (2,2)	8 (18,1)	-	1 (2,2)	2 (4,5)	5 (11,3)
II	13 (34,2)	11 (25)	2 (4,5)	12 (27,2)	1 (2,2)	11 (25)	2 (4,5)	3 (6,8)	1 (2,2)	9 (20,4)
III	6 (15,8)	5 (11,3)	1 (2,2)	5 (11,3)	1 (2,2)	6 (13,6)	-	-	-	6 (13,6)
IV	11 (28,9)	7 (15,9)	4 (9)	5 (11,3)	6 (13,6)	11 (25)	-	-	2 (4,5)	9 (20,4)
Tipo Histológico										
A. Bien diferenciado	24 (54,4)	20 (45,4)	5 (11,3)	18 (40,9)	7 (15,9)	23 (52,2)	2 (4,5)	3 (6,8)	4 (9)	18 (40,9)
A. moderadamente diferenciado	10 (22,7)	9 (20,4)	1 (2,2)	10 (22,7)	-	10 (22,7)	-	1 (2,2)	1 (2,2)	8 (18,1)
A. Mucinoso	5 (11,3)	3 (6,8)	1 (2,2)	2 (4,5)	3 (6,8)	5 (11,3)	-	1 (2,2)	-	4 (9)
Sarcoma Miofibroblastico	1 (2,2)	-	1 (2,2)	-	-	-	-	-	-	-
Localización del tumor										
Ascendente	16 (36)	11 (25)	5 (11,3)	11 (25)	5 (11,3)	15 (34,0)	1 (2,2)	2 (4,5)	3 (6,8)	11 (25)
transverso	5 (11,3)	4 (9)	1 (2,2)	2 (4,5)	3 (6,8)	5 (11,3)	-	1 (2,2)	1 (2,2)	3 (6,8)
Descendente	15 (34)	14 (40,9)	1 (2,2)	13 (38,6)	2 (6,8)	15 (43,1)	-	2 (4,5)	2 (4,5)	11 (36,3)
Recto	5 (11,3)	4 (9)	1 (2,2)	4 (9)	1 (2,2)	4 (9)	1 (2,2)	-	-	5(11,3)

Las muestras analizadas se localizaron en: colon ascendente 36,3% (16/44), colon descendente 34% (15/44), transverso y recto con la misma frecuencia del 11,3% (5/44), respectivamente. En el 6,8% (3/44) de los casos no fue posible determinar la localización del tumor.

La clasificación TNM se realizó en 38 muestras, mientras que en seis no fue posible determinarla. La mayoría de las muestras se clasificaron en los estadios II

y IV con el 34,2% y 28,9 % de los casos respectivamente, seguidos del estadio I y III con un 21,1% y 15,8% respectivamente; por lo tanto, el 55,3 % (21/38) de las muestras evaluadas estaban en estadios tempranos del cáncer (I y II) y el 44,7% restante (17/38) en estadios avanzados (Tabla 6).

Tabla 6. Estadio y TNM de las 38 muestras de CCR analizadas de acuerdo con el resultado histopatológico.

Estadio	TNM	No. Casos	%
I	T1N0M0	8	21.1
	T2N0M0		
II	T3N0M0	13	34.2
	T4N0M0		
III	T3N1M0	6	15.8
	T4N1M0		
IV	T3N1M1	11	28.9
	T3N2M1		
	T4aN1M0		
	T4bN0M0		
	T4bN0M1		
Total		38	100

8.3 RESULTADOS MOLECULARES

La frecuencia total de mutaciones en las 44 muestras analizadas fue de 47,7% (21/44). Se identificaron en total 21 mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* (Tabla 7). Las mutaciones se presentaron con mayor frecuencia en adenocarcinomas bien diferenciados (66,6%) (14/21), cinco (23,8%) en adenocarcinoma mucinosos, una (4,7%) (1/21) en adenocarcinoma moderadamente diferenciado y una en sarcoma miofibroblástico.

Las mutaciones identificadas se encontraron con mayor frecuencia en muestras obtenidas de colon ascendente con el 52,3% de los casos (11/21); seguido de las del colon transversal con el 19% (4/21); finalmente, el colon descendente y recto con la misma frecuencia del 14,2% respectivamente (3/21). En las muestras analizadas no se encontraron mutaciones simultáneas en los tres genes evaluados. Sin embargo, solo en cuatro muestras (9%) se observaron mutaciones simultáneas en los genes *APC* y *KRAS*.

El gen mutado con mayor frecuencia fue *KRAS* en el 25% (11/44), seguido del gen *APC* con el 18,1% (8/44) y *TP53* con el 4,5% (2/44). Todas las mutaciones identificadas eran sustitución de bases; los tipos de mutación sin sentido y de cambio de sentido fueron los más comunes, con el 71,5 % y el 28,5% respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Mutaciones identificadas en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en los 44 pacientes CCR analizados.

Gen	No. Casos	Posición	codón	Mutación	Cambio en aa**	Tipo de Cambio	Consecuencia
APC	1	c.4420A>G	1474	ACT→GCT	p. A1474T	Sustitución	Cambio de sentido
	3	c.4463 T>C	1488	TTA→TCA	p.L1488S	Sustitución	Cambio de sentido
	1	c.4562 G>T	1521	GAA→TAA	p.E1521*	Sustitución	Sin sentido
	1	c.4651A>T	1551	AAA→TAA	p.K1551*	Sustitución	Sin sentido
	2	c.4348C>T	1450	CGA→TGA	p.R1450*	Sustitución	Sin sentido
KRAS	6	c.35G>A	12	GGT→GAT	P.G12D	Sustitución	Cambio de sentido
	2	c.34G>A	12	GGT→AGT	P.G12S	Sustitución	Cambio de sentido
	3	c.38G>A	13	GGC→GAC	P.G13D	Sustitución	Cambio de sentido
TP53	1	c.493C>T	165	CAG→TAG	p.Q165*	Sustitución	Sin sentido
	1	c.546C>A	182	TGC→TGA	P.C182*	Sustitución	Sin sentido

* Representa codón de parada. **aa = aminoácido.

Por otra parte, en estas muestras se identificó un alto porcentaje de polimorfismos en los tres genes evaluados. En total se encontraron cinco polimorfismos diferentes (Tabla 8). El gen *APC* fue el que presentó mayor frecuencia de polimorfismos, siendo el p.T1493T el más común en el 75% (33/44) de las muestras. En este gen también se identificó otro polimorfismo, el p.P1442P en una sola muestra 2,2% (Figura 4). El segundo gen con más polimorfismos identificados fue *TP53*, con dos variantes concomitantes en el Intrón 7, el c.782+72 y el c.782+92, con una frecuencia del 20,4% (9/44) (Figura 5). Finalmente, en el gen *KRAS* se encontró un polimorfismo en el Intrón 2, el c.111+190, en el 18,1% de las muestras (8/44) (Figura 6). La coexistencia de polimorfismos presentó la siguiente distribución: polimorfismos en los genes *APC* - *KRAS* se observaron en el 13,6 % (6/44) de las muestras; en los genes *APC* - *TP53* se presentaron en el 15,9 % (7/44); no se encontraron polimorfismos simultáneamente en los genes *KRAS* - *TP53*. Adicionalmente, siete muestras tenían simultáneamente mutaciones y polimorfismos. Todos los polimorfismos identificados en este estudio están reportados en la bases de datos de NCBI y en 1000 genomas.

Tabla 8. Polimorfismos identificados en los 44 individuos con CCR.

GEN	No. Casos	%	Exón/ Intrón	Posición c.ADN	Cambio aa *	SNP
<i>APC</i>	33	75	Exón 15	c.4479G>A	T1493T	rs41115
	1	2.3	Exón 15	c.4326 T>A	P1442P	rs67622085
<i>KRAS</i>	8	18.2	Intrón 2	c.111+190A>T	NA**	rs12228277
<i>TP53</i>	9	20.5	Intrón 7	c.782+72C>T	NA**	rs12947788
	9	20.5	Intrón 7	c.782+92T>G	NA**	rs12951053

*aa= aminoácido. **NA= No Aplica.

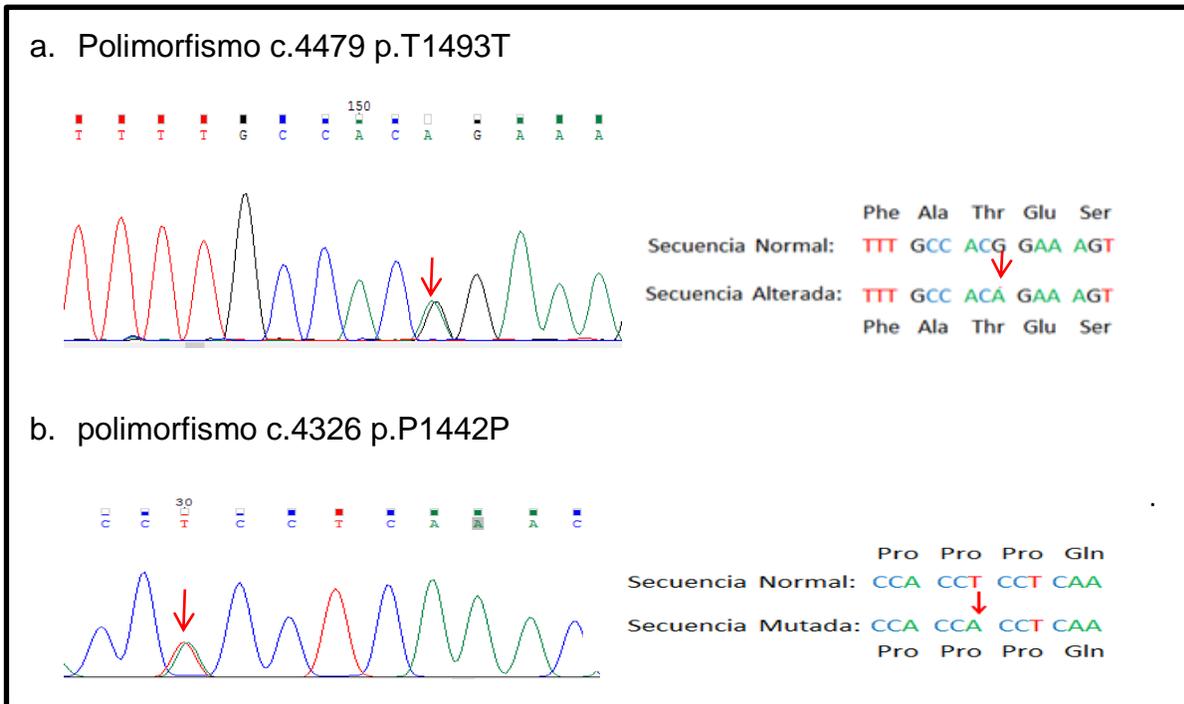


Figura 4. Polimorfismos identificados en el exón 15 del gen APC en muestras provenientes de personas con CCR. (a) Polimorfismo de transición G>A en el nucleótido c.4479 que genera un cambio sinónimo en la secuencia de la proteína (p.T1493T). (b) Polimorfismo de transversión T>A en el nucleótido c.4326, que genera un cambio de sinónimo en la proteína (p.P1442P).

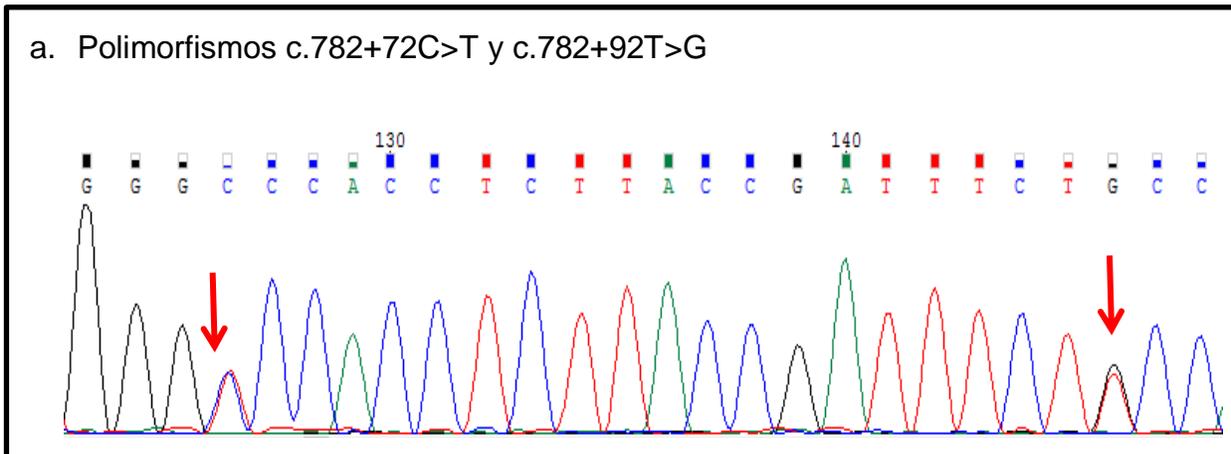


Figura 5. Cromatograma que presenta los polimorfismos concomitantes identificados en el gen *TP53*. (a) Polimorfismos c.782+72C>T y c.782+92T>G encontrados simultáneamente en los intrones 7-8 del gen *TP53*.

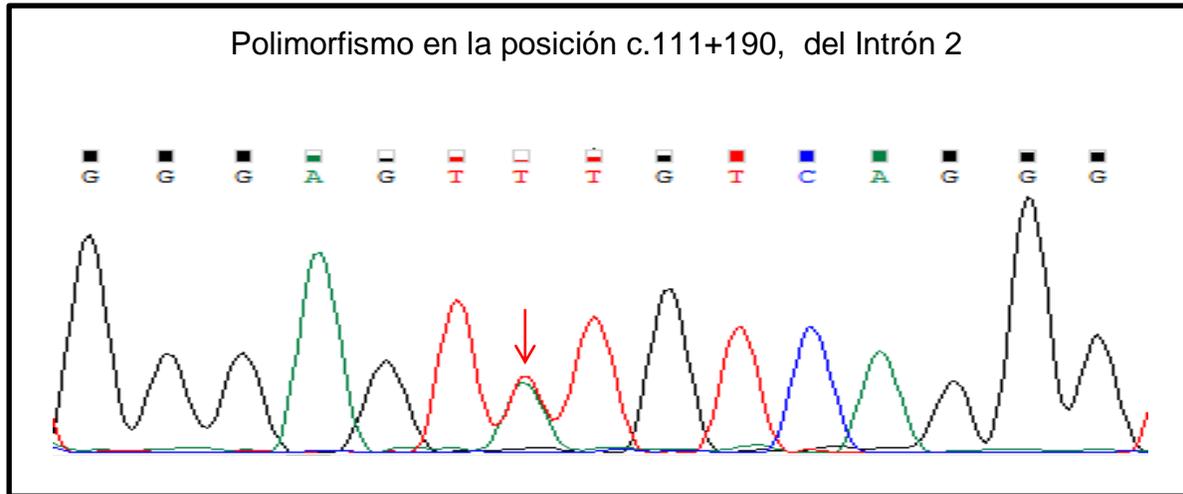


Figura 6. Polimorfismo identificado en *KRAS* en muestras provenientes de personas con CCR. Este polimorfismo se encuentra en el intrón 2 y por lo tanto, no tiene un efecto conocido en la proteína.

8.3.1 ANALISIS MOLECULAR DEL GEN *APC*

La frecuencia de mutaciones en el gen *APC* fue del 18,1% (8/44) (Tabla 7). Tres mutaciones se detectaron dentro de la región MCR. Dos corresponden a mutaciones de cambio de sentido c. 4420 A>G, p. A1474T y c. 4463 T>C, p.L1488S; mientras que la otra fue c.4348C>T, p.R1450* que genera un codón de parada prematuro, generando una proteína truncada. Además, se detectaron otras dos mutaciones, por fuera de la región MCR, estas corresponden a mutaciones sin sentido y generan una proteína incompleta p.E1521*, p.K1551* (Figura 7).

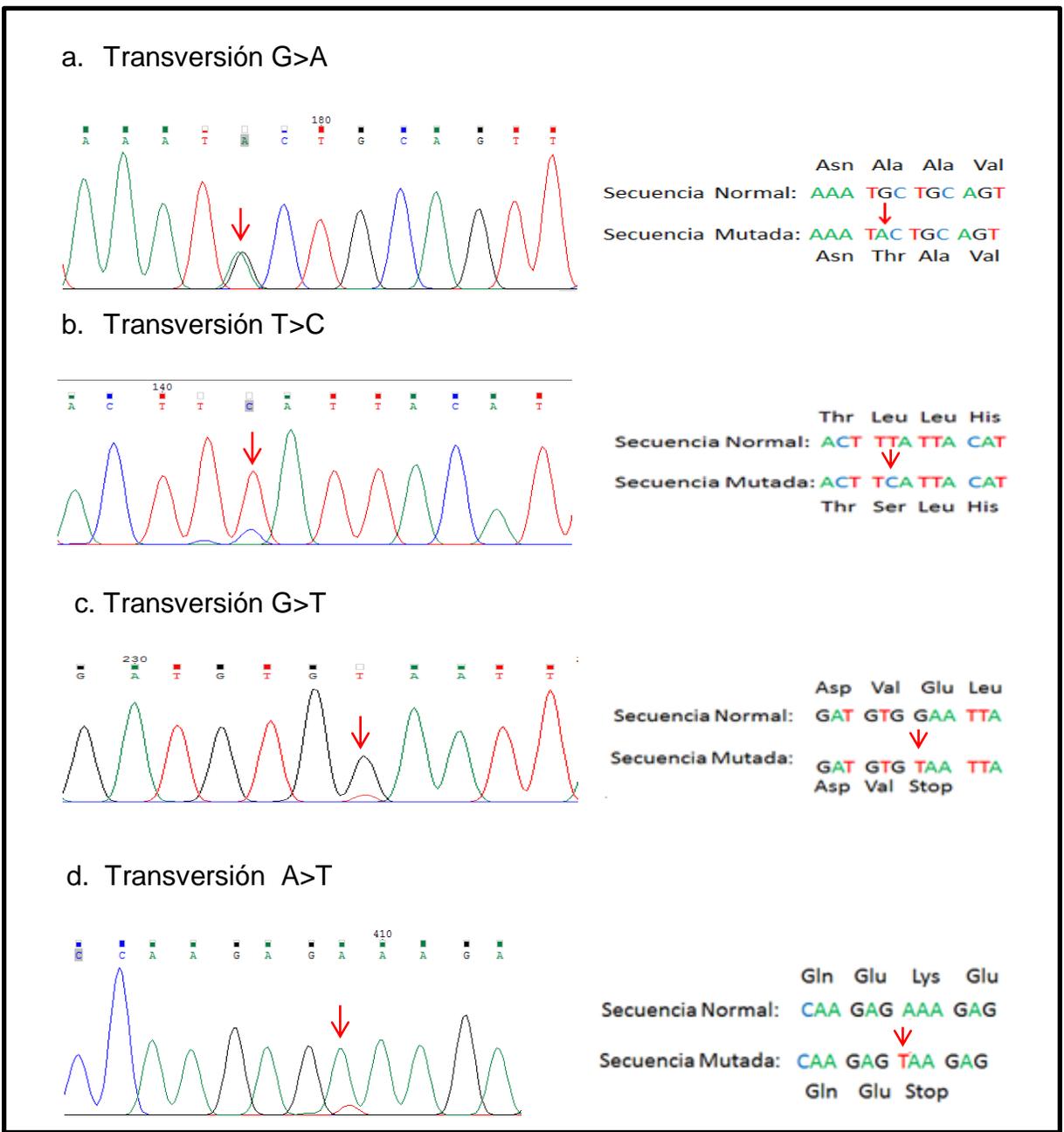


Figura 7. Cromatogramas que muestran algunos ejemplos de mutaciones identificadas en el gen APC en muestras de CCR. (a)Transversión c.4420 G>A genera una mutación de cambio de sentido, p.Ala1474Thr. (b)Transversión c.4463 T>C genera una mutación de cambio de sentido, p.Leu1488Ser. (c.)Transversión c.4562 G>T produce un codón de parada p.E1521*. (d.)Transversión A>T en el nucleótido c.4651, que produce un codón de parada.

8.3.2 ANALISIS MOLECULAR DEL GEN *KRAS*

La frecuencia de mutaciones en el gen *KRAS* fue del 25 % (11/44). Las mutaciones identificadas ocurrieron en los codones que codifican para Glicina (G). Estas mutaciones se encontraron en los nucleótidos GGT (c.34 c.35 c.36) y GGC (c.37 c.38 c.39) que corresponden a los codones 12 y 13 (Figura 8).

Las mutaciones fueron más frecuentes en el codón 12 (8/11) y generaron un cambio de sentido en la proteína; de estas mutaciones, seis ocurrieron en la posición p.G12D c.35G>A y dos casos fueron en la posición p.G12S c.34G>A. Así mismo, en el codón 13 se identificaron tres casos con mutaciones en la posición c.38G>A que generan un cambio de sentido p.G13D (Figura 8).

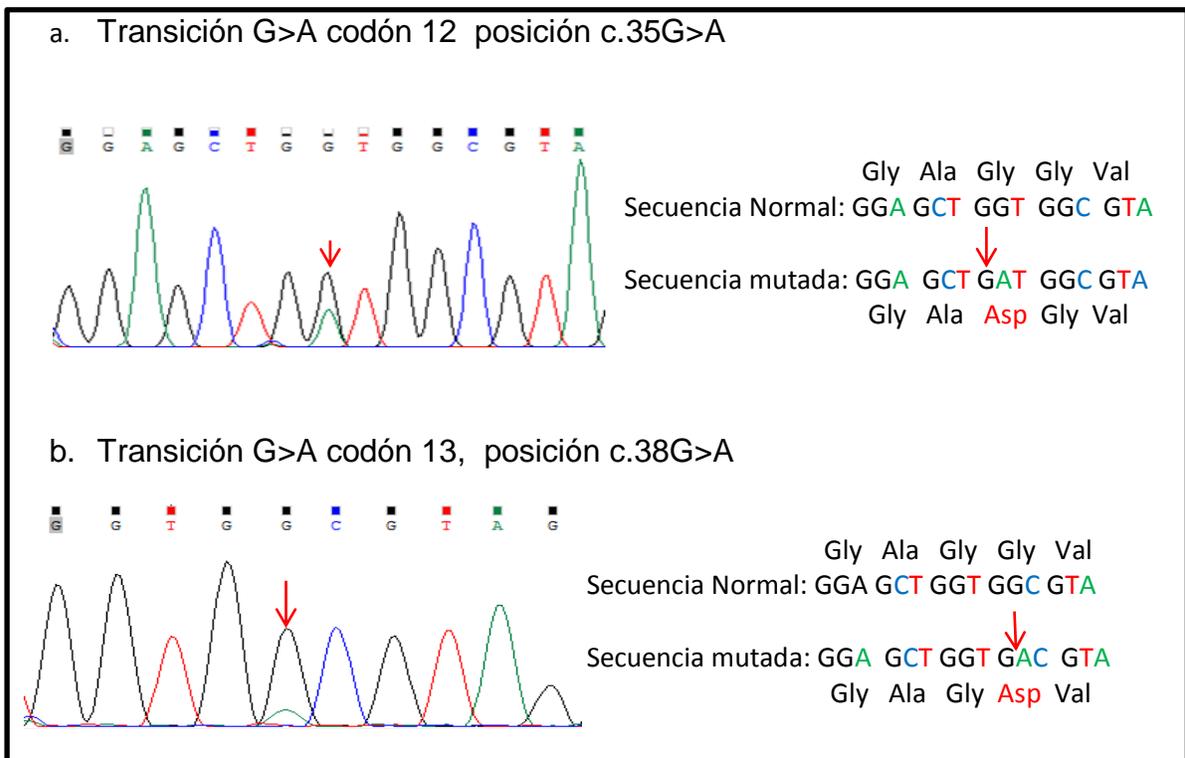


Figura 8. Cromatogramas que muestran ejemplos de mutaciones identificadas en el gen *KRAS* en muestras de CCR. (a.) Transición en el codón 12 que genera un cambio de sentido en la proteína. (b.) Transición en el codón 13 que genera el cambio de sentido en la proteína.

En 15 muestras con resultados negativos para mutaciones en los codones 12 y 13 de *KRAS* se realizó un análisis molecular del codón 61 del exón 3. En todas las muestras no se identificaron mutaciones o polimorfismos en este codón (Figura 9).

Las mutaciones identificadas en *KRAS* fueron más comunes en el colon ascendente; en los adenocarcinomas bien diferenciados y en el estadio IV; con respecto al estado de *KRAS* mutado y el TNM de las muestras analizadas, se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,039$), similar a lo encontrado con el grado de diferenciación (adenocarcinoma bien diferenciado) ($p=0,035$).

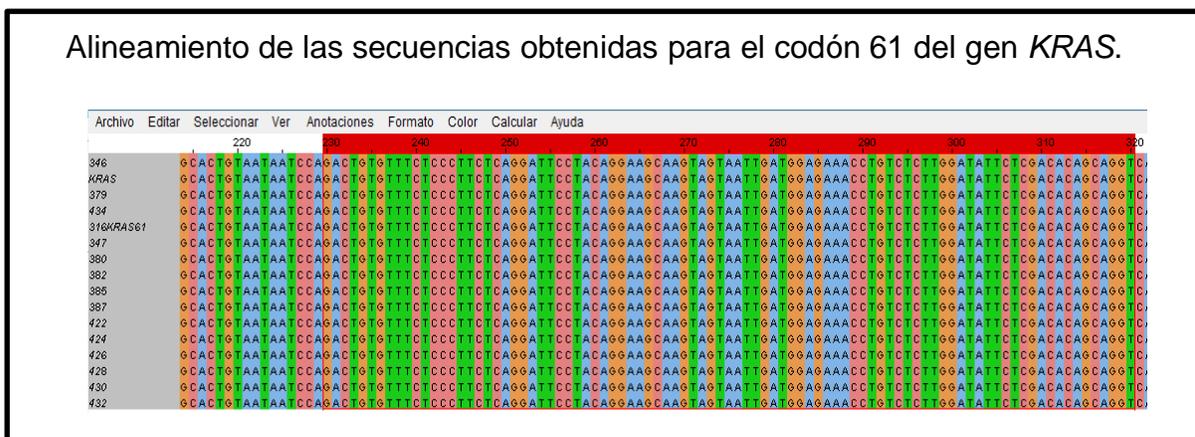


Figura 9. Resultados del análisis molecular del exón 3 del gen *KRAS*. Se muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia, a partir de 15 muestras de CCR con resultados negativos para

mutaciones en los codones 12 y 13. En estas muestras no se identificaron cambios moleculares en el codón 61.

8.3.3 ANALISIS MOLECULAR DEL GEN *TP53*

La frecuencia de mutaciones en el gen *TP53* fue del 4,5% (2/44). Las mutaciones identificadas se localizaron en el exón 5 y generaron un codón de parada. En la posición c.493 se presentó una transición C>T, en el codón CAG, que codifica para el aminoácido p.Q165*; la otra mutación se detectó en la posición c.546, una transversión C>A en el codón TGC que codifica para el aminoácido P.C182* (Figura 10).

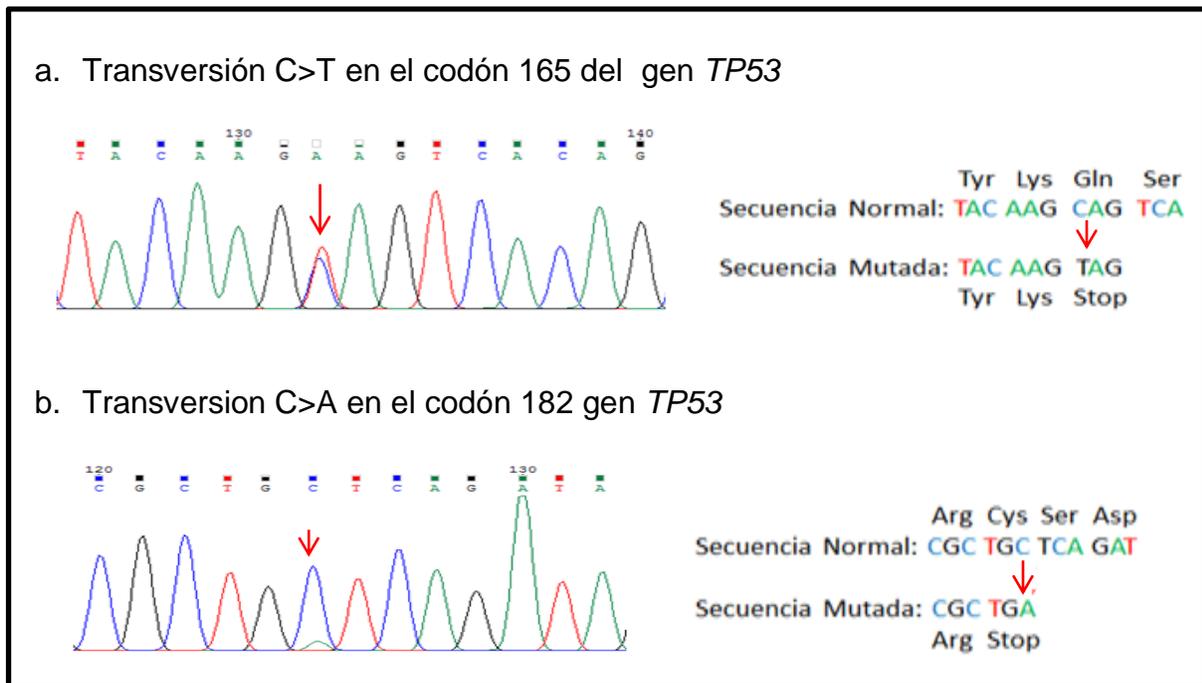


Figura 10. Cromatogramas que muestran las mutaciones sin sentido identificadas en el gen *TP53* en CCR. (a) Mutación c.493C>T, p.Q165* en el exón 5. (b) Mutación c.546C>A p.C182* en el exón 5.

8.3.4 ANALISIS DE INESTABILIDAD MICROSATELITAL (MSI)

En las 44 muestras se determinó que la frecuencia de inestabilidad microsatelital (MSI) fue del 27,2% (12/44). La MSI-H se determinó en el 11,3% (5/44) de las muestras (Figura 11); MSI-L en el 15,9% (7/44) (Figura 12) y MSS en el 72,7% (32/44); es decir, no presentaron inestabilidad microsatelital (Figura 13).

La MSI fue más común en hombres (8/44) que en mujeres (4/44), con un 18% y 9% respectivamente, con una diferencia entre los dos grupos estadísticamente significativa ($p=0,047$). En cuanto al tipo histológico, la MSI se encontró en el 15,9% (7/44) de los adenocarcinomas bien diferenciado, seguido de los adenocarcinomas moderadamente diferenciados 4,5% (2/44) y en el 2,2% de los mucinosos (1/44), en dos casos no fue posible tener la información del tipo histológico. Con respecto a la localización del tumor, el 11,3 % (5/44) se presentó en colon ascendente, el 4,5% (2/44) en colon transverso y el 11,3% (5/44) en colon descendente. Además, fue más frecuente en los estadios I y II (58,3%) de los tumores analizados.

En dos casos con MSI positiva se encontró que presentaban la mutación p.G12D en el gen *KRAS*; por otra parte, se observó el polimorfismo rs41115 del gen *APC* en el 66,6% de las muestras con MSI +. Así mismo, se encontraron los polimorfismos c.111+190 del gen *KRAS* y c.782+72 +92 del gen *TP53* en el 16,6% y el 25% de las muestras con MSI+ respectivamente.

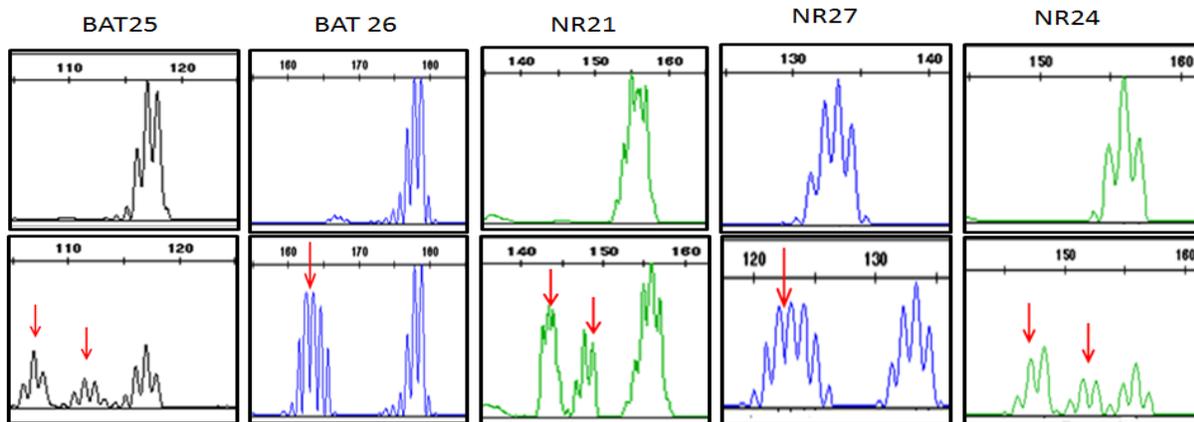


Figura 11. Imagen de la electroforesis capilar de una muestra de CCR con MSI-H. En este caso se presenta un individuo con MSI-H; en la parte superior de la imagen se observa el perfil de los marcadores STRs del tejido sano. En la parte inferior se observa el perfil del tejido tumoral del mismo caso, que demuestra la MSI+ en todos los marcadores evaluados. Las flechas rojas indican la inestabilidad en cada uno de los marcadores.

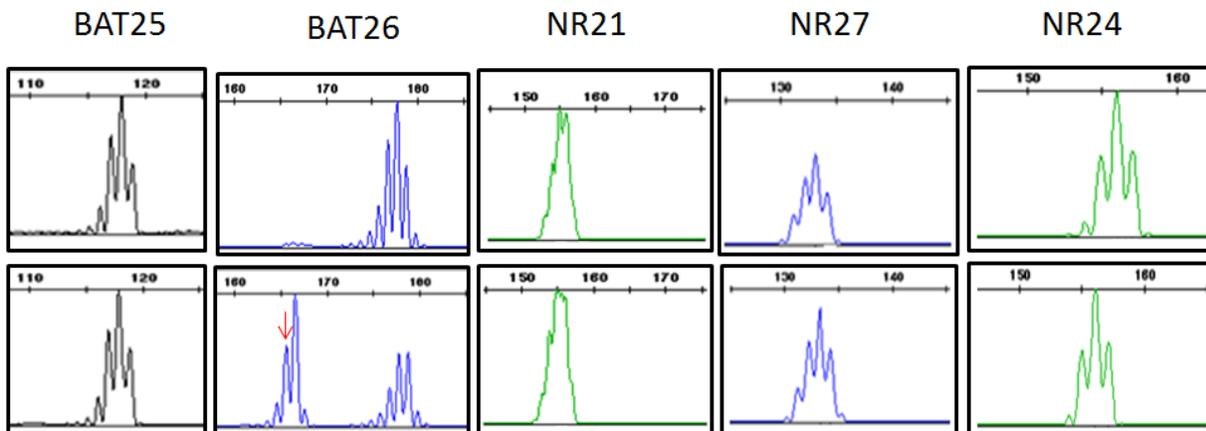


Figura 12. Imagen de la electroforesis capilar de una muestra de CCR con MSI-L. En la parte superior de la imagen se observa el perfil para los cinco marcadores STRs del tejido sano. En la parte inferior se observa el resultado del

tejido tumoral del mismo caso; se observa inestabilidad solo en el marcador BAT-26; se indica con la flecha roja.

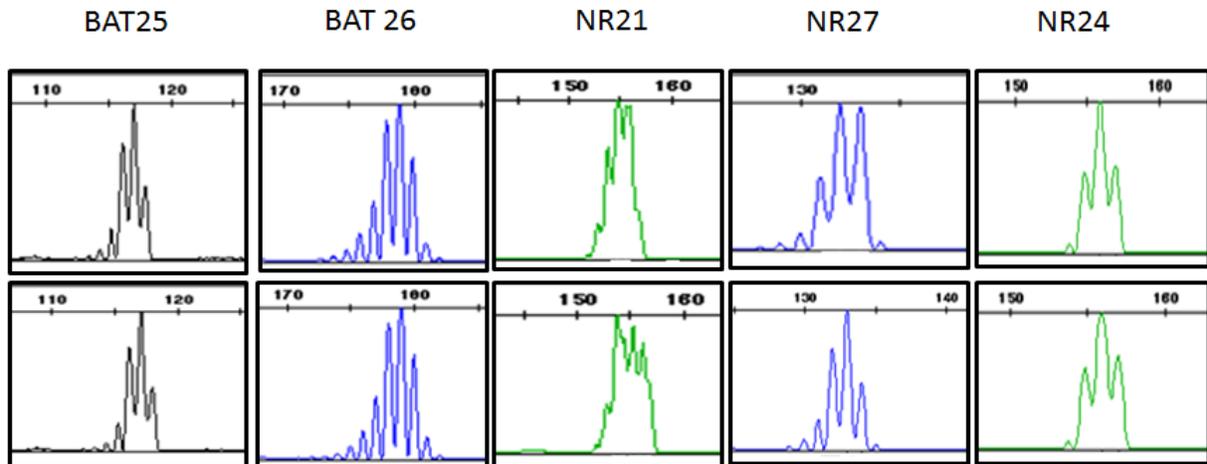


Figura 13. Imagen de la electroforesis capilar de una muestra de CCR con resultado MSS. En la parte superior de la imagen se observa el perfil del tejido sano. En la parte inferior se observa el resultado del tejido tumoral del mismo caso; no se observan nuevos picos adicionales de amplificación en el perfil del tejido tumoral, por lo que este caso se clasifica como MSS.

Por otra parte, del panel de cinco marcadores STRs empleados para determinar la MSI, BAT-26 fue el de mayor inestabilidad, con el 27% (12/44) de las muestras; los otros cuatro marcadores, se encontraron inestables con las mismas frecuencias del 11% (5/44) (Tabla 9).

Tabla 9. Distribución y frecuencia de la Inestabilidad Microsatelital por marcador STR en las 44 muestras analizadas.

STR	No INDIVIDUOS	%
BAT25	5	11
BAT26	12	27
NR-27	5	11
NR-24	5	11
NR-21	5	11

Así mismo, se encontró que todas las muestras con MSI-H presentaron inestabilidad en los cinco marcadores utilizados; mientras que, en las muestras con MSI-L solo presentaron inestabilidad microsatelital en el marcador BAT-26 (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución y frecuencia de los marcadores STRs inestables en las 12 muestras de CCR que presentaron MSI positiva.

No STR INESTABLES	No INDIVIDUOS	%
1	7	58.3
2	0	0.0
3	0	0.0
4	0	0.0
5	5	41.7

Adicionalmente, de las 44 muestras con análisis de MSI, se seleccionaron 12 muestras que tenían resultados de MSI positiva y 11 muestras MSS para realizar el análisis molecular del gen *BRAF*, específicamente para identificar la mutación

V600E en las 23 muestras seleccionadas. En estas muestras no se identificó la mutación V600E o polimorfismos en el exón 15 de *BRAF* (Figura 14).

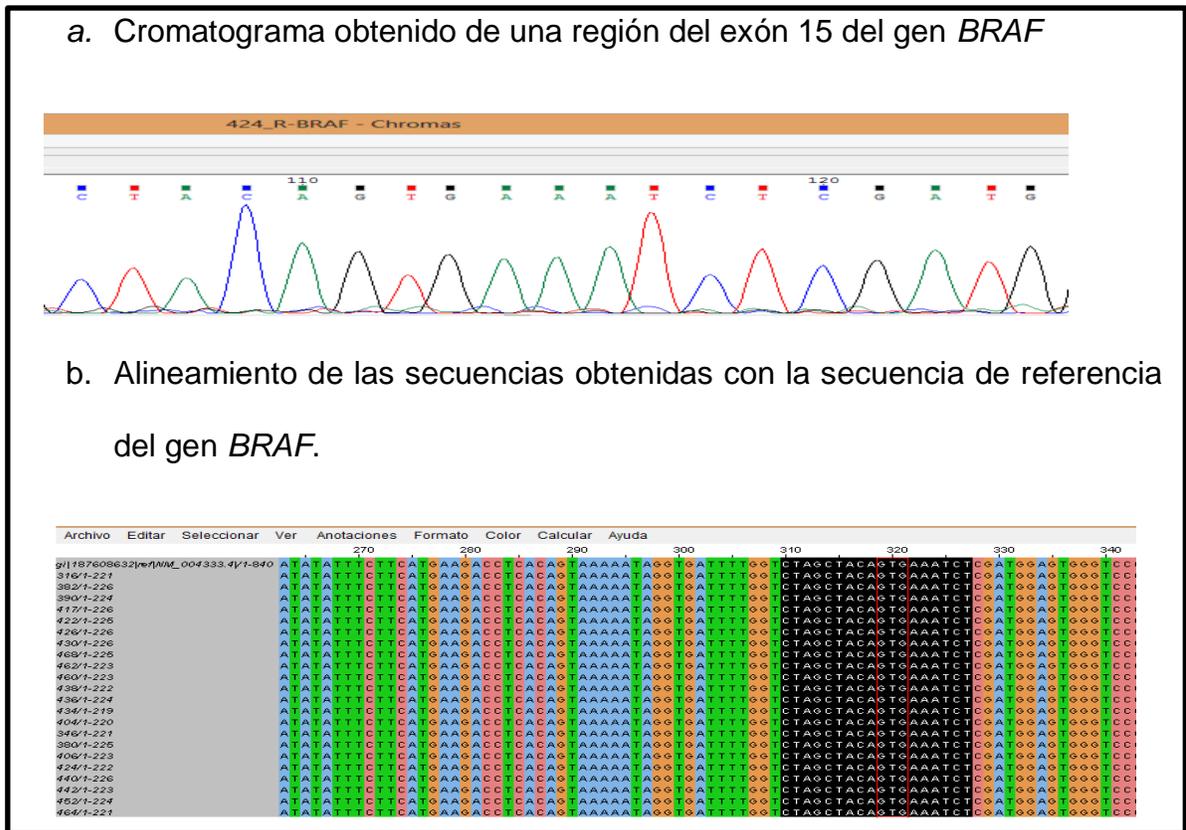


Figura 14. Resultados del análisis molecular del gen *BRAF*. (a) Cromatograma normal del exón 15 del gen *BRAF*. (b) Alineamiento de las secuencias de las muestras evaluadas generado con la de referencia. No se detectó la mutación V600E en las 23 muestras analizadas de CCR.

8.3.5 ANALISIS DE METILACION DEL PROMOTOR DEL GEN *MLH1*

El estado de metilación del promotor del gen *MLH1* se determinó en 41 de las 44 muestras analizadas. La frecuencia de metilación del gen *MLH1* fue del 73,1%

(30/41); mientras que, el 26,8% (11/41) de las muestras no estaban metiladas (Figura 15).

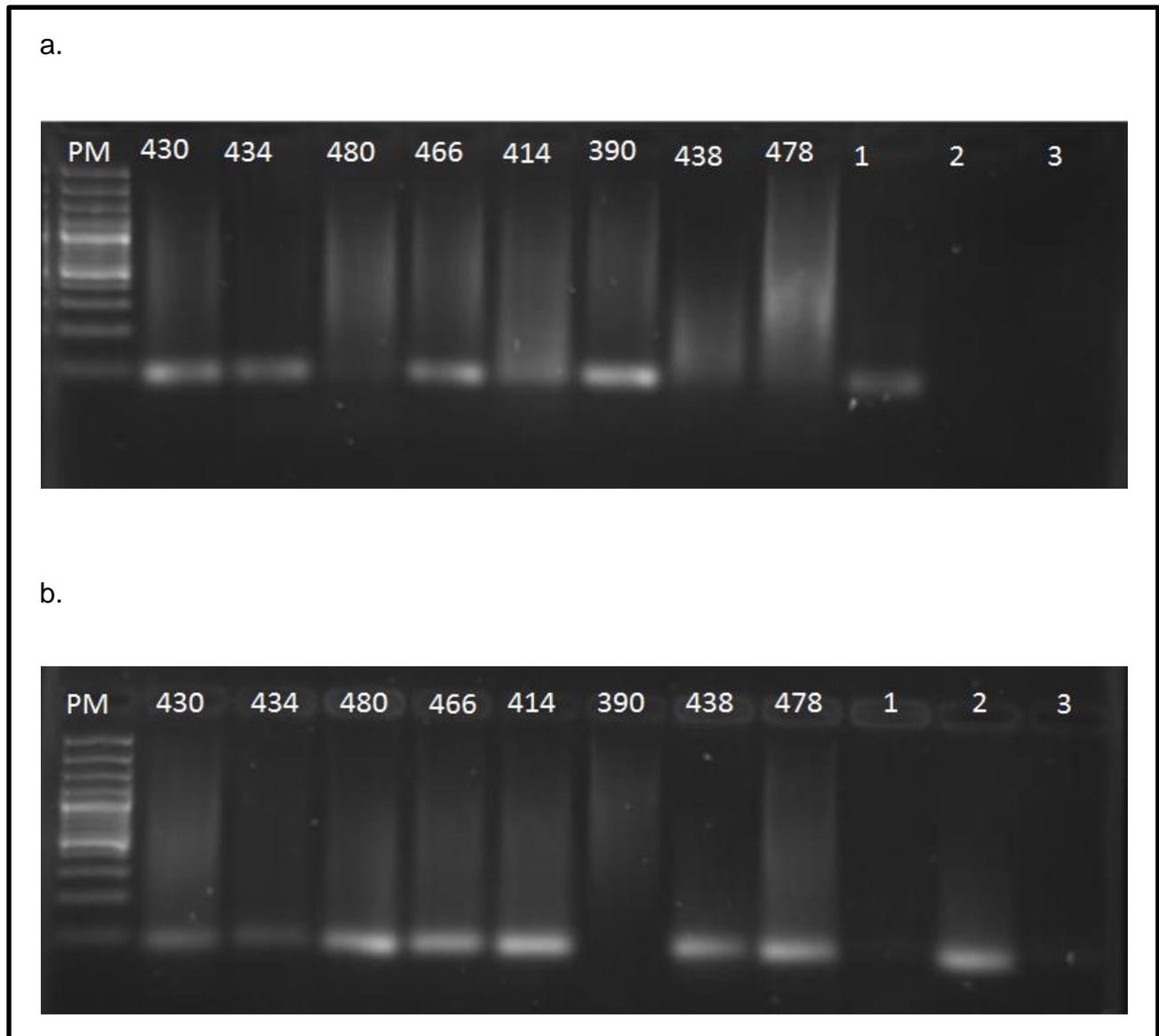


Figura 15. Electroforesis que muestra los productos amplificados de algunas muestras por MS-PCR. a. Productos amplificados con primers específicos para la región metilada del promotor del gen *MLH1*; los casos 430, 434, 466 y 390 presentan metilación del gen. b. Productos amplificados con los primers específicos para la región no metilada del promotor de *MLH1*; los casos 480, 414,

438 y 478 no presentan metilación para este gen. PM: Marcador de peso molecular de 100pb; (1) control ADN universalmente metilado. (2) control ADN no metilado y (3) control ADN no tratado con bisulfito no metilado.

De las 30 muestras con el *MLH1* metilado, el 63,3% (19/30) eran de mujeres con una edad promedio de 62,8 años; mientras que el 36,6% (11/30) fueron hombres con un promedio de edad de 63,6 años. En cuanto al tipo histológico se encontró metilación principalmente en adenocarcinomas con el 85,7% (24/30) y en adenocarcinoma mucinoso con el 14,2% (4/30); en dos casos no fue posible determinar el tipo histológico. Con respecto al estadio TNM y la metilación, se encontró que en los estadios IV (9/30) y II (8/30) la frecuencia de metilación fue del 30% y 26,6% respectivamente, seguido de los estadios I (6/30) y III (3/30) con el 20% y el 10% respectivamente; en cuatro muestras no fue posible determinar el estadio. En cuanto a la localización del tumor y la metilación, se determinó principalmente en el 36,6% en colon ascendente (11/30), 33,3% en el descendente el (10/30), 13,3% en colon transverso (4/30) y 10% en el recto (3/30). En dos casos (6,6%) no fue posible determinar la localización.

De otro lado, en los 11 casos que no tenían el gen *MLH1* metilado, el 54,5% (6/11) eran mujeres con una edad promedio de 51,6 años y el 45,4% eran hombres (5/11), con una edad promedio de 69 años. Se observó con mayor frecuencia en adenocarcinomas con el 72,7% (8/11). El estadio II fue el más común con el 36,3% (4/11). Con respecto a la localización del tumor, se encontró más frecuente en colon ascendente con el 45,4% (5/11), seguido del colon descendente con el 27,2% (3/11), 9% en colon transverso (1/11) y 18,1% en el recto (2/11).

En las 30 muestras de CCR que tenían el gen *MLH1* metilado se encontró que tres muestras (10%) presentaban mutaciones en *APC*, ocho (26,6%) en *KRAS* (8/30) y una en *TP53* (3,3%).

En el grupo de 12 muestras con MSI+ se encontró que 11 (91,6%) tenían el gen *MLH1* metilado. Los dos eventos de MSI+ y metilación se observaron más frecuentemente en colon ascendente en un 41,6% (5/12), seguido de colon descendente con el 33,3 % (4/12) y el 16,6% en colon transversal (2/12). En el caso restante no fue posible determinar la localización. Con respecto al estadio, se observó que la metilación fue más frecuente en el estadio II con el 33,3% (4/12); seguidos del I y el IV con el 25% (3/12) y 16,6% (2/12) respectivamente. Tres casos no tenían disponible información sobre el estadio. Adicionalmente, de los 11 casos con MSI+ y *MLH1* metilado, el 45,4% (5/11) se clasificaron como MSI-H y el 54,5% (6/11) como MSI-L. Solo una muestra con MSI-L presentó el gen *MLH1* no metilado (Tabla 11).

De las 11 muestras que presentaron MSI+ y metilación del gen *MLH1*, solo una presentó mutación en *KRAS*; mientras que, en los genes *APC*, *TP53* y *BRAF* no se identificaron mutaciones en estas muestras (Tabla 11). Adicionalmente, en estas muestras se observó una alta frecuencia de polimorfismos; principalmente el rs41115 del gen *APC* en el 72,7% (8/11) de las muestras; los polimorfismos rs12947788 y rs12951053 de *TP53* en el 27,2% (3/11); por último, el polimorfismo rs12228277 se observó en el 18,1% (2/11) del gen *KRAS*.

Tabla 11. Descripción de las características de las 12 muestras de CCR con MSI+ y la relación con los hallazgos de mutaciones y de metilación en el gen *MLH1*.

Caso	Edad	Sexo	Localización	Estadio	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	MSI	<i>MLH1</i>
1	70	F	Ascendente	IV				MSI-L	M**
2	ND*	F	ND*	ND*				MSI-L	M
3	72	M	Ascendente	II				MSI-H	M
4	90	F	Transverso	IV				MSI-L	M
5	58	M	Descendente	I				MSI-H	M
6	81	M	Ascendente	II				MSI-H	M
7	36	F	Transverso	ND*		c.35G>A		MSI-H	M
8	62	M	Ascendente	I				MSI-L	M
9	81	M	Descendente	I				MSI-L	M
10	53	M	Descendente	II				MSI-H	M
11	79	M	Descendente	II				MSI-L	M
12	ND*	M	Ascendente	ND*		c.35G>A		MSI-L	UM***

*ND= no determinados

** M= Metilado

*** UM= No metilado

De las 32 muestras que presentaron MSS se determinó el estado de metilación del gen *MLH1* en 29 de estas. El 65,5% (19/29) presentaron el *MLH1* metilado; estos casos fueron más comunes en mujeres que en hombres con un 78,9% y 21,0% respectivamente. Además, la metilación de este gen se observó con mayor frecuencia en el colon ascendente con el 36,8% (7/19) y menos frecuente en el colon transverso y recto. Con respecto al estadio de los tumores, se observó que fueron más frecuentes en el estadio IV y II con el 36,8% y el 21% respectivamente; seguidos del I y el III con el 15,7% respectivamente. Por otra parte, el 15,5% (3/19) de las muestras presentó mutación en *APC*, el 36,8% (7/19) en *KRAS*, y el 5,2% (1/19) en *TP53*. Adicionalmente, se observó alta

frecuencia de polimorfismos, principalmente el rs41115 del gen *APC* en el 94,7% (18/19); los polimorfismos de *TP53* rs12947788 y rs12951053 en el 15,7% (3/19) y el polimorfismo rs12228277 de *KRAS* en el 15,7%

De otro lado, las 10 muestras restantes MSS y sin metilación, se observaron con mayor frecuencia en mujeres que en hombres con el 60% (6/10) y 40% (4/20) respectivamente. Estos casos fueron más frecuentes en colon ascendente en el 40% (4/10); mientras que, el 20% (2/10) se observó en colon descendente y el recto respectivamente. Por último en el colon transversal con el 10% (1/10). Con respecto al estadio, se observó que estos casos fueron frecuentes en estadio II con el 40% (4/10) y los demás estadios (I, III y IV) presentaron la misma frecuencia del 20% (2/10) para cada uno.

En este estudio no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la edad, el tipo histológico y la localización del tumor con los resultados moleculares de las muestras analizadas.

Finalmente, de las 44 muestras analizadas en este estudio, solo una presentó simultáneamente mutación en el gen *KRAS*, MSI+ y metilación del *MLH1*. Por el contrario, en cuatro muestras no se identificaron ningún tipo de alteraciones moleculares evaluadas.

9. DISCUSIÓN

En este estudio se realizó un análisis molecular para identificar mutaciones en los genes *APC*, *KRAS*, *TP53*, y *BRAF*; así como también, análisis de inestabilidad microsatelital y de metilación en 44 pacientes con CCR esporádico.

La edad promedio de los individuos al momento del diagnóstico fue de 60,5 años (57,0 para hombres y 61,3 para mujeres), similar a la reportada en la literatura; puesto que el 95% de los casos de CCR esporádico se diagnostican después de los 50 años (19,20).

Es importante resaltar que el 20,4% (9/44) de los pacientes tenían menos de 50 años, la mayoría mujeres. De estos casos, cuatro estaban en estadios avanzados del cáncer (III y IV) y los tumores se localizaron principalmente en colon sigmoides y recto. En este grupo de pacientes con CCR esporádico de aparición temprana y sin antecedentes familiares se explicaría por un subtipo de CCR denominado “cáncer colorrectal esporádico de inicio temprano” (*Early Onset Colorectal Cancer*); que se caracteriza porque se localizan con mayor frecuencia en el colon sigmoides y el recto; no presentan mutaciones en *BRAF*; no tienen alteraciones en los genes del sistema de reparación MMR y no presentan inestabilidad microsatelital (79-81). De acuerdo con lo anterior, este grupo, presentan características similares al del subtipo de cáncer antes mencionado. Por lo tanto, se sugiere que estos pacientes se clasificarían dentro de este subtipo de CCR esporádico.

Nuestros resultados son similares a los reportados por Chang *et al*, que encontraron que el 80% (44/55) de los tumores se localizaron en el colon sigmoides y recto; además, solo el 4% de los casos tenían mutación en *KRAS*, *BRAF* normal y la mayoría de los casos fueron MSS (83).

Por lo anterior, los estudios de análisis molecular en individuos con CCR tienen gran importancia en nuestro medio, porque permiten la identificación de pacientes con este subtipo de cáncer en estadios tempranos y de la pertinencia de implementar pruebas de tamizaje genético en familias con alto riesgo de desarrollar CCR, para posteriormente realizar un tratamiento oportuno que mejore la sobrevida.

En general, nuestros resultados mostraron que las muestras analizadas se localizaron principalmente en el colon ascendente y descendente, y fueron menos frecuentes en el colon transversal y recto; estos hallazgos concuerdan con lo informado por otros autores (99, 100,125). En relación con los resultados histopatológicos, todas las muestras del estudio se encontraban en un estado avanzado de la enfermedad, ya que fueron clasificadas como adenocarcinomas en el 90% de los casos. Este hallazgo concuerda con lo informado en la literatura, que reporta entre el 90% al 95% de los casos de CCR, al momento del diagnóstico, se clasifican como adenocarcinomas (82). Además, el 55,3% de las muestras se encontraban en estadios tempranos I-II y el porcentaje restante en estadios avanzados III-IV.

Es importante destacar que los pacientes con CCR en estadios I y II tienen un mejor pronóstico de la enfermedad y la supervivencia a cinco años es de aproximadamente del 95%. Por lo tanto, en estos estadios es el momento oportuno para tomar decisiones en cuanto a la intervención y al tratamiento más adecuado, de acuerdo con la guía Americana de Oncología Clínica (NCCN “*National Comprehensive Cancer Network*” versión 2. 2017) para los pacientes con CCR. De esta manera, se contribuiría favorablemente a la supervivencia de estos pacientes (139). De acuerdo con lo anterior, se espera que el 55,3% de los pacientes evaluados con CCR, que se encontraban en estadios I-II, tendrían un buen pronóstico de la enfermedad.

Por el contrario, en los estadios avanzados del cáncer (III y IV) la probabilidad de sobrevivir posterior al tratamiento es cerca del 12,5% (83,84). Este dato es preocupante si se tiene en cuenta que en Colombia la mayoría de pacientes con CCR son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad, lo que supondría que tendrían una alta tasa de mortalidad. La situación anterior se explicaría por razones como la falta de promoción y prevención, dificultad para acceder al sistema de salud, deficiencia en la implementación de pruebas diagnósticas no invasivas. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que el CCR es asintomático en los primeros estadios, lo que dificulta la detección temprana de la enfermedad.

Con respecto a los resultados de mutaciones en los genes *APC*, *KRAS*, *TP53* y *BRAF*, en este estudio se encontró un total de mutaciones del 47,7%, similar a lo reportado por otros autores (84, 85, 88, 92, 98). Las muestras que presentaron

mutaciones se localizaron principalmente en colon ascendente y menos frecuente en el recto; hallazgos similares a los informados en otros estudios. De estos resultados, se concluye que el CCR esporádico con mutaciones en los genes evaluados es más predominante en el colon ascendente (99).

Particularmente, la frecuencia de mutación del gen *APC* fue del 18,1%, que es menor comparada con las reportadas en otros estudios, que informan hasta un 70% de los casos, cuando se secuencia todos los exones de *APC*. En este estudio se analizó solo la región MCR del exón 15 (84,85). Sin embargo, nuestro resultado es similar al reportado en otros estudios, que informan baja frecuencia de mutaciones en *APC* (86,87). Adicionalmente, se debe mencionar que en el gen *APC* se presentan otro tipo de alteraciones moleculares diferentes como son la LOH (hasta en un 40%), deleciones cromosómicas en la región 5q21 y la metilación. Por lo anterior, se sugiere que en los pacientes que no se detectaron mutaciones en *APC*, no se podría descartar la presencia de las anteriores alteraciones mencionadas. Por lo anterior, se podría afirmar que existen diversas alteraciones genéticas que afectan la expresión de este GST, el cual es clave en la carcinogénesis del CCR.

En este estudio *KRAS* fue el gen mutado más frecuentemente, en el 25% de las muestras analizadas. Este resultado es un poco menor al reportado por varios autores, pero está entre el rango del 13% al 50% informado en la literatura (88). Además, concuerda con el 28% reportado en un estudio de Chile en 58 pacientes (91). Los anteriores estudios corroboran que en el CCR esporádico la frecuencia de mutaciones en el gen *KRAS* presenta una variación geográfica. Se encontró

que las mutaciones fueron más prevalentes en el codón 12 que en el 13; y no se detectaron en el codón 61. Los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, en la cual se informa que el 95% de las mutaciones en *KRAS* ocurren principalmente en los codones 12 y 13 del exón 2 y en menor proporción en el codón 61 del exón 3 (89,90).

Adicionalmente, varios estudios concluyen que las mutaciones en *KRAS* son más comunes en adenomas (tumor benigno) durante la carcinogénesis del CCR y que se eliminarían durante la selección de clones malignos que ocurre durante la progresión de adenoma hacia carcinoma colorrectal (90).

En el CCR metastásico (CCRm) está bien definido que los pacientes con *KRAS* mutado no se benefician de la terapia con inhibidores del EGFR (I-EGFR). De acuerdo con lo anterior, en este estudio de los 11 pacientes con *KRAS* mutado, 7 tenían CCRm; por lo tanto, en ellos no se espera respuesta al tratamiento con Cetuximab o Panitumumab, como lo indica la guía Americana de Oncología Clínica (NCCC versión 2. 2017) (139). Además, tendrían un mal pronóstico de la enfermedad, ya que por estar *KRAS* mutado, este gen estará activado constitutivamente en las células cancerosas, lo que produciría un mecanismo de resistencia a la quimioterapia con estos medicamentos. Por consiguiente a estos pacientes se les debe suministrar otro tratamiento que sea más eficaz. Por el contrario, los 33 pacientes que no tenían mutaciones en *KRAS*, si se beneficiarían de la terapia con Cetuximab o Panitumumab, además, tendrían un mejor pronóstico de la enfermedad. En resumen, es de resaltar la importancia de este tipo de estudios moleculares, de la utilidad clínica de *KRAS* como un biomarcador

en CCRm porque permite, clasificar los pacientes en subgrupos de *KRAS* positivo y *KRAS* negativo, lo cual sería muy valioso para el pronóstico de la enfermedad y para predecir la respuesta a la quimioterapia, como también, para orientar al especialista en la selección adecuada de la terapia antineoplásica.

De otro lado, en el CCR esporádico se establece que las mutaciones en *KRAS* y *BRAF* son eventos mutuamente excluyentes. Nuestros resultados confirman esta relación, no se detectó la mutación V600E en *BRAF* en muestras con *KRAS* mutado; cabe anotar que, los CCR esporádicos se caracterizan por tener una baja frecuencia de mutación en *BRAF* que oscila entre el 0 al 5% en diferentes poblaciones; lo anterior concuerda con lo informado en este trabajo, en el que no se detectó mutaciones en *BRAF* en las muestras analizadas (92,102).

Con respecto, a los resultados en el gen *TP53*, se encontró una baja frecuencia de mutaciones del 4,5%; ésta es muy diferente comparada con las reportadas en múltiples estudios, en los que se encuentran de hasta el 60% en estadios avanzados y cuando se evalúan todos los exones de este gen (93). En este trabajo solo se secuenciaron los exones 5 al 8. Además, debe tenerse en cuenta que un poco más de la mitad de las muestras estaban en estadios tempranos del cáncer I y II, en los cuales no son muy comunes las mutaciones en *TP53*. Nuestros resultados permiten sugerir que en los individuos estudiados no se podría descartar la presencia de mutaciones en los exones no evaluados. A partir de los resultados obtenidos para este gen, se propone que los pacientes colombianos con CCR, presentan un perfil de mutaciones particular muy diferente al reportado en otras poblaciones. Posiblemente factores como el estilo de vida,

hábitos y la composición étnica, podrían estar relacionados con la frecuencia de mutaciones para este gen en nuestro medio.

En Colombia y América Latina se han publicado pocos estudios en CCR sobre mutaciones somáticas en el gen *TP53* (94-96). No obstante, la baja frecuencia de mutación en *TP53* encontrada en este trabajo es similar a la reportada en un estudio previo por nuestro grupo (100).

Así mismo, en otro trabajo del grupo se encontró en muestras de CCR una frecuencia del 43% de aneuploidías del cromosoma 17 y un 89,5% de deleciones en el locus 17p13.1 en el que se localiza el gen *TP53* (97). De estos resultados se concluyó que la aneuploidía del cromosoma 17 y la deleción del locus del gen *TP53*, son alteraciones comunes en los pacientes colombianos con CCR. De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo no se puede excluir este tipo de alteraciones cromosómicas en las muestras que no presentaron mutaciones en *TP53*. De forma similar a lo descrito para *APC*, en el GST *TP53* se presentan diversas alteraciones genéticas que afectan la expresión, el cual es considerado un gen importante en el desarrollo de diferentes tumores sólidos.

De otro lado, al comparar en conjunto nuestros resultados en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* con otros trabajos, se encuentran discordancias con lo reportado por Smith *et al*, en un estudio molecular con 103 muestras de CCR, quienes encontraron altas frecuencias de mutaciones en *APC*, *KRAS* y *TP53* del 56,7%, 27,4%, y 61,3% respectivamente (98). De manera similar, en un estudio realizado en Europa en 103 muestras de CCR se informó 71% de mutaciones en el gen

APC, 32% en *KRAS* y 28% para *TP53* (99). Estos resultados son mayores a lo encontrado en el presente trabajo, especialmente para los genes *APC* y *TP53*. Las diferencias podrían explicarse principalmente por el tamaño de la muestra, y porque se evaluó toda la región codificante de los genes (99).

En los anteriores estudios, similar a lo encontrado en nuestro trabajo, no se identificaron mutaciones concomitantes en *KRAS* y *TP53*, los autores sugieren que la presencia de estas dos mutaciones sería desventajosa para la progresión del tumor y aparecerían sólo cuando existen mutaciones en el gen *APC* (98,99). Por el contrario, las mutaciones simultáneas en los genes *APC* y *TP53* fueron más frecuentes en el trabajo de Smith *et al* (98). En este estudio la combinación de mutaciones más común fue en los genes *APC* y *KRAS*, similar a lo reportado previamente por nuestro grupo y por Vasovcak *et al* (99,100). Por otra parte, no se identificaron mutaciones simultáneas en estos tres genes. Sin embargo, Smith *et al* encontraron una frecuencia de mutaciones concomitantes en los tres genes del 6% y Vasovcak *et al* de 8,7% respectivamente. En conclusión, en el CCR esporádico las mutaciones simultáneas en los genes de la vía supresora *APC*, *KRAS* y *TP53* son un evento infrecuente.

Así mismo, al comparar los resultados de mutaciones del presente estudio en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* con los obtenidos previamente por nuestro grupo, cuyas frecuencias fueron del 26,7%, 13,3% y 6,7% para *APC*, *KRAS* y *TP53* respectivamente (100); aunque existen variaciones en los dos estudios, se observa que los pacientes colombianos con CCR esporádico se caracterizan por presentar bajas frecuencias de mutaciones para estos genes.

De otro lado, en un estudio con pacientes Chinos utilizando una plataforma de secuenciamiento de nueva generación (NGS), se informó una frecuencia de mutaciones del 17,2% para *APC*; 50,5% en *KRAS* y 23,7% en *TP53* (101). De estos resultados, la frecuencia de *APC* es menor a la obtenida en este trabajo; otro estudio utilizando la tecnología de NGS, reportó frecuencias de mutaciones para *APC*, *KRAS* y *TP53* del 27,3%, 44,4% y 52,5% (102). Estos dos estudios, que emplearon técnicas novedosas para la detección de mutaciones en CCR, además de corroborar que las frecuencias de mutaciones para estos genes varían entre poblaciones, debe también tenerse en cuenta que estas frecuencias varían de acuerdo con las técnicas que se utilice.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio sobre las mutaciones en los genes *APC*, *KRA*, *TP53* y *BRAF* en individuos con CCR, presentan diferencias comparados con los informados en la literatura. Estas diferencias se explicarían por el tamaño de la muestra, al número de exones evaluados, las diferencias geográficas y las metodologías utilizadas. Los resultados de mutaciones en estos genes corroboran hallazgos previos de otros trabajos del grupo de Genética Médica, que en conjunto concluyen que los pacientes colombianos con CCR se caracterizan por presentar bajas frecuencias de mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53*.

Por otra parte, en este estudio se identificó una alta frecuencia de polimorfismos en las muestras de CCR analizadas. Estos hallazgos confirman lo reportado en un estudio previo en 30 pacientes colombianos con CCR (100); hasta el presente ambos trabajos son los primeros en informar una alta frecuencia del polimorfismo

p.T1493T en pacientes colombianos con CCR esporádico. El gen con mayor frecuencia de polimorfismos fue *APC*, en el que se detectaron dos polimorfismos, p.T1493T y p.P1442P; con una frecuencia del 75% y 2,2% respectivamente. Estos polimorfismos se encuentran reportados en las bases de datos de NCBI y 1000 genomas como SNP rs41115 y rs67622085. Particularmente la frecuencia del p.T1493T G>A (75%) reportada en los individuos colombianos es muy superior a la reportada para la población caucásica que oscila entre el 1,1% al 38% (103,104). Este polimorfismo también se ha identificado en familias con FAP; así mismo, se ha reportado con una alta frecuencia en pacientes con cáncer de mama (105,109).

Scott *et al*, informa que el polimorfismo p.T1493T tiene un efecto protector para el desarrollo del CCR. Por el contrario, Fernandez-Rozadilla *et al* (2010) no encontraron asociación entre este y el riesgo de desarrollar CCR. Sin embargo, Wachsmannova-Matelova *et al* (2009), sugieren que el polimorfismo se asocia con mayor riesgo para desarrollar CCR y que debería usarse como biomarcador molecular para el diagnóstico del CCR. Los anteriores hallazgos son contradictorios, por lo que se requieren futuros estudios de casos y controles, que permitan esclarecer la asociación de este polimorfismo con el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (106-109).

En cuanto al polimorfismo p.P1442P, la sustitución T>A en la posición 4326, no se encontró reportes en la literatura de su asociación con el desarrollo del CCR. Por lo tanto, este polimorfismo se reporta por primera vez en individuos colombianos con CCR.

Con respecto a los otros polimorfismos identificados en este trabajo en los genes *KRAS* y *TP53*, estos se localizan en regiones intrónicas, por lo que no tienen efecto en la secuencia de aminoácidos de la proteína; hasta el presente no se conoce la asociación de estos polimorfismos con el riesgo de desarrollar CCR (110-114).

En cuanto a los resultados de MSI en las muestras de CCR analizadas, se encontró una frecuencia de MSI positiva (MSI+) del 27,2%, similar a lo informado en la literatura para diferentes poblaciones y a la reportada por Vasovcak *et al* (2011) y Meng *et al* (2007) del 24,5% y 31,2% respectivamente (99,136). Nuestro resultado es un poco menor al 34,1% obtenido en un trabajo reportado previamente por nuestro grupo (119). Sin embargo, la frecuencia de MSI informada en este trabajo difiere de las informadas por Agostini *et al* (2010), Moghbeli *et al* (2011) y Siddique *et al* (2016), que varían del 13% al 60% (121, 120,135).

En general, entre el 15% al 20% del CCR esporádico presenta MSI, que se origina por defectos en los genes MMR (115,116). Determinar la MSI en el CCR esporádico y hereditario tiene gran utilidad clínica porque permite clasificar los tumores en MSI+ y MSI-. Estos tumores tendrían diferentes características clínico-patológicas y genéticas, lo que sugiere que se originan por diferentes vías moleculares en la carcinogénesis del CCR.

En relación con lo anterior, en este trabajo se demostró que cerca de una tercera parte de los pacientes con CCR correspondió al subgrupo molecular MSI+; lo que

permite sugerir, que la MSI es un evento frecuente que se presenta en los pacientes colombianos con CCR evaluados, el cual está relacionado con el desarrollo de este tipo de cáncer. La guía clínica de oncología de la NCCN para los pacientes con CCR (139), recomienda realizar la prueba molecular de MSI a estos pacientes, no solo por lo anteriormente descrito; sino también, porque existe evidencia que estos pacientes en estadio II, no se benefician de la terapia con 5-Fluorouracilo y tienen un mejor pronóstico de la enfermedad. En resumen, similar a lo descrito para *KRAS*, la prueba de la MSI tiene una gran utilidad clínica para predecir la respuesta de los pacientes con CCR al tratamiento con este medicamento antineoplásico.

Del subgrupo de muestras MSI+, el 11,3% fueron MSI-H; resultado que concuerda con los reportados por Hatch *et al* (2005) y Huang *et al* (2010) del 10% y el 11,9% respectivamente (137,138). Sin embargo, difiere del 26,8% informado previamente por nuestro grupo y por otros autores (99, 120,135). Adicionalmente, la MSI-L fue el tipo de MSI más común en este estudio, la cual fue mayor comparada con la informada previamente por otros trabajos (99, 137,138). No obstante, es similar a la informada por Moghbeli *et al* (2011) del 16,4% (121). De otro lado, en CCR esporádico las muestras del subgrupo MSI-L se relaciona con la ausencia de mutaciones en el gen *BRAF*; nuestros resultados corroboran esta relación. En este estudio los 7 pacientes con MSI-L tenían el gen *BRAF* normal. Cabe mencionar que otra utilidad clínica que se tiene con la clasificación molecular de la MSI en los pacientes con CCR, es que en los pacientes con MSI-H, se recomienda practicar la colectomía subtotal del colon; es decir, que la MSI orienta el tipo de

cirugía que se les debe realizar a estos pacientes. En resumen, en cuanto a las diferencias entre los resultados obtenidos de la MSI con los reportados en la literatura, se explicaría por el tamaño de la muestra, el número y tipo de STR utilizados, la variación geográfica de la MSI, factores ambientales y la localización anatómica del tumor.

Con respecto a los microsatélites, en nuestro estudio el marcador STR más inestable fue BAT26; diferente a lo reportado por Montenegro *et al*, 2006 (BAT40) (119) y por Moghbeli *et al*, 2011 (BAT-25) (121). Sin embargo, es importante mencionar que de estos tres marcadores, BAT-25 y BAT-26, están recomendados en los principales paneles para analizar la MSI, por su especificidad y sensibilidad; además que a partir de poco volumen de muestra tumoral se puede determinar la MSI (59, 60,130).

En este estudio la MSI+ se detectó con mayor frecuencia en tumores localizados en el colon ascendente y menos frecuente en el colon transverso; mientras que, en las de recto no se detectó. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios que informan que la MSI ocurre con mayor frecuencia en el colon ascendente y que su frecuencia varia en los diferentes sitios anatómicos del colon (115, 123, 124,125).En conclusión, nuestros hallazgos corroboran la variación de la MSI a lo largo del colon hasta el recto y la relación directa en el colon ascendente. La variación de la MSI en el colon se debería al microambiente de los diferentes sitios del colon, al estilo de vida y hábitos de cada individuo (123, 124,125).

En relación con los hallazgos del TNM y la MSI, los resultados concuerdan con los informados por otros estudios, los cuales reportan que la MSI es frecuente en los estadios I y II del CCR; es decir, cuando los tumores son de menor tamaño y no se han diseminado a tejidos cercanos (117,118, 122). En este estudio, se encontró que más de la mitad de los pacientes con MSI+ estaban en los estadios I y II. No obstante, otros autores han detectado la MSI+ en tejidos colorrectales precancerosos, como en adenomas vellosos. Lo que indica que la MSI se presenta en etapas tempranas dentro de la secuencia adenoma-carcinoma. De acuerdo con lo anterior, las guías clínicas de oncología de la NCCN resaltan la importancia de realizar la prueba de la MSI en todos los pacientes para la clasificación molecular del CCR; porque los que presentan un estadio II con MSI-H, tienen un mejor pronóstico de la enfermedad y no se benefician de la terapia con 5-Fluorouracilo (118, 121,122). De acuerdo con este estudio, los cuatro pacientes que estaban en estadio II con MSI-H, no se les debió suministrar este tratamiento.

Por otra parte, en CCR esporádico se reporta una asociación significativa entre tumores con MSI+ y la mutación V600E del gen *BRAF*, particularmente en los casos con MSI-H (115,116); sin embargo, no se observó esta asociación, en los 12 casos con MSI+, no se detectó la mutación V600E. Por el contrario, se corroboró la relación de las muestras con MSI-L y la ausencia de mutaciones en *BRAF*, como lo informan varios autores (127,133). Encontramos el gen *KRAS* mutado en el 16% de las muestras con MSI+, similar a lo informado por Nash *et al* (2010), con el 22%. Sin embargo, estos resultados difieren significativamente del

1% informado por Hu *et al* 2016 (117,118); estos resultados indican la variación geográfica que se presenta en esta relación.

En este estudio se encontró alta frecuencia (73,1%) de metilación del gen *MLH1* en las muestras analizadas; concordando con lo informado en la literatura, que se encuentra metilado hasta un 60% en CCR esporádico (65). Sin embargo, la frecuencia de metilación obtenida es superior comparada con las reportadas por otros autores que oscilan entre el 9,4% y el 20% (99, 120, 126,127, 128). Las diferencias se explicarían por las metodologías empleadas, el estilo de vida, hábitos y la exposición a compuestos químicos (127,140). En resumen, en este estudio se demostró que la metilación del gen *MLH1* fue un evento frecuente en los pacientes Colombianos con CCR evaluados, esto se evidenció en los diferentes estadios del cáncer. El 56% de los pacientes estaban en los estadios I y II del cáncer. Es bien conocido que los mecanismos epigenéticos como la metilación de GST y de reparación están relacionados con el desarrollo del cáncer. En el CCR esporádico la metilación del *MLH1* y de otros genes ocurre durante la progresión de la secuencia adenoma-carcinoma. La hipermetilación del promotor de este gen en etapas tempranas se propone como un biomarcador pronóstico de la enfermedad.

Varios autores reportan que la metilación de *MLH1* ocurre con mayor frecuencia en el colon ascendente seguido de colon descendente y recto (99, 125, 126, 128,129); nuestros resultados concuerdan con lo anterior ya que esta alteración fue más frecuente en el colon ascendente y menos frecuente en el recto. De estos resultados se afirmaría que los pacientes colombianos con CCR evaluados

presentaron una distribución de metilación del gen *MLH1* similar a la informada en otras poblaciones.

De otro lado, en los casos de CCR que presentan MSI+ existe una relación directa con la metilación del gen *MLH1* en el colon ascendente, de hasta un 90% de los casos (126, 132, 133,140). En este estudio se encontró que el 91,6% de las muestras con MSI+ tenían metilado el *MLH1*, demostrando la correlación informada en la literatura; además, es importante resaltar que la mayoría de los pacientes con MSI+ y metilación del *MLH1* estaban en los estadios I y II; por lo que se podría afirmar que estas dos alteraciones moleculares se presentan simultáneamente con frecuencia en estados tempranos durante la carcinogénesis del CCR.

La MSI en el CCR esporádico se le atribuye a la inactivación epigenética del gen *MLH1*. Este hace parte de los genes MMR, por lo tanto la no expresión de la proteína MLH1 impide que se forme un complejo con la proteína PMS2, esencial en la reparación de bases mal apareadas. Por esta razón la inactivación del gen *MLH1* induciría la acumulación de mutaciones en otros genes del sistema MMR, como *MSH2*, *MSH3* o *MSH6* (115,116,141). También, podría ocasionar alteraciones en otras vías genéticas, como la MSI, las cuales están relacionadas con la carcinogénesis del CCR. Además, la inactivación del *MLH1* se asocia directamente con la inestabilidad epigenómica del CCR. Por lo anterior, en las muestras analizadas de este trabajo que tenían metilado el gen *MLH1*, no se descartaría la metilación de otros genes, tales como el *MGMT* y el *CDK2A/p16*, los cuales están frecuentemente metilados en el CCR (21,58,65,128,141). En

resumen, es importante en los pacientes con CCR realizar la determinación de la MSI y en los casos positivos establecer el patrón de metilación del gen *MLH1*; para tener una clasificación molecular más completa de cada uno de los pacientes.

En este estudio también se encontró alta frecuencia de metilación del gen *MLH1* en las muestras con MSS (estables); indicando que la metilación de este gen no es exclusiva de los pacientes con MSI+. De acuerdo con estos hallazgos se propone que las muestras con MSS y *MLH1* metilado corresponderían a un subgrupo de pacientes con características moleculares y epigenéticas diferentes al subgrupo de pacientes con MSI+ y *MLH1* metilado. En conclusión, los pacientes con CCR esporádico evaluados se caracterizaron porque la mayoría tenían metilado el gen *MLH1* en los diferentes estadios histopatológicos.

Por último, en cuanto a la relación del estado de metilación del gen *MLH1* y mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53*, se reporta en varios estudios que entre el 15% y 17% de los casos presentan simultáneamente mutaciones en el gen *APC* y metilación del promotor de *MLH1* (128). Lo anterior concuerda con nuestros resultados, que fue del 10%. De manera similar se informa que mutaciones en el gen *KRAS* y metilación del *MLH1* se encuentran simultáneamente hasta en el 15% de los casos de CCR. En este estudio se encontró un porcentaje del 26,6% (126). Por el contrario, hasta el presente no se ha reportado en la literatura mutaciones en el gen *TP53* y metilación del *MLH1* simultáneamente. En nuestro estudio el 3,3% de las muestras tenían estas dos alteraciones; por consiguiente, este estudio es el primero en informar una baja

frecuencia de estas dos alteraciones en pacientes con CCR esporádico. En conclusión, se afirmaría que mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* son poco comunes en los pacientes con CCR que tienen metilado el gen *MLH1*.

Siguiendo con las observaciones anteriores, varios autores informan que existe fuerte asociación entre los tumores colorrectales con *MLH1* metilado y la mutación V600E en *BRAF* (115, 116, 131, 132,133), no observamos esta relación posiblemente por el tamaño de la muestra. Además por el hecho que la mutación de *BRAF* en los casos esporádicos es de aproximadamente el 5%.

En resumen, en este trabajo se encontró una alta frecuencia de metilación en el gen *MLH1*, esta alteración molecular fue la más predominante en las muestras de CCR evaluadas. Este hallazgo contrasta con las bajas frecuencias de mutaciones obtenidas en los genes *APC*, *KRAS*, *TP53* y *BRAF*, lo que indica una relación inversa entre la frecuencia de metilación y la de mutaciones en los genes evaluados; de lo anterior, se podría sugerir que la mayoría de los pacientes colombianos con CCR del estudio desarrollaron esta neoplasia posiblemente por vías moleculares diferentes a la clásica o supresora propuesta por Fearon y Vogelstein, como son la inestabilidad microsatelital y la epigenética, las cuales ocurren por vías independiente (25) (128). Los resultados obtenidos confirman la heterogeneidad genética que se presenta en el CCR.

En conclusión, este es el primer estudio realizado en Latinoamérica que evaluó simultáneamente las vías de mutación en los genes *APC*, *KRAS*, *TP53* y *BRAF*, de inestabilidad microsatelital y epigenética en pacientes con CCR. Los resultados

aportan información básica importante sobre las frecuencias y tipos de mutaciones; así como también, del estado de inestabilidad microsatelital y de la metilación del gen *MLH1*; En este grupo de pacientes se logró establecer una mejor caracterización genética de la enfermedad, lo que permitió identificar subgrupos moleculares de acuerdo con las vías alteradas. Es importante determinar el perfil molecular individual en este tipo de cáncer, porque es relevante para el pronóstico de la enfermedad, para predecir la respuesta de los pacientes a los tratamientos. Por último, en este trabajo se demostró que los pacientes Colombianos evaluados presentaron diferentes vías moleculares alteradas relacionadas con la carcinogénesis del CCR.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por el proyecto *CODI-CPT 1231*. Convocatoria Programática CODI. Universidad de Antioquia. Grupo Genética Médica.

10. CONCLUSIONES

- Este es el primer estudio en Latinoamérica que evaluó simultáneamente las vías de mutación en los genes *APC*, *KRAS*, *TP53* y *BRAF*, de inestabilidad microsatelital y la epigenética del CCR esporádico. Lo que permitió realizar una mejor caracterización molecular de los pacientes con CCR.
- Este estudio encontró una baja frecuencia de mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en individuos con CCR esporádico. *KRAS* fue el gen más frecuentemente mutado. Además, no se detectó la mutación V600E en el gen *BRAF*. Lo anterior permite sugerir que los pacientes evaluados presentan un perfil de mutaciones particular diferente al de otras poblaciones.
- En los pacientes con CCR se identificó una alta frecuencia de polimorfismos en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53*, especialmente el T1493T en *APC*. La asociación de estos polimorfismos con riesgo de desarrollar CCR no está bien definida. Por lo tanto, es necesario realizar estudios adicionales para determinar esta asociación.
- En este trabajo se demostró que cerca del 30% de los pacientes tenían la vía de la MSI alterada; lo que permitió clasificar los pacientes en los subgrupos moleculares: MSI-H, MSI-L y MSS. Lo anterior es de gran importancia, ya que la MSI es una prueba molecular de gran utilidad clínica en los pacientes con CCR; por que la MSI es un biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento quimioterapéutico.

- La mayoría de pacientes con CCR evaluados se caracterizaron por tener metilado el gen de reparación *MLH1*. Esta vía epigenética fue la alteración molecular más frecuente de las vías evaluadas. En este estudio se comprobó la relación de la MSI+ con la metilación del gen *MLH1*, la cual se determinó con mayor frecuencia en el colon ascendente.
- En este trabajo se determinó que la MSI+ y la metilación del gen *MLH1* fueron comunes en los estadios I y II del cáncer. Esta información es importante para el pronóstico del paciente con CCR.
- Los hallazgos de este estudio confirman la heterogeneidad molecular descrita del CCR esporádico. En los pacientes con CCR evaluados se evidenció que tenían alteraciones moleculares en las vías CIN, MSI y epigenética relacionadas con la carcinogénesis del CCR.

11. PERSPECTIVAS

- Continuar los estudios de la caracterización molecular en el CCR con el objetivo de aumentar el número de pacientes para validar los resultados previamente informados por el grupo de Genética Médica, de la Universidad de Antioquia.
- Complementar este tipo de estudios con el desarrollo de proyectos que incluyan metodologías de secuenciamiento genómico de nueva generación “*next generation sequencing*” (NSG), con el objeto de analizar toda la región codificadora de genes relacionados con la carcinogénesis del CCR; así como también, realizar estudios epigenómicos.
- Realizar estudios de casos y controles en nuestra población para evaluar la asociación de los polimorfismos identificados con el riesgo de desarrollar CCR.
- Formular estudios de epidemiología genética, con el objetivo de evaluar la asociación de factores de riesgo medioambientales con el desarrollo de CCR.
- Consolidar la línea de investigación en genética de tumores sólidos del grupo de Genética Médica; integrado por profesionales con formación básica y clínica que formulen proyectos de gran impacto en la genética del cáncer.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Raluca G, Victoria U, Liliana T, Cristina N, Nitu TS, Olesea S. A real health problem of our days : Colorectal Cancer. 2016; 1 (22):22–5.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D, Forman, D. and Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010; 127:2893–2917.
4. Montenegro, Y.M; Ramirez, A. T; Muñeton. M; Isaza, L. F; Ramirez, J. L. comportamiento del cancer colorrectal en pacientes menores de cuarenta años en hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva (HUHMP) y el Hospital Universitario San Vicente de Paul de Medellín (HUSVP) entre 1980 y 2000. *Revista Colombiana de Cirugía.* 2002; 17(1):10-14.
5. Cortés A, Clín P, Bravo LE, Clín P, García LS, Collazos P, et al. Incidencia, mortalidad y supervivencia por cáncer colorrectal. *Salud publica Mex.* 2014; 56 (5):457–64.
6. Bertram J.S. Biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine.* 2001; 21:167-223.
7. The Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.*2012; 487(7407): 330–337.
8. Moghimi-Dehkordi B, Safaee A, Zali MR. Comparison of colorectal and gastric cancer: survival and prognostic factors. *Saudi J Gastroenterol.* 2009; 15(1):18-23.

9. Hagggar F, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009; 22(4):191–7.
10. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal Cancer Statistics ,2014. *CA cancer J Cli* 2014; 64:104-117.
11. Pinzon-Florez Carlos Eduardo, Gamboa-Garay Oscar Andrés, Diaz-Quijano Diana Marcela (2015). Colonoscopy Screening for Colorectal Cancer — Overview of the Literature, Screening for Colorectal Cancer with Colonoscopy, Dr. Rajunor Ettarh (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61851.
12. Petersen MP, Ramos CP, Garay ÓG, Suárez GH. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia. Tercera edición. Bogotá D.C. Instituto Nacional de Cancerología, 2010.
13. Pardo C, Cendales R. Incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer en Colombia, 2007-2011. Primera edición. Bogotá. D.C. Instituto Nacional de Cancerología, 2015, v.1. p. 148
14. Musulén E, López-Martos R, Sanz C, Muñoz-Mármol AM, Ariza A. Carcinoma colorrectal en el síndrome de poliposis hiperplásica: caracterización clinicopatológica y molecular. *Rev Española Patol.* 2011; 44(2):75–82.
15. Bacchiddu S, Cristina A, Xavier Á, Caserras B. Actualizaciones Pólipos colorrectales. *FMC.* 2012; 19(8):427-80.
16. Carballal S, Moreira L, Balaguer F. Pólipos serrados y síndrome de poliposis serrada. *CIR ESP.*2013; 91(3):141-148.
17. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorrectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet.*2016; 7(3):105–114.

18. (Anon, 2017) <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/cancer-redmeat/es/> [visitada 10 Feb. 2017].
19. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging*. 2016; 967–76.
20. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017; 18, 197.
21. Goel A, Boland CR. Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology*. Elsevier Inc.; 2012; 143(6):1442–1460.e1.
22. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011: 792362.
23. Pavicic W, Nieminen TT, Gylling A, Pursiheimo J, Laiho A, Gyenesi A. Promoter-Specific Alterations of APC are a Rare Cause for Mutation-Negative Familial Adenomatous Polyposis. 2014; 864:857–64.
24. Seguí N, Guinó E, Pineda M, Navarro M, Bellido F, Lázaro C, et al. Longer telomeres are associated with cancer risk in MMR-proficient hereditary non-polyposis colorectal cancer. *PLoS One*. 2014; 9(2):e86063.
25. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61:759–767.
26. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007; 50(1):113–30.
27. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl. Med*. 2009. 17; 361(25):2449-60.

28. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009.17; 361(25):2449-60.
29. Harrison S, Benziger H. The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. Elsevier Ltd.; 2011; 9(4):200–10.
30. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon. *Gastroenterology.* 2010; 138(6): 2059–2072.
31. Choi YW, Heath EI, Heitmiller R, Forastiere AA, Wu TT. Mutations in beta-catenin and APC genes are uncommon in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas. *Mod Pathol.* 2000; 13(10):1055-9.
32. Beroud, C. and Soussi, T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, 121–124.
33. Hassina benchabane and Yashi Ahmed. The adenomatous poliposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 2011; 1:75–84.
34. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci.* 120(Pt 19):3327–35.
35. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW .Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science.* 1993. 10; 262(5140):1734-7
36. Lawrence N. Kwong and William F. Dove. APC and its modifiers in colon cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 656: 85–106.
37. Coppedè F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(4):943–56.

38. Chetty R, Govender D. Gene of the month: KRAS. *J Clin Pathol*. 2013; 66(7):548–50.
39. Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006; 66(8):3992–5.
40. Eser S, Schnieke a, Schneider G, Saur D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; 2014; 111(5):817–22.
41. Manchado E, Weissmueller S, Morris JP, Chen C-C, Wullenkord R, Lujambio A, et al. A combinatorial strategy for treating KRAS-mutant lung cancer. *Nature*. Nature Publishing Group; 2016; 534(7609):647–51.
42. Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(11):E1852–60.
43. Peeters M, Douillard J-Y, Van Cutsem E, Siena S, Zhang K, Williams R, et al. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol*. 2013; 31(6):759–65.
44. Wicki A, Herrmann R, Christofori G. Kras in metastatic colorectal cancer. *Swiss Med Wkly*. 2010; 140:w13112.
45. Rahman M a, Salajegheh a, Smith R a, Lam a K-Y. B-Raf mutation: a key player in molecular biology of cancer. *Exp Mol Pathol*. Elsevier Inc.; 2013;95(3):336–42

46. Hussain MRM, Baig M, Mohamoud HSA, Ulhaq Z, Hoessli DC, Khogeer GS, et al. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. Saudi J Biol Sci. King Saud University; 2015; 22(4):359–73.
47. Hertzman Johansson C, Egyhazi Brage S. BRAF inhibitors in cancer therapy. Pharmacol Ther. Elsevier Inc.; 2014; 142(2):176–82.
48. Yarchoan M, LiVolsi V a, Brose MS. BRAF mutation and thyroid cancer recurrence. J Clin Oncol. 2015; 33(1):7–8.
49. Virk RK, Dyke AL Van, Finkelstein A, Prasad A, Gibson J, Hui P, et al. BRAF V600E mutation in papillary thyroid microcarcinoma : a genotype – phenotype correlation. Mod Pathol. Nature Publishing Group; 2012; 26(1):62–70.
50. Cho N-Y, Choi M, Kim B-H, Cho Y-M, Moon KC, Kang GH. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. Int J cancer.2006; 119(8):1858–62.
51. Litvak AM, Paik PK, Woo KM, Sima CS, Hellmann MD, Arcila ME, et al. Clinical characteristics and course of 63 patients with BRAF mutant lung cancers. J Thorac Oncol. International Association for the Study of Lung Cancer; 2014; 9(11):1669–74.
52. Maurici D, Hainaut P. TP53 gene and p53 protein as targets in cancer management and therapy. H.W Doelle, E.J Da silva (Eds.), Encyclopedia of Life Support Systems, topic 6.58.5.5, UNESCO, EOLSS, Oxford (2001).
53. Fenoglio Preiser CM, Wang J, Stemmermann GN, Noffsinger a. TP53 and gastric carcinoma: a review. Hum Mutat. 2003; 21(3):258–70.
54. Li X-L, Zhou J, Chen Z-R, Chang W-J. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. World J Gastroenterol. 2015; 21(1):84–93.

55. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:978312.
56. Setaffy L, Langner C. Microsatellite instability in colorectal cancer: clinicopathological significance. *Pol J Pathol* 2015; 66(3):203–18.
57. 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 research.* 1998; 58,5248-5257.
58. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135(10):1269–77.
59. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology.* 2002; 123(6):1804–11.
60. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One.* 2010; 5(2):e9393.
61. Bedeir A, Krasinskas AM. Molecular Diagnostics of Colorectal Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 35, 578-587.
62. Jia Y, Guo M. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Chin J Cancer.* 2013; 32:21–30.

63. Li Yu-Xi, Lu Yao, Li Chun-Yu et al. Role of *CDH1* Promoter Methylation in Colorectal Carcinogenesis: A Meta-Analysis. *DNA and Cell Biology*. 2014, Vol. 33, No. 7: 455-462.
64. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Arjona D, Lomas J, de Campos JM, et al. CpG island methylation status and mutation analysis of the RB1 gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumours. *Br J Cancer*. 2003; 88(1):109–14.
65. Li X, Yao X, Wang Y, Hu F, Wang F, Jiang L, et al. MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. *PLoS One*. 2013; 8(3):e59064.
66. Shima K, Morikawa T, Baba Y, Nosho K, Suzuki M, et al. MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. *Cancer Causes Control*. 2011; 22: 301–309.
67. Wheeler JM, Kim HC, Efstathiou JA, Ilyas M, Mortensen NJ, Bodmer WF. Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (*CDH1*) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut*. 2001; 48(3):367-71.
68. Xing X, Cai W, Shi H, et al. The prognostic value of *CDKN2A* hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 2013; 108(12):2542-2548.
69. Soong R, Shah N, Peh BK, Chong PY, Ng SS, Zeps N, et al. The expression of *RUNX3* in colorectal cancer is associated with disease stage and patient outcome. *Br J Cancer*. 2009; 100(5):676–9.

70. Goel A, Arnold CN, Tassone P, Chang DK, Niedzwiecki D, Dowell JM, et al. Epigenetic inactivation of RUNX3 in microsatellite unstable sporadic colon cancers. *Int J Cancer*. 2004 10; 112(5):754–9.
71. Sinha R, Hussain S, Mehrotra R, Kumar RS, Kumar K, Pande P, et al. Kras gene mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT gene promoter hypermethylation: indicators of tumor staging and metastasis in adenocarcinomatous sporadic colorectal cancer in Indian population. *PLoS One*. 2013; 8(4):e60142.
72. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987; 196:261–282.
73. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:8681–8686.
74. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa J-PJ. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc. Natl. Acad Sci USA*. 2000; 97(2):710-715.
75. Bardhan K, Liu K. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers (Basel)*. 2013; 5:676–713.
76. Ang PW, Loh M, Liem N et al. Comprehensive profiling of ADN methylation in colorectal cancer reveals subgroups with distinct clinicopathological and molecular features. *BMC Cancer*. 2010; 10:227.
77. Yan W, Guo M. Epigenetics of colorectal cancer. *Methods Mol Biol*. 2015;2015(1238):405–24.

78. Vaiopoulos AG, Athanasoula KC, Papavassiliou AG. Epigenetic modifications in colorectal cancer: molecular insights and therapeutic challenges. *Biochim Biophys Acta*. Elsevier B.V.; 2014; 1842(7):971–80.
79. Silla IO, Rueda D, Rodríguez Y, García JL, de la Cruz Vigo F, Perea J. Early-onset colorectal cancer: a separate subset of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(46):17288–96.
80. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012; 3(3):153–73.
81. G.J. Poston, D. Tait, S. O'Connell, A. Bennett, S. Berendse Diagnosis and anagement of colorectal cancer: summary of NICE guidance *BMJ*, 343 (2011), p. d6751
82. Desantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer Treatment and Survivorship Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64(4):252-71
83. Chang DT, Pai RK, Rybicki L a, Dimaio M a, Limaye M, Jayachandran P, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features. *Mod Pathol*. Nature Publishing Group; 2012; 25(8):1128–39.
84. Kirzin S, Marisa L, Guimbaud R, De Reynies A, Legrain M, Laurent-Puig P, et al. Sporadic early-onset colorectal cancer is a specific sub-type of cancer: a morphological, molecular and genetics study. *PLoS One*. 2014; 9(8):e103159.
85. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. 2002; 38:867–71.

86. Tang XD CZ. APC, FBXW7, KRAS, PIK3CA, and TP53 Gene Mutations in Human Colorectal Cancer Tumors Frequently Detected by Next-Generation DNA Sequencing. *J Mol Genet Med*. 2014;08(04).
87. Sameer AS, Shah ZA, Abdullah S, Chowdri NA, Siddiqi MA. Analysis of molecular aberrations of Wnt pathway gliadators in colorectal cancer in the Kashmiri population. 2011;5(5):441–52.
88. Zhang J, Zheng J, Yang Y, Lu J, Gao J, Lu T, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Chinese colorectal cancer patients: analysis of 1,110 cases. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2015; 5:18678.
89. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. Elsevier; 2009; 205(12):858–62.
90. Knijn N, Mekenkamp LJM, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2011; 104(6):1020–6.
91. Hurtado C, Kronberg UDO, Castro M, Yamagiwa KEN, Ito T, Eishi Y, et al. Análisis molecular del cáncer de colon esporádico. 2015; 310–9.
92. Oikonomou E, Koustas E, Goulielmaki M, Pintzas A. BRAF vs RAS oncogenes : are mutations of the same pathway equal ? differential signalling and therapeutic implications. *Oncotarget*, 5 (2014), pp. 11752–11777

93. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, Tschaharganeh DF, van Es JH, Clevers H, et al. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell*. Elsevier Ltd.; 2015; 161(7):1539–52.
94. de Moura Gallo CV, Azevedo E Silva Mendonça G, de Moraes E, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutat Res*. 2005; 589(3):192–207.
95. Yamamoto, A.A. Lopes, A. Harb-Gama, M.A. Nagai, TP53 mutations and loss of heterozygosity of chromosome 17 in colorectal tumors, *Braz. J. Genet*. 19 (1996) 647–653.
96. J.C. Roa, I. Roa, A. Melo, J.C. Araya, M.A. Villaseca, M. Flores, B. Schneider, p53 gene mutation in colorectal cancer, *Rev. Med. Chil*. 128 (2000) 996–1004.
97. Herrera J, Isaza L, Ramírez J, Vásquez G, Muñetón C. Detección de aneuploidías del cromosoma 17 y delección del gen TP53 en una amplia variedad de tumores sólidos mediante hibridación in situ fluorescente bicolor. *Biomédica*. 2010; 30:390-400.
98. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53 -alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(14):9433-8.
99. Vasovcak P, Pavlikova K, Sedlacek Z, Skapa P, Kouda M, Hoch J, et al. Molecular genetic analysis of 103 sporadic colorectal tumours in Czech patients. *PLoS One*. 2011; 6(8):e24114.

100. Palacio-rúa KA, Isaza-jiménez LF, Ahumada-rodríguez E H. Ceballos-García, C.M. Muñetón-Peña. Análisis genético en APC, KRAS y TP53 en pacientes con cáncer de estómago y colon. 2015; 79(62).
101. Tang XD CZ. APC, FBXW7, KRAS, PIK3CA, and TP53 Gene Mutations in Human Colorectal Cancer Tumors Frequently Detected by Next-Generation DNA Sequencing. *J Mol Genet Med*. 2014; 08(04).
102. Al-Shamsi HO, Jones J, Fahmawi Y, Dahbour I, Tabash A, Abdel-Wahab R, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, TP53, and APC somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer: determination of frequency and distribution pattern. *J Gastrointest Oncol*. 2016; 7(6):882–902.
103. Zhou XL, Eriksson U, Werelius B, Kressner U, Sun XF, Lindblom A. Definition of candidate low risk APC alleles in a Swedish population. *Int J Cancer*. 2004 Jul 1; 110(4):550-7.
104. Rocco A, Caruso R, Toracchio S, Rigoli L, Verginelli F, Catalano T, et al. Gastric adenomas: relationship between clinicopathological findings, *Helicobacter pylori* infection, APC mutations and COX-2 expression. *Ann Oncol*. 2006; 17 Suppl 7:vii103-8.
105. Chang Y-S, Lin C-Y, Yang S-F, Ho C-M, Chang J-G. Analysing the mutational status of adenomatous polyposis coli (APC) gene in breast cancer. *Cancer Cell Int*. *BioMed Central*; 2016; 16:23.
106. Scott RJ, Crooks R, Rose L, Attia J, Thakkinstian A, Thomas L, et al. Germline Missense Changes in the APC Gene and Their Relationship to Disease. 2004; 2(2):81–91.

107. Fernandez Rozadilla C, de Castro L, Clofent J, Brea-Fernandez A, Bessa X, Abuli A, et al. Single nucleotide polymorphisms in the Wnt and BMP pathways and colorectal cancer risk in a Spanish cohort. *PLoS One*. 2010; 5(9).
108. Gulnur Zhunussova LD. Screening the APC, MLH1, MSH2 and TP53 Mutations in Patients with Early Onset of Colorectal Cancer. *J Carcinog Mutagen*. 2014; 05(06).
109. Wachsmannova-Matelova L, Stevurkova V, Adamcikova Z, Holec V and Zajac V: Polymorphisms in the adenomatous polyposis coli gene in Slovak families suspected of FAP. *Neuro Endocrinol Lett* 30 (Suppl 1): S25-S28, 2009.
110. Antontseva E V, Matveeva MY, Bondar NP, Kashina E V, Leberfarb EY, Bryzgalov LO, et al. Regulatory single nucleotide polymorphisms at the beginning of intron 2 of the human KRAS gene. *J Biosci*. 2015; 40(5):873–83.
111. Berggren P, Hemminki K, Steineck G. p53 intron 7 polymorphisms in urinary bladder cancer patients and controls. Stockholm Bladder Cancer Group. *Mutagenesis*. 2000; 15(1):57-60.
112. Polakova V, Pardini B, Naccarati a, Landi S, Slyskova J, Novotny J, et al. Genotype and haplotype analysis of cell cycle genes in sporadic colorectal cancer in the Czech Republic. *Hum Mutat*. 2009; 30(4):661–8.
113. Naccarati a, Pardini B, Polakova V, Smerhovsky Z, Vodickova L, Soucek P, et al. Genotype and haplotype analysis of TP53 gene and the risk of pancreatic cancer: an association study in the Czech Republic. *Carcinogenesis*. 2010; 31(4):666–70.
114. Vymetalkova V, Soucek P, Kunicka T, Jiraskova K, Brynychova V, Pardini B, et al. Genotype and Haplotype Analyses of TP53 Gene in Breast Cancer Patients:

- Association with Risk and Clinical Outcomes. *PLoS One*. 2015; 10(7):e0134463.
115. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. Elsevier Inc.; 2010;138(6):2073–2087.e3
116. Clarke CN, Kopetz ES. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. *J Gastrointest Oncol*. 2015; 6(6):660–7.
117. Nash GM, Gimbel M, Cohen AM, Zeng Z-S, Ndubuisi MI, Nathanson DR, et al. KRAS mutation and microsatellite instability: two genetic markers of early tumor development that influence the prognosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(2):416–24.
118. Hu J, Yan W, Xie L, Cheng L, Yang M, Li L, et al. Coexistence of MSI with KRAS mutation is associated with worse prognosis in colorectal cancer. *Medicine*. 2016, 95:50.
119. Montenegro Y, Ramírez-Castro JL, Isaza LF, Bedoya G, Muñetón-Peña CM. Análisis genético en paciente con cáncer colorrectal. *Rev Méd Chile*. 2006; 134: 1221-1229.
120. Siddique S, Tariq K, Rafiq S, Raheem A, Ahmed R, Shabbir-moosajee M, et al. Sporadic Early Onset Colorectal Cancer in Pakistan : a Case- Control Analysis of Microsatellite Instability. 2016; 17:2587–92.
121. Moghbeli M, Moaven O, Dadkhah E, Farzadnia M, Roshan NM. High frequency of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer patients in Iran. 2011; 10(4):3520–9.

122. Benatti P, Gafà R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005 1; 11(23):8332-40.
123. Phipps AI, Lindor NM, Jenkins MA, Baron JA, Win AK, Gallinger S, et al. colon and rectal cancer survival by tumor location and microsatellite instability: the colon cancer family registry. *NIH Public Access.* 2014; 56(8):937–44.
124. Bae JM, Kim JH, Kang GH. Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Their Clinicopathologic Features, With an Emphasis on the Serrated Neoplasia Pathway. *Arch Pathol Lab Med.* 2016; 140(5):406–12.
125. Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, et al. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut.* 2012; 61(6):847–854.
126. Li X, Yao X, Wang Y, Hu F, Wang F, et al. MLH1 Promoter Methylation Frequency in Colorectal Cancer Patients and Related Clinicopathological and Molecular Features. *PLoS ONE.* 2013; 8(3): e59064.
127. Vilkin A, Niv Y, Nagasaka T, Morgenstern S, Levi Z, Fireman Z, et al. Microsatellite instability, MLH1 promoter methylation, and BRAF mutation analysis in sporadic colorectal cancers of different ethnic groups in Israel. *Cancer.* 2009; 115(4):760-9.
128. de Vogel S, Weijenberg MP, Herman JG, Wouters KA, de Goeij AF, et al. MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events. *Ann Oncol.* 2009; 20: 1216–1222.

129. Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK, Tripp SR, Caan BJ, et al. Microsatellite instability and survival in rectal cancer. *Cancer Causes Control*. 2009; 20: 1763–1768.
130. Brennetot C, Buhard O, Jourdan F, Duval A, Hamelin R. Mononucleotide Repeats BAT-26 and BAT-25 Accurately Detect MSI-H Tumors and Predict Tumor Content : Implications for Population Screening. 2005; 450:446–50.
131. Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot C, Domingo E, Espin E, Armengol M, Yamamoto H, Hamelin R, Seruca R, Schwartz S. *BRAF* mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene*. 2003; 22: 9192-9196.
132. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman J, Allen B, et al. *BRAF* mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:191-195.
133. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, et al. Mutations of *BRAF* are associated with extensive *hMLH1* promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer*. 2004; 108:237-242.
134. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* .1998; 95:6870 –5.
135. Agostini M, Enzo MV, Morandi L, et al. A ten markers panel provides a more accurate and complete microsatellite instability analysis in mismatch repair-deficient colorectal tumors. *Cancer Biomark*. 2010; 6:49–61.

136. Meng WJ, Sun XF, Tian C, et al. Microsatellite instability did not predict individual survival in sporadic stage II and III rectal cancer patients. *Oncology*. 2007; 72:82–88.
137. Hatch SB, Lightfoot HM, Garwacki CP, et al. Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:2180–2187.
138. Huang YQ, Yuan Y, Ge WT, et al. Comparative features of colorectal and gastric cancers with microsatellite instability in Chinese patients. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010; 11:647–653.
139. Benson AB 3rd, Venook AP, Cederquist L, Chan E, Chen Y, Cooper HS, et al. Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017; 15(3):370–398.
140. Gay LJ, Arends MJ, Mitrou PN, Bowman R, Ibrahim AE, et al. MLH1 promoter methylation, diet, and lifestyle factors in mismatch repair deficient colorectal cancer patients from EPIC-Norfolk. *Nutr Cancer*. 2011; 63:1000–1010.
141. Psofaki V, Kalogera C, Tzambouras N, Stephanou D, Tsianos E. Promoter methylation status of hMLH1 , MGMT , and CDKN2A / p16 in colorectal adenomas. 2010; 16(28):3553–60.

13. ANEXOS

Anexo 1. Resultados de los análisis estadísticos entre las variables edad, sexo y hallazgos histopatológicas con las alteraciones moleculares analizadas.

	<i>APC</i>		<i>KRAS</i>		<i>TP53</i>		MSI		<i>MLH1</i>	
	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
Edad	0,000 **	1,000	0,000**	1,000	0,000**	1,000	2,207	0,332		1,000***
Sexo	0,225 **	0,635	0,000**	1,000	0,164**	0,685	6,111	0,047 *		0,723***
Tipo Histologico	5,846	0,054	3,953	0,139	0,372	0,830	1,357	0,852	2,931	0,231
Grado de diferenciacion	1,875	0,392	6,720	0,035*	1,263	0,532	1,280	0,865	0,147	0,929
Localización	4,083	0,665	10,324	0,112	3,865	0,695	9,432	0,666	5,698	0,458
Estadio TNM	2,224	0,527	8,353	0,039*	4,060	0,255	6,683	0,351	1,093	0,779

X² Chi cuadrado de Pearson

* Significativo estadísticamente

** Corrección por Yates

*** Prueba exacta de Fisher

Anexo 2. Descripción general de las características clínico patológicas de las 44 muestras de CCR analizadas y de los hallazgos de mutaciones en los genes analizados, MSI y metilación en el gen *MLH1*.

Caso	Edad	Sexo	Localización	Estadio	APC	KRAS	TP53	MSI	MLH1
1	70	F	Ciego	IV				MSI-L	M
2	82	F	Proximal	II	c.4463 T>C			MSS	UM
3	ND	F	ND	ND				MSI-L	M
4	ND	F	ND	ND				MSS	ND
5	72	M	Proximal	II				MSI-H	M
6	42	M	Sigmoide	II				MSS	M
7	42	F	Sigmoide	ND				MSS	M
8	48	F	Sigmoide	III	c.4463 T>C			MSS	ND
9	90	F	Transverso	IV				MSI-L	M
10	79	F	Proximal	II				MSS	M
11	58	M	Sigmoide	I				MSI-H	M
12	81	M	Proximal	II				MSI-H	M
13	39	F	Proximal	IV				MSS	M
14	66	F	Proximal	II			c.493C>T	MSS	M
15	36	F	Transverso	ND		c.35G>A		MSI-H	M
16	63	F	Proximal	I	c.4463 T>C			MSS	UM
17	73	F	angulo Hepatico	II		c.35G>A		MSS	M
18	63	M	Sigmoide	II				MSS	ND
19	59	M	Sigmoide	IV				MSS	M
20	62	M	Proximal	I				MSI-L	M
21	81	M	Sigmoide	I				MSI-L	M
22	53	M	Sigmoide	II				MSI-H	M
23	79	M	Sigmoide	II				MSI-L	M
24	23	F	Transverso	II				MSS	UM
25	31	F	Sigmoide	III				MSS	M
26	70	F	Transverso	IV	c.4562 G>T	c.35G>A		MSS	M
27	61	F	ND	ND				MSS	M
28	64	F	Sigmoide	IV				MSS	M
29	76	F	Proximal	IV	c.4651A>T	c.38G>A		MSS	M
30	57	F	Recto	I				MSS	M
31	59	F	Recto	II			c.546C>A	MSS	UM
32	51	M	Distal	I				MSS	UM
33	12	F	Recto	II	c.4420A>G			MSS	UM
34	71	F	Sigmoide	IV		c.35G>A		MSS	UM
35	54	M	Recto	I		c.34G>A		MSS	M
36	ND	M	Proximal	ND		c.35G>A		MSI-L	UM
37	66	F	Proximal	I				MSS	M
38	80	F	Recto	III				MSS	M
39	62	F	Sigmoide	IV		c.34G>A		MSS	M
40	45	F	Transverso	III		c.38G>A		MSS	M
41	82	M	Proximal	IV	c.4348 C>T	c.38G>A		MSS	UM
42	66	M	Angulo Hepatico	IV	c.4348 C>T	c.35G>A		MSS	M
43	67	M	Sigmoide	III				MSS	UM
44	76	M	Proximal	III				MSS	UM

ND: No Determinado(a)

MSS: Estable

MSI-H: Inestabilidad microsatelital alta

MSI-L: Inestabilidad microsatelital baja

M: metilado

UM: No metilado

Anexo 3.Consentimiento informado

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

INVESTIGACIÓN: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y EPIGENETICA EN INDIVIDUOS CON CÁNCER COLORRECTAL

Hago constar que he leído la información proporcionada, o me ha sido leída. Entiendo que el consentimiento voluntario es requerido para todas las personas que participen en este proyecto. Se me ha explicado en un lenguaje claro los procedimientos experimentales que se realizarán con la muestra tumoral que yo autorizo a enviar a la Unidad de Genética Médica. Me han explicado las implicaciones de mi participación, los riesgos y beneficios de este estudio, además, he tenido la oportunidad de preguntar las dudas y se me han respondido satisfactoriamente.

Yo tengo derecho a la privacidad y confidencialidad de la información obtenida en este estudio, por lo que la información que pueda identificarme sólo será conocida por los investigadores, quienes podrán tener acceso a mi historia clínica si es necesario. Los resultados de este estudio pueden ser divulgados en eventos nacionales y/o internacionales o ser publicados en revistas científicas sin identificarme por mi nombre.

Acepto voluntariamente participar como sujeto de investigación en el proyecto antes mencionado y entiendo que se me dará una copia de este documento.

Fecha: DD: ____ MM: ____ AA:____ Lugar: _____

Nombre del participante:
Cédula de Ciudadanía :
Dirección de residencia:
Teléfono:
Edad:
Sexo:
Número de Historia clínica:
FIRMA:

Testigos: He sido testigo de la lectura del documento de consentimiento informado al potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado el consentimiento libremente.

Nombre del Testigo 1:	
Cédula de Ciudadanía :	
Parentesco con el paciente:	
Dirección:	Teléfono:
FIRMA:	

Nombre del Testigo 2:	
Cédula de Ciudadanía :	
Parentesco con el paciente:	
Dirección:	Teléfono:
FIRMA:	

Firma del director del proyecto:

Nombre del Investigador Principal:
Cédula de Ciudadanía :
Dirección Laboral
Teléfono:
Correo electrónico:
FIRMA:

Anexo 4. Formato empleado para obtener la información clínico patológica de la historia clínica de los pacientes CCR incluidos en el estudio.

“CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y EPIGENÉTICA DEL CÁNCER COLORRECTAL”									
Carlos Añador Ayala , Luís Fernando Isaza Jiménez, Enoc Ahumada Rodríguez, Katherine Andrea Palacio Rúa, Hamilton Ceballos García, Carlos Mario Muñetón Peña.									
UNIDAD DE GENETICA MEDICA -FINANCIADO POR LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA									
Datos del paciente									
Nº de Historia Clínica						Nº Historia Genemed			
Nombre del Paciente									
Telefono		Celular				e-mail			
Dirección			Sexo:		F	M	Ocupación		
Fecha de nacimiento (/ /)						Fecha de Diagnóstico (/ /)			
Edad		Lugar de Procedencia:							
Institución									
Médico Remitente					Cirujano				
Hábitos									
Fuma	Si	No	Frecuencia			Alcohol	Si	No	Frecuencia
Drogas	Si	No	Frecuencia			Cuales			
Dieta (Carne, Grasas s			Si	No	Frecuencia			Otros	
Dieta (vegetales, frutas			Si	No	Frecuencia			Otros	
IMC				Peso (Kg)				Estatura (cm)	
Antecedentes Oncológicos Familiares									
Enfermedad neoplasica previa			Si	NO	Cuál				
Antecedentes Clínicos personales									
Ayudas diagnósticas									
Tratamiento quimioterapéutico									
Neoadyuvante		Si	No	Cual					
Adyuvante	Si	No	Cual						
Informe de Patología									
Fecha		Consecutivo			Patólogo				
Institucion				Tipo de muestra			Tamaño (cm)		
Compromiso Ganglion			Si	No	Localización				
Metástasis	Si	No	Localización						
Descripción Macroscópica									
Descripción Microscópica:									
Diagnostico Histopatológico:									
Observaciones y Comentarios Finales									
Realizado por					Fecha				