



Biología molecular del cáncer colorectal

Técnicas moleculares que ayuden al diagnóstico, pronóstico y tratamiento

Dra. Miriam Cuatrecasas

XXIII Congreso Chileno de Anatomía Patológica

Viña del Mar, Chile. 16-18 octubre 2019

mcuatrec@clinic.cat

Tumores - Factores pronósticos

Factores Patológicos

Estadio tumoral (pTNM)

- Invasión local del tumor (pT)
- Ganglios linfáticos (pN)
- Metástasis a distancia (pM)

Grado histológico

Invasión vascular

Invasión perineural

Factores moleculares

- * Identificación de marcadores en tumores / pacientes
- * Indicadores de fenotipo metastático en tumores

Clasificación Molecular

- Expresión de **biomarcadores** con patrón constante o “firmas” de gen / proteína entre subgrupos de tumores o carcinomas
- Refleja características biológicas comunes, útiles para el diagnóstico, pronóstico y la selección de la mejor terapia dirigida para un paciente

Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer

Alexandre Calon¹, Enza Lonardo¹, Antonio Berenguer-Llargo¹, Elisa Espinet^{1,6}, Xavier Hernando-Momblona¹, Mar Iglesias²⁻⁴, Marta Sevillano¹, Sergio Palomo-Ponce¹, Daniele V F Tauriello¹, Daniel Byrom¹, Carme Cortina¹, Clara Morral¹, Carles Barceló¹, Sebastien Tosi¹, Antoni Riera¹, Camille Stephan-Otto Attolini¹, David Rossell^{1,6}, Elena Sancho¹ & Eduard Batlle^{1,5}

Recent molecular classifications of colorectal cancer (CRC) based on global gene expression profiles have defined subtypes displaying resistance to therapy and poor prognosis. Upon evaluation of these classification systems, we discovered that their predictive power arises from genes expressed by stromal cells rather than epithelial tumor cells. Bioinformatic and immunohistochemical analyses identify stromal markers that associate robustly with disease relapse across the various classifications. Functional studies indicate that cancer-associated fibroblasts (CAFs) increase the frequency of tumor-initiating cells, an effect that is dramatically enhanced by transforming growth factor (TGF)- β signaling. Likewise, we find that all poor-prognosis CRC subtypes share a gene program induced by TGF- β in tumor stromal cells. Using patient-derived tumor organoids and xenografts, we show that the use of TGF- β signaling inhibitors to block the cross-talk between cancer cells and the microenvironment halts disease progression.

The consensus molecular subtypes of colorectal cancer

Justin Guinney^{1,21}, Rodrigo Dienstmann^{1,2,21}, Xin Wang^{3,4,21}, Aurélien de Reyniès^{5,21}, Andreas Schlicker^{6,21}, Charlotte Soneson^{7,21}, Laetitia Marisa^{5,21}, Paul Roepman^{8,21}, Gift Nyamundanda^{9,21}, Paolo Angelino⁷, Brian M Bot¹, Jeffrey S Morris¹⁰, Iris M Simon⁸, Sarah Gerster⁷, Evelyn Fessler³, Felipe De Sousa E Melo³, Edoardo Missiaglia⁷, Hena Ramay⁷, David Barras⁷, Krisztian Homicsko¹¹, Dipen Maru¹⁰, Ganiraju C Manyam¹⁰, Bradley Broom¹⁰, Valerie Boige¹², Beatriz Perez-Villamil¹³, Ted Laderas¹, Ramon Salazar¹⁴, Joe W Gray¹⁵, Douglas Hanahan¹¹, Josep Tabernero², Rene Bernards⁶, Stephen H Friend¹, Pierre Laurent-Puig^{16,17,22}, Jan Paul Medema^{3,22}, Anguraj Sadanandam^{9,22}, Lodewyk Wessels^{6,22}, Mauro Delorenzi^{7,18,19,22}, Scott Kopetz^{10,22}, Louis Vermeulen^{3,22} & Sabine Tejpar^{20,22}

Received 6 March; accepted 6 September; published online 12 October 2015;
doi:10.1038/nm.3967

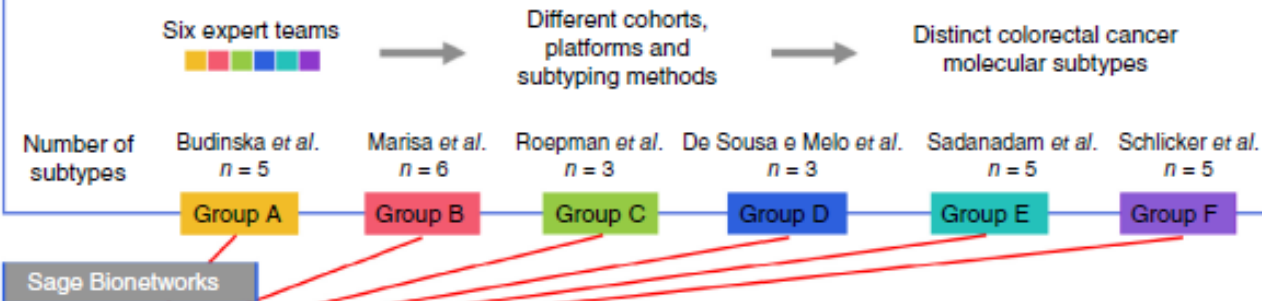
Colorectal cancer (CRC) is a frequently lethal disease with heterogeneous outcomes and drug responses. To resolve inconsistencies among the reported gene expression-based CRC classifications and facilitate clinical translation, we formed an international consortium dedicated to large-scale data sharing and analytics across expert groups. We show marked interconnectivity between six independent classification systems coalescing into **four consensus molecular subtypes (CMSs) with distinguishing features:** **CMS1 (microsatellite instability immune, 14%),** hypermutated, microsatellite unstable and strong immune activation; **CMS2 (canonical, 37%),** epithelial, marked WNT and MYC signaling activation; **CMS3 (metabolic, 13%),** epithelial and evident metabolic dysregulation; and **CMS4 (mesenchymal, 23%),** prominent transforming growth factor- β activation, stromal invasion and angiogenesis. Samples with mixed features (13%) possibly represent a transition phenotype or intratumoral heterogeneity. **We consider the CMS groups the most robust classification system currently available for CRC—with clear biological interpretability—and the basis for future clinical stratification and subtype-based targeted interventions.**

Comparison of published molecular subtyping platforms

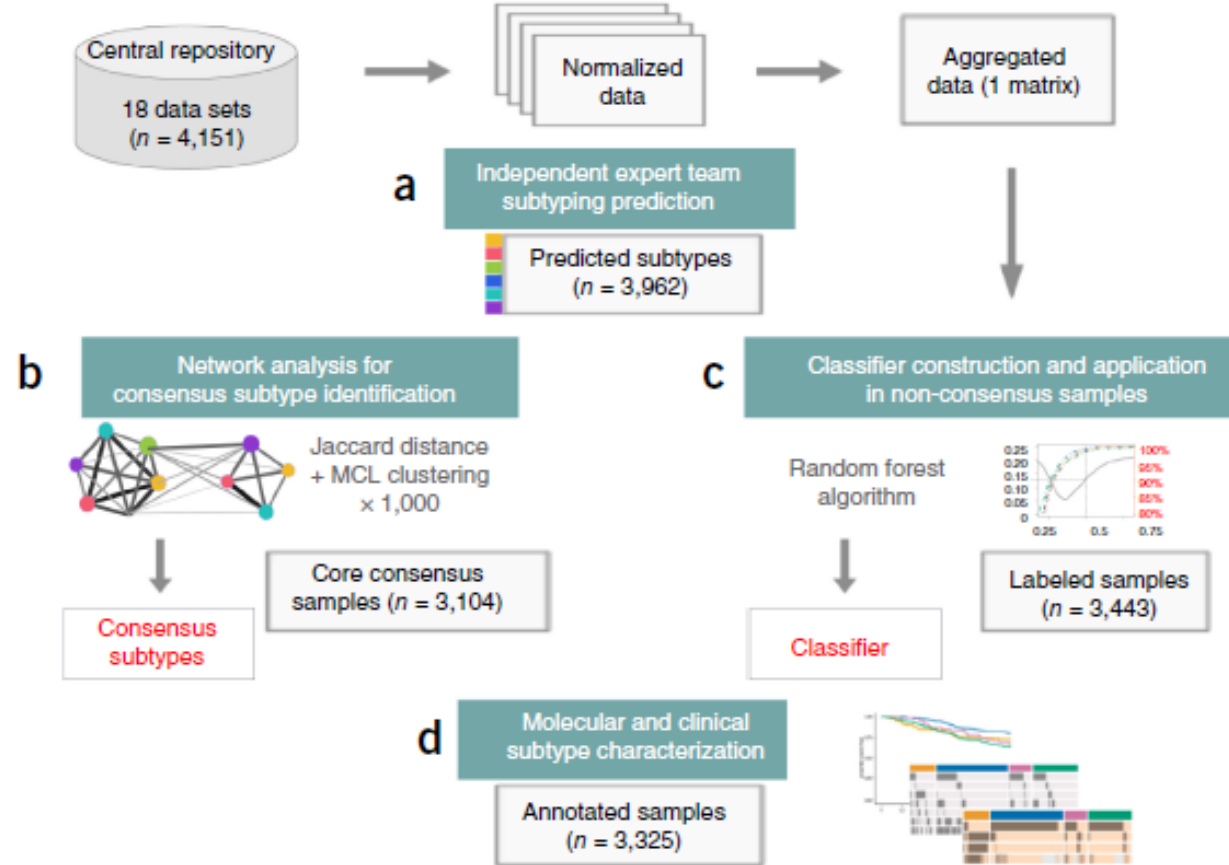
Evaluation of 6 CRC subtyping algorithms, each developed independently using different gene expression data sets and analytical approaches

- 18 CRC data sets (n = 4,151 patients)
 - Public, The Cancer Genome Atlas (TCGA), private gene expression platforms (Affymetrix, Agilent and RNA-sequencing), sample collections (fresh-frozen and FFPE) and 1 clinical trial—were uniformly preprocessed and normalized from the raw formats to reduce technical variation
 - Application of an association network, nodes corresponded to the union of all group subtypes (n = 27), and weighted edges encoded the Jaccard similarity coefficients between nodes
 - Application of a Markov cluster (MCL) algorithm to this network to detect the presence of robust network substructures that would indicate recurring subtype patterns

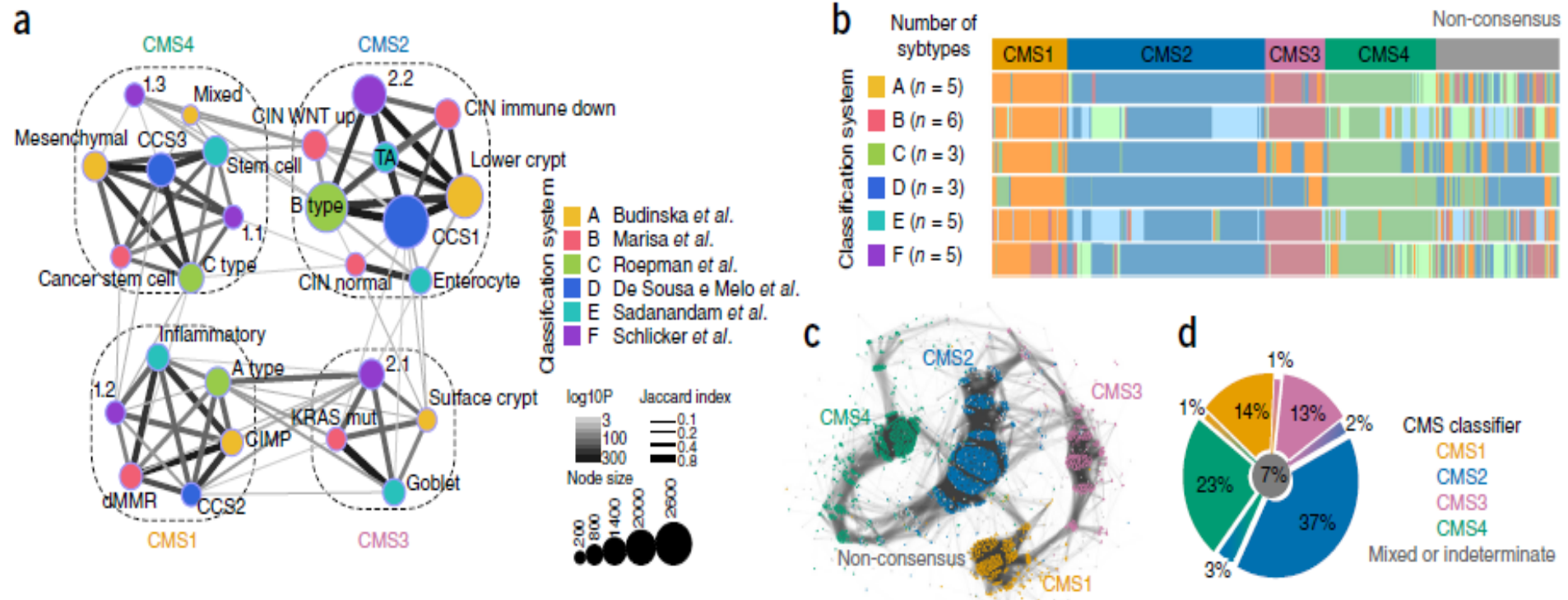
Single expert teams subtyping approaches

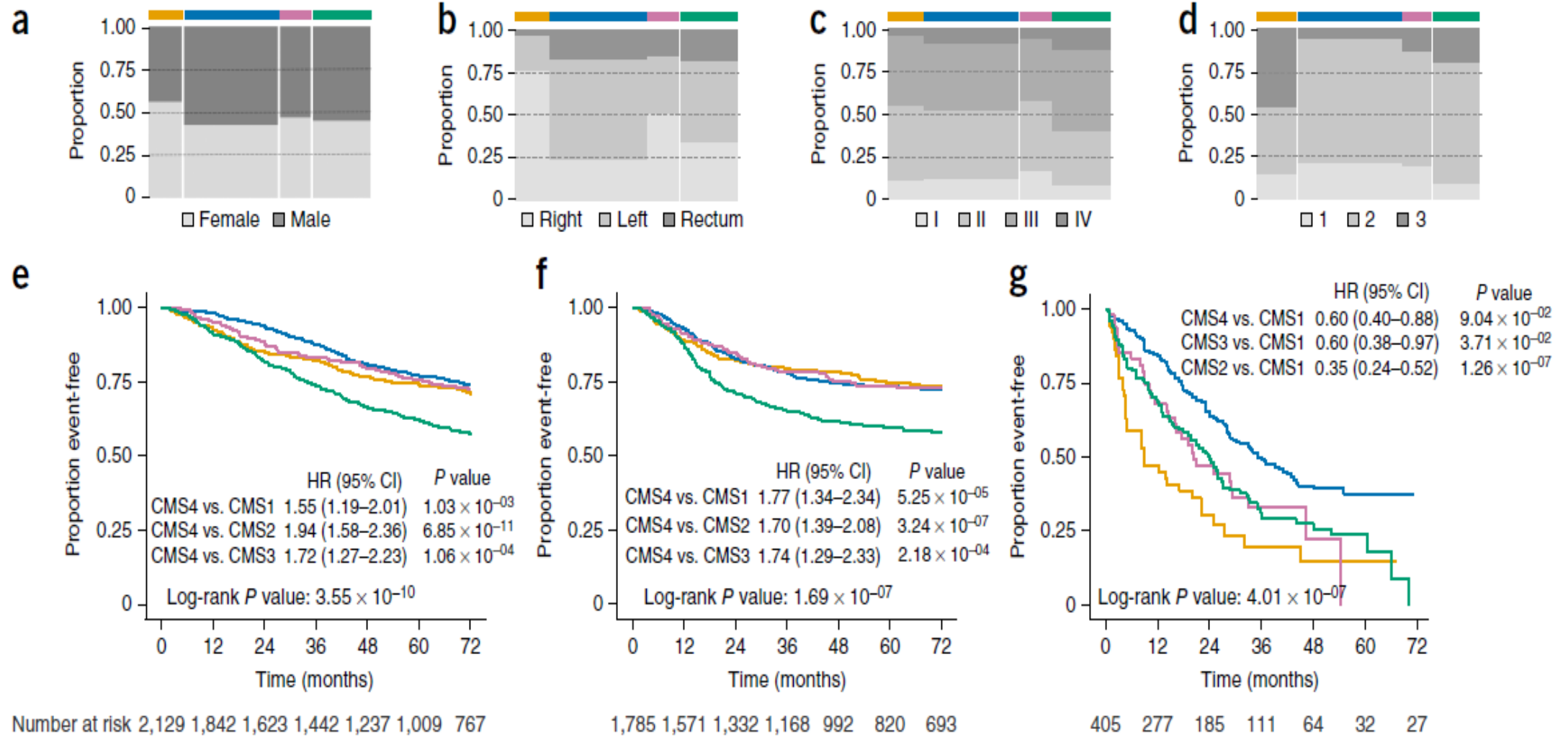


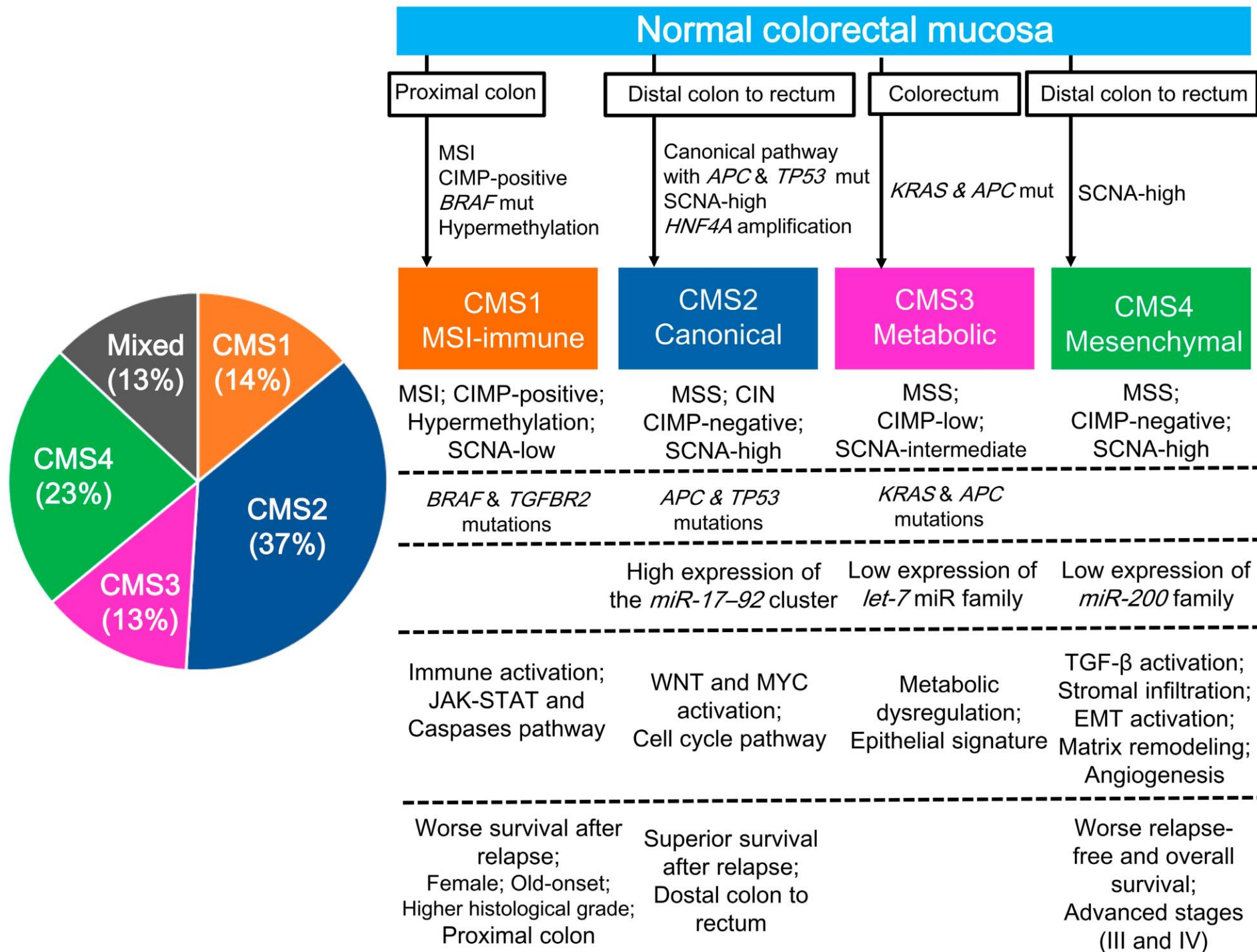
Multiple expert teams subtyping approach



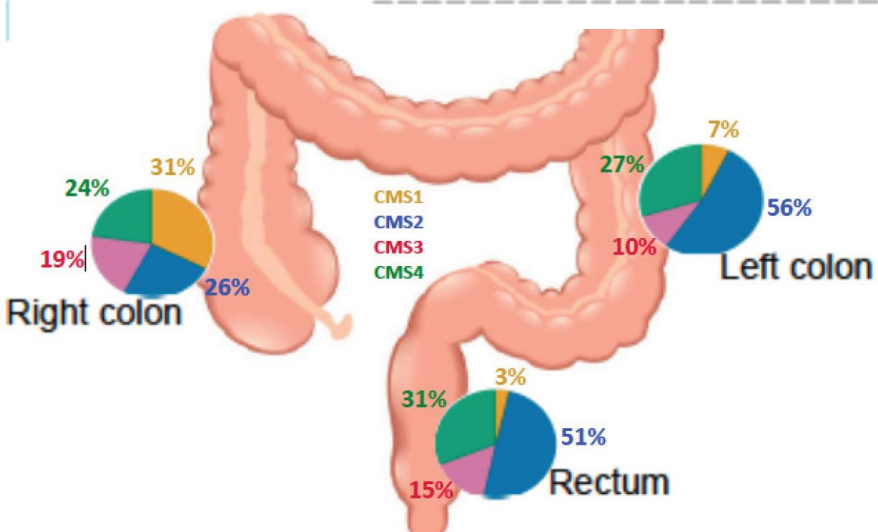
- Identification of 4 robust consensus molecular subtypes (CMSs) with significant interconnectivity ($P < 0.001$, hypergeometric test) among the six independent classification systems
- ‘Mixed’ samples were not outliers and did not represent a fifth independent subtype, although the quality of gene expression data could have affected a small subset of samples



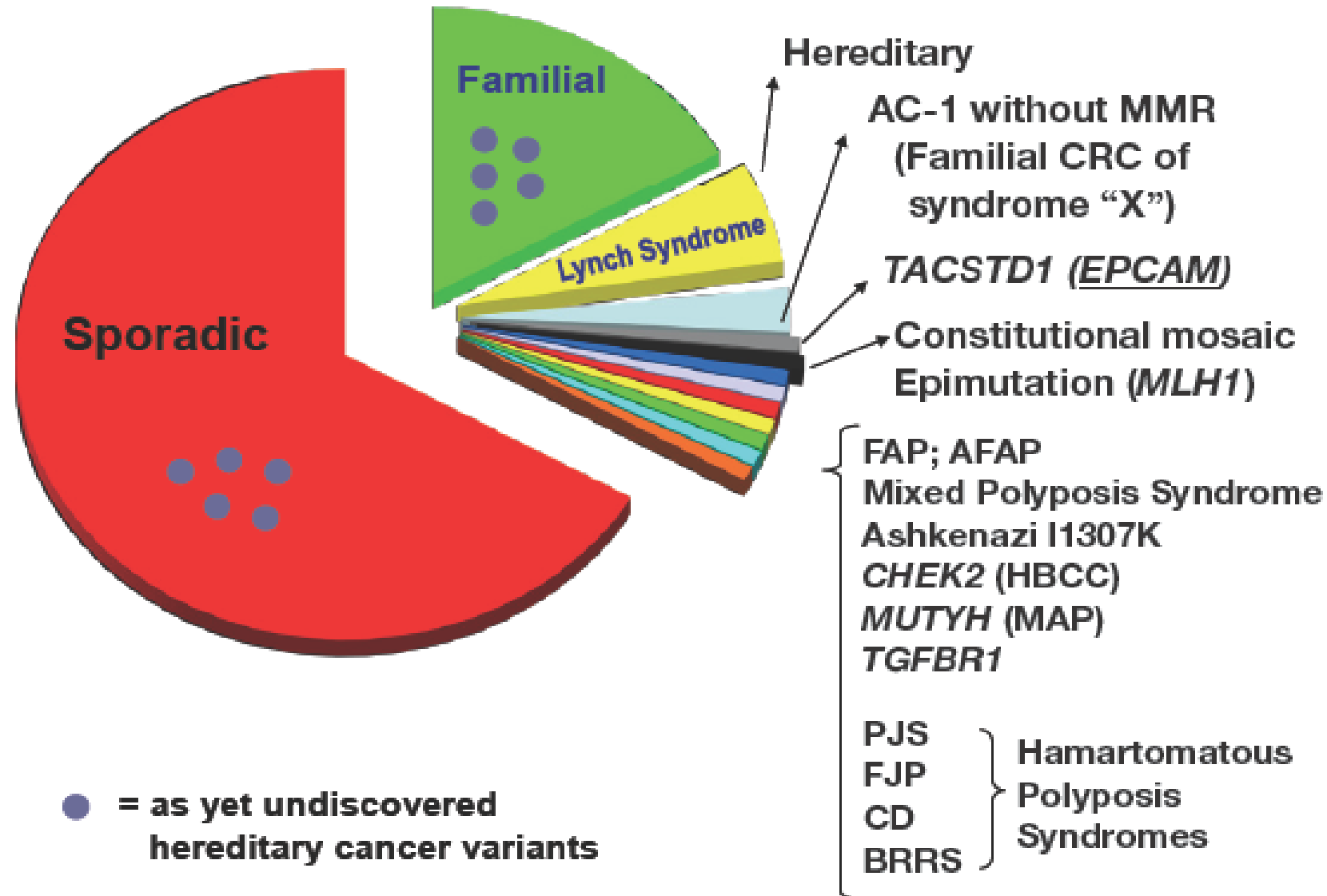


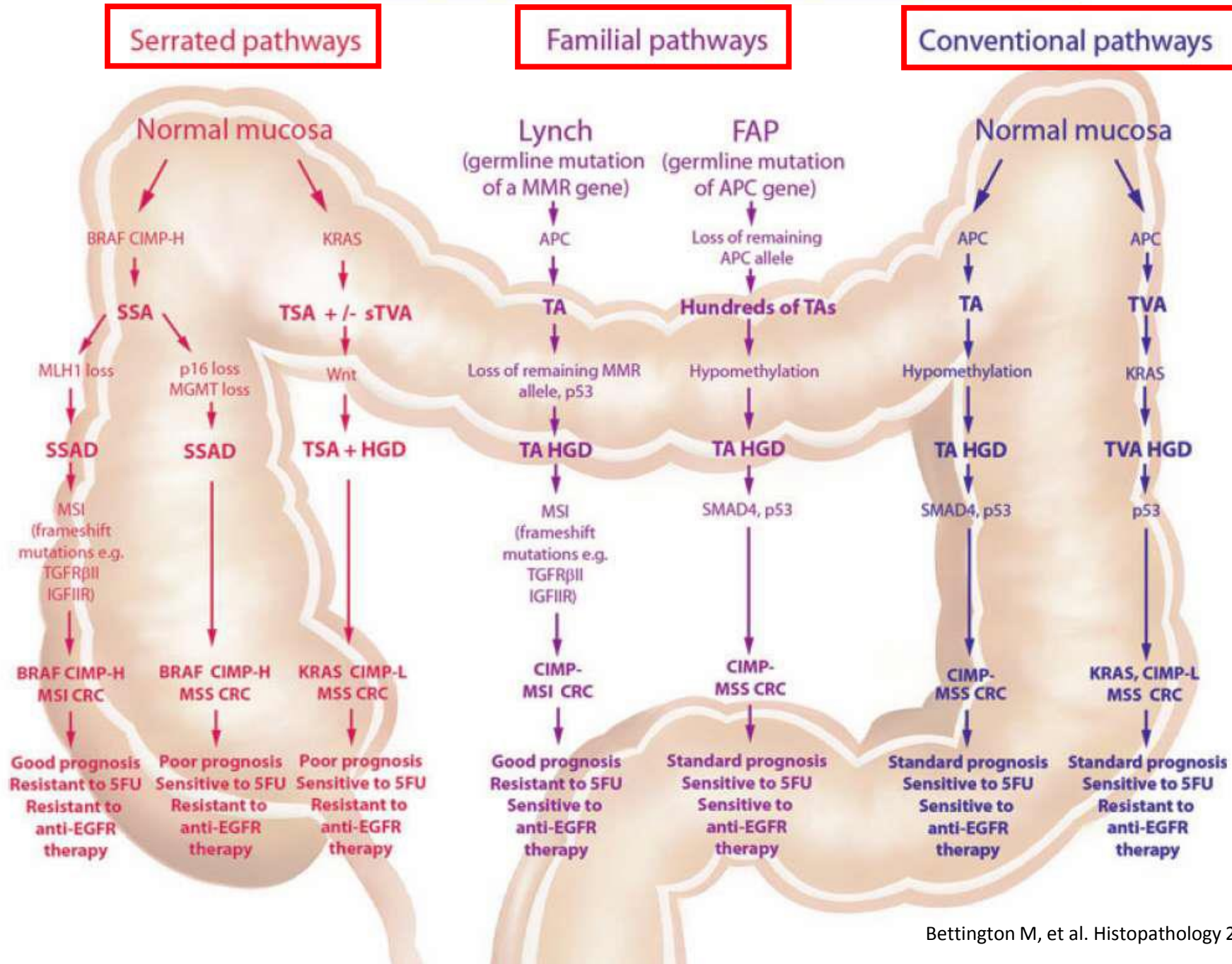


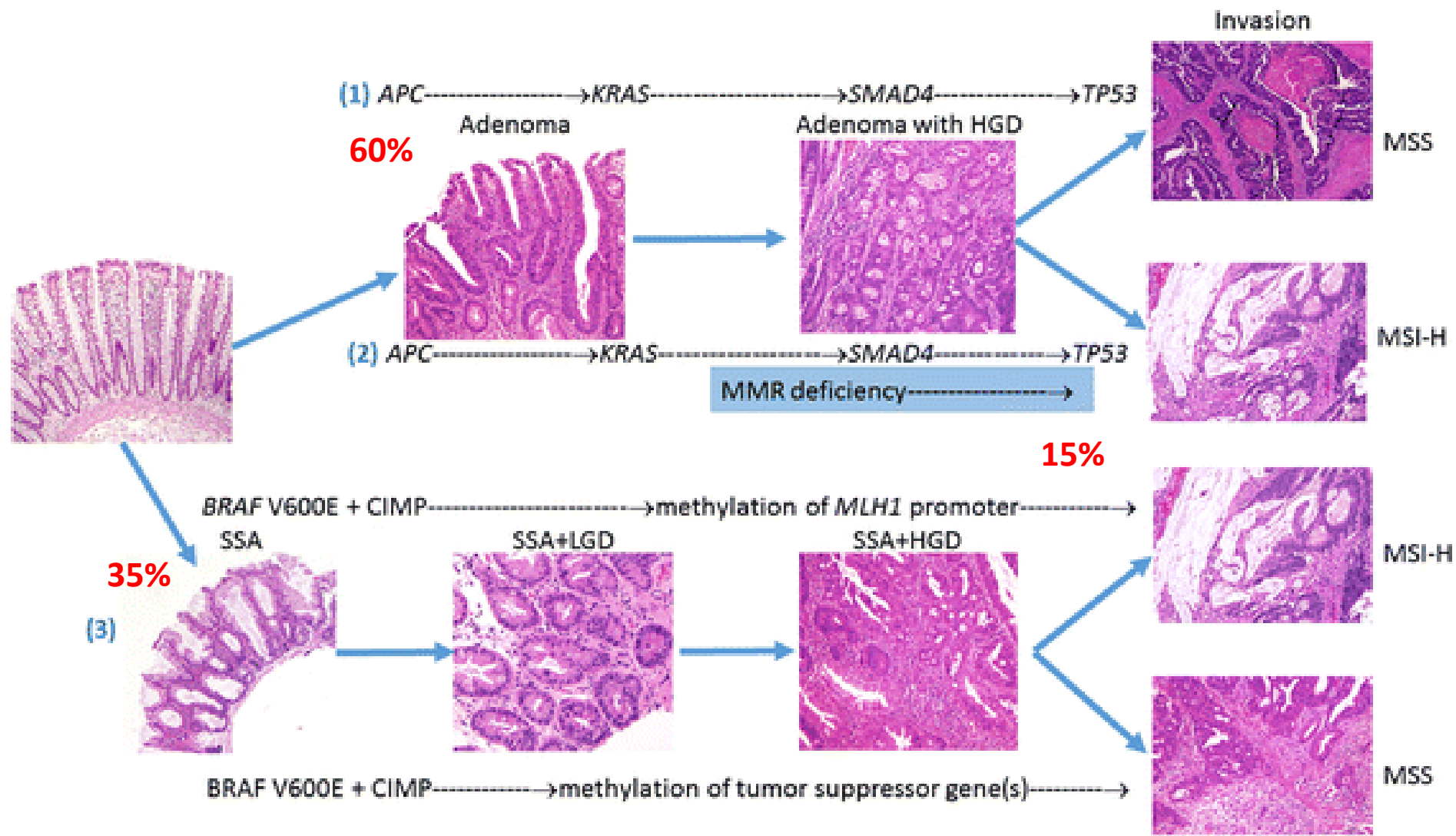
CMS1 MSI immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermethylation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGF- β activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

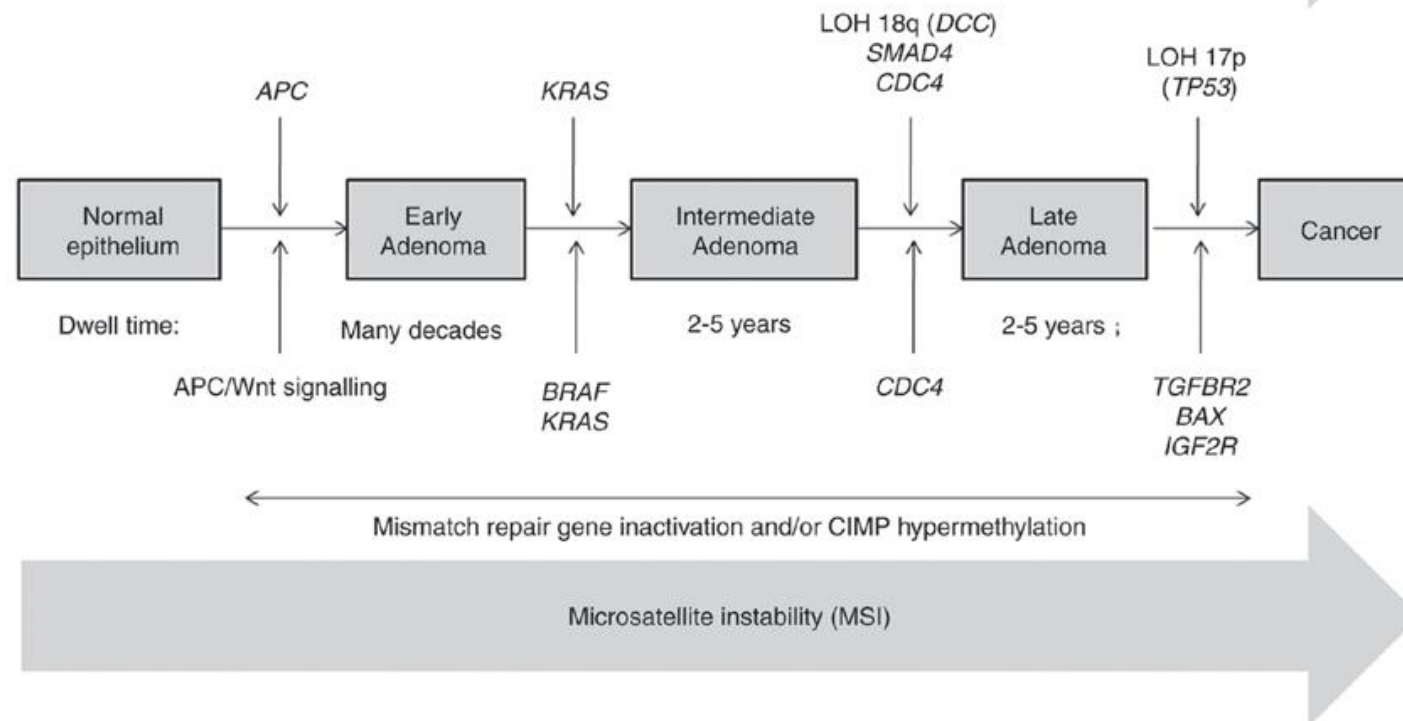
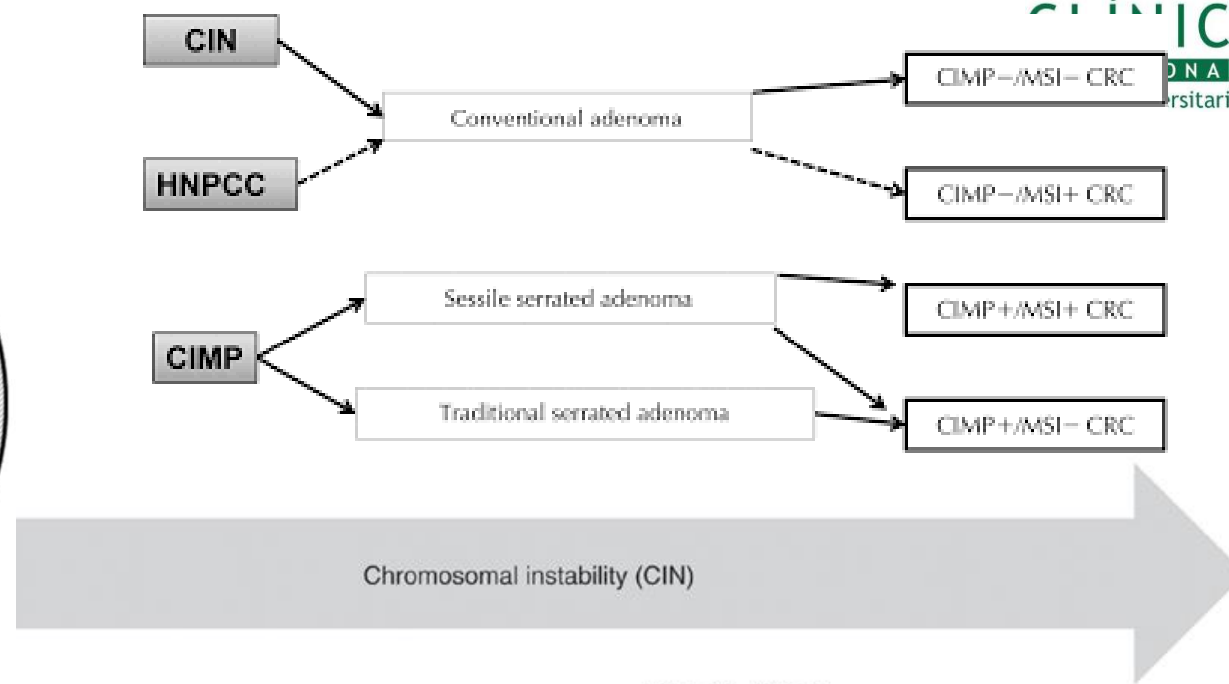
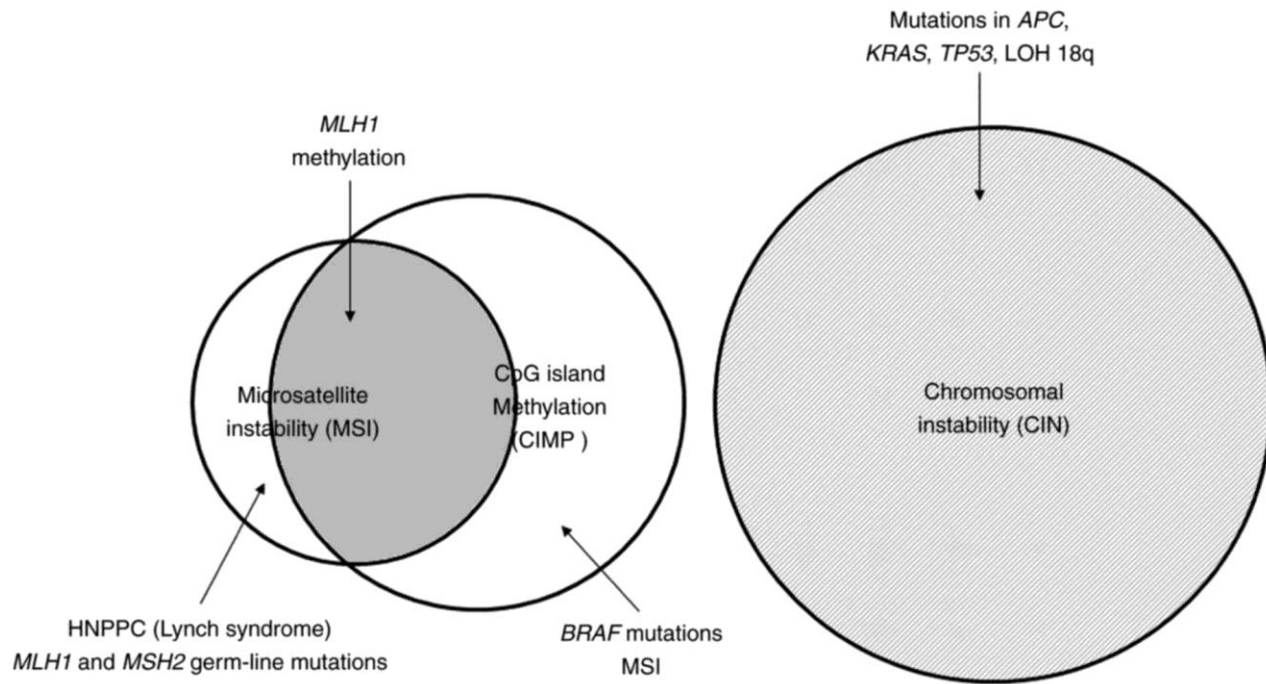


Alteraciones moleculares en CCR









Patología molecular en cáncer colorectal

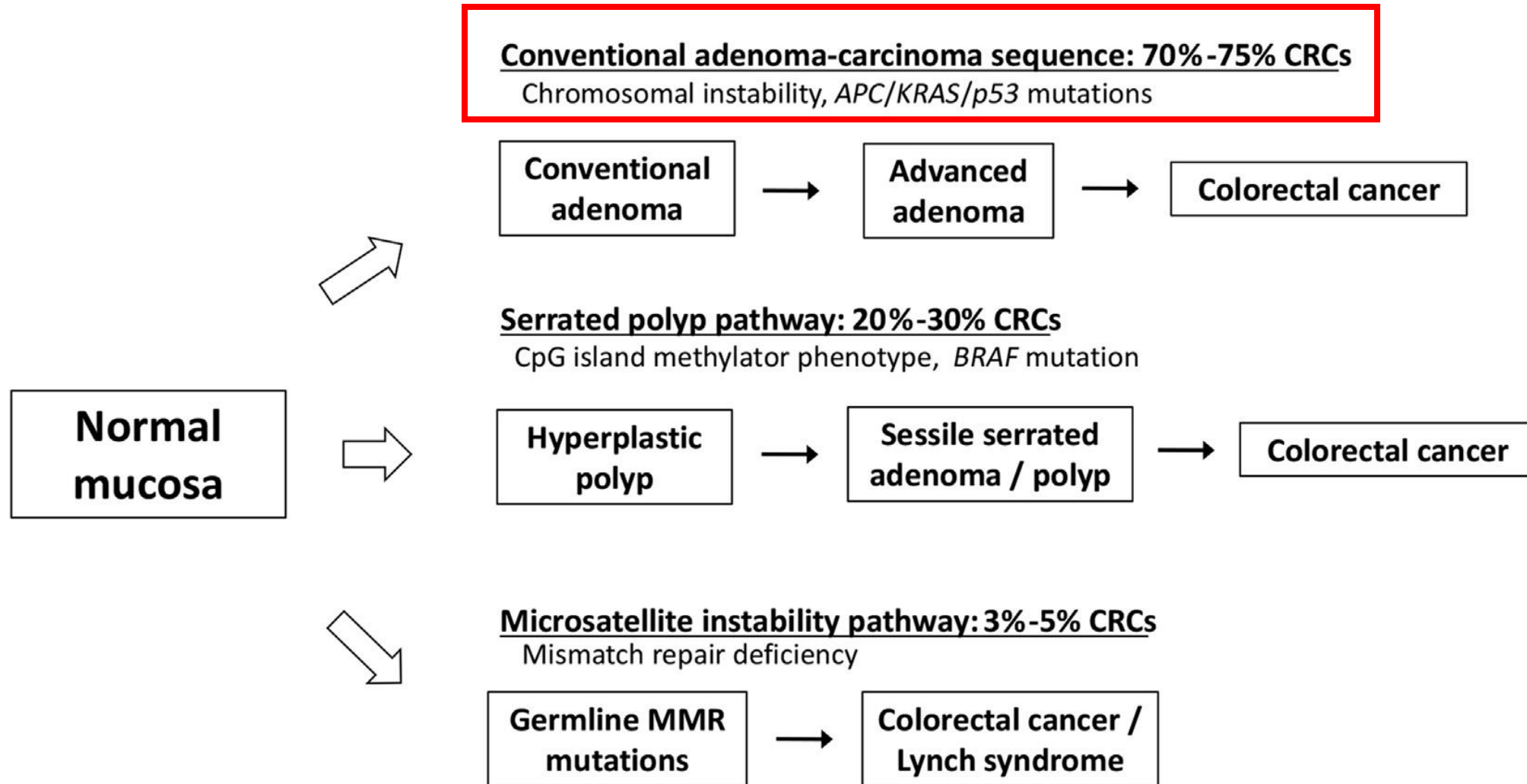
Implicación del patólogo en la práctica diaria:

Cribado de cáncer hereditario

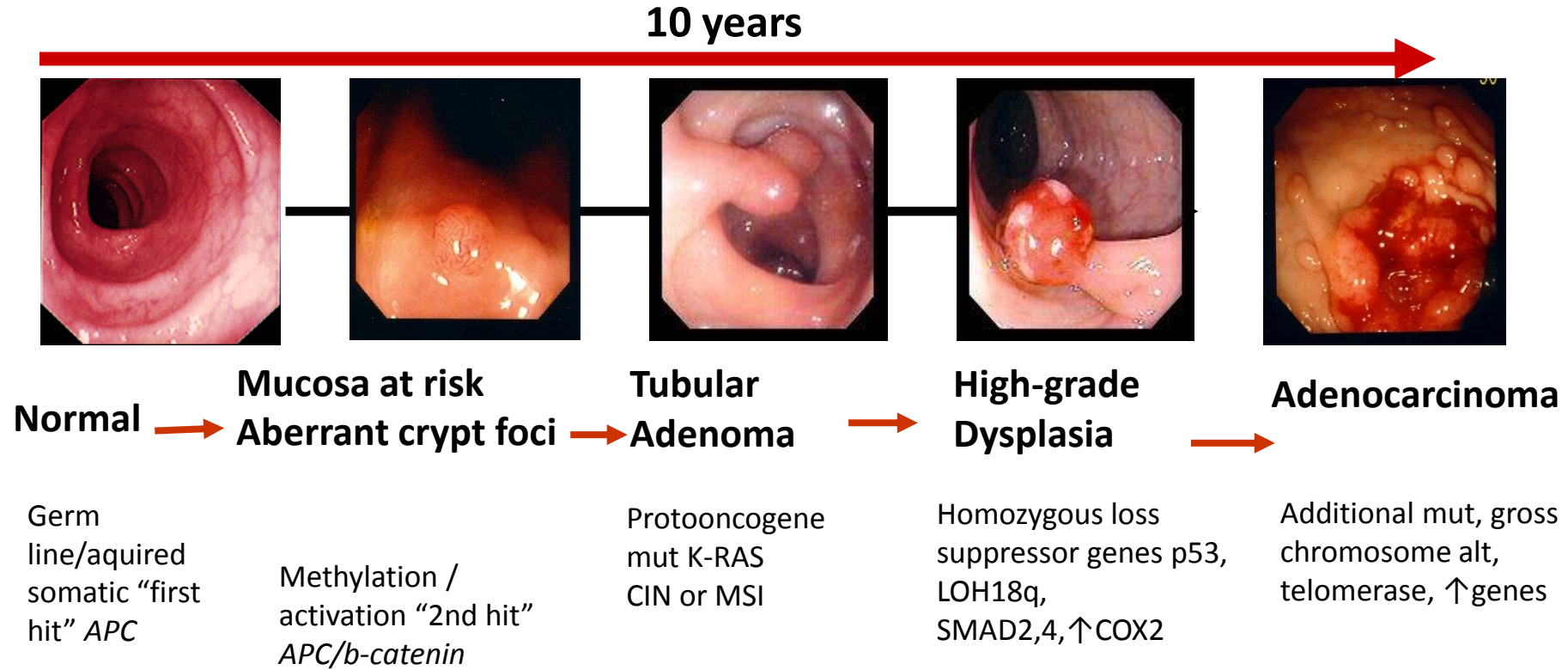
Manejo terapéutico – dianas/inmunoterapia

- Inestabilidad de microsatélites MSS/MSI (IHQ o PCR)
- **K/NRAS** (*en pacientes metastáticos*)
- **BRAF**

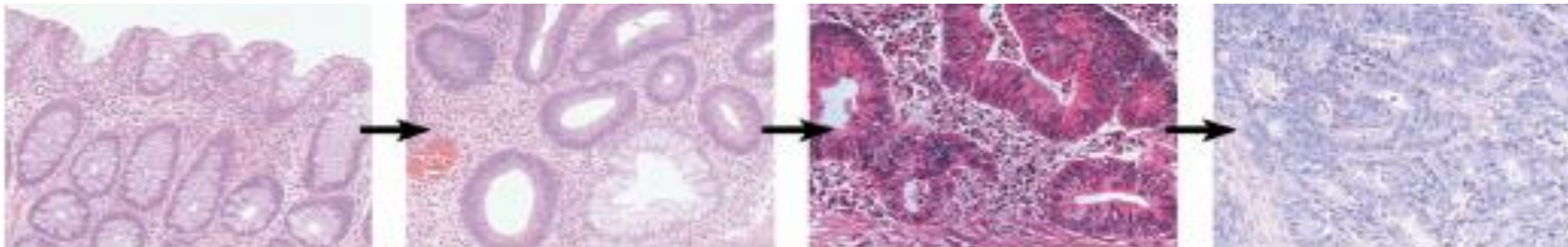
Alteraciones moleculares en CCR



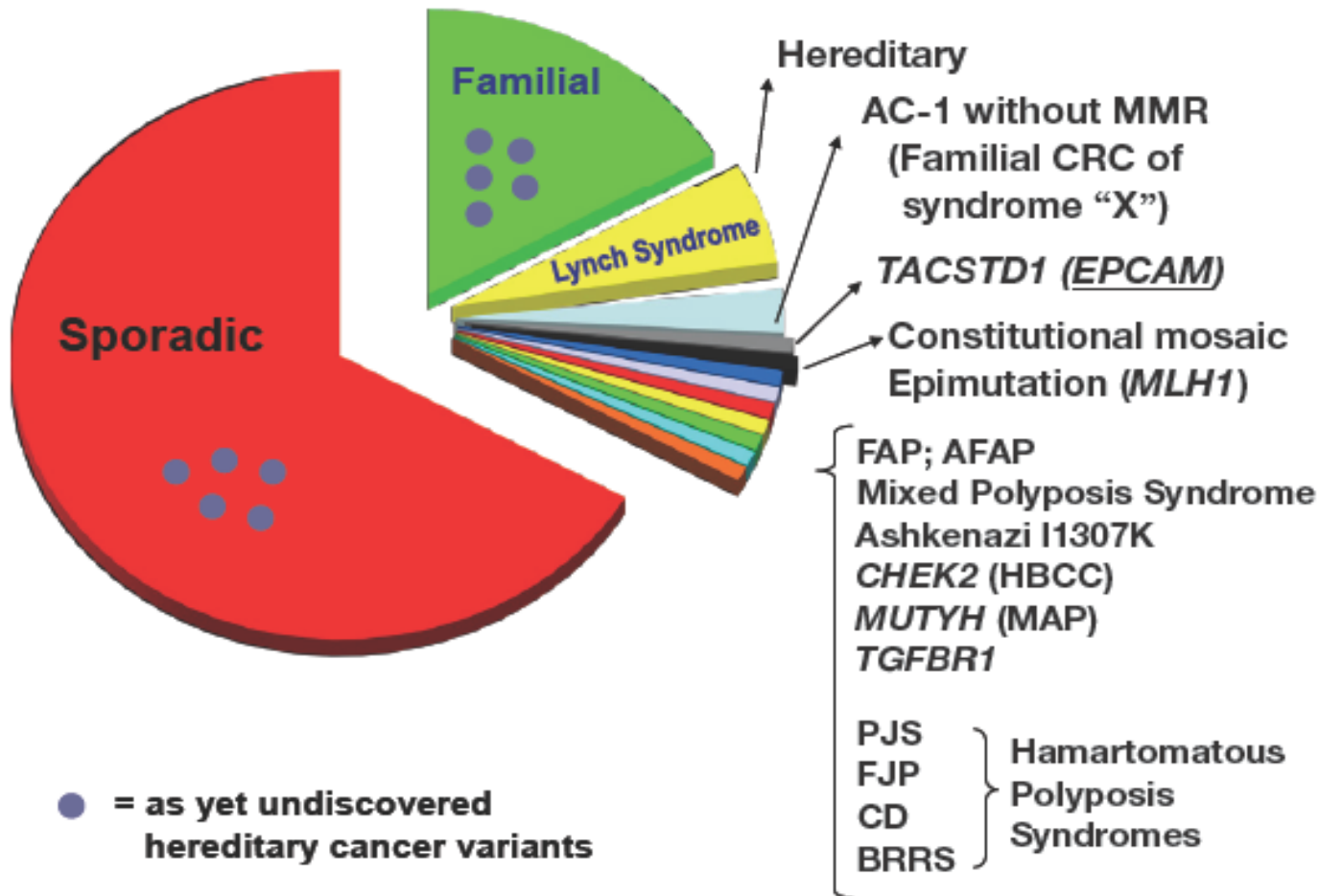
Chromosomal instability



Progressive accumulation of mutations (APC, RAS, p53, etc...)



Chromosomal instability

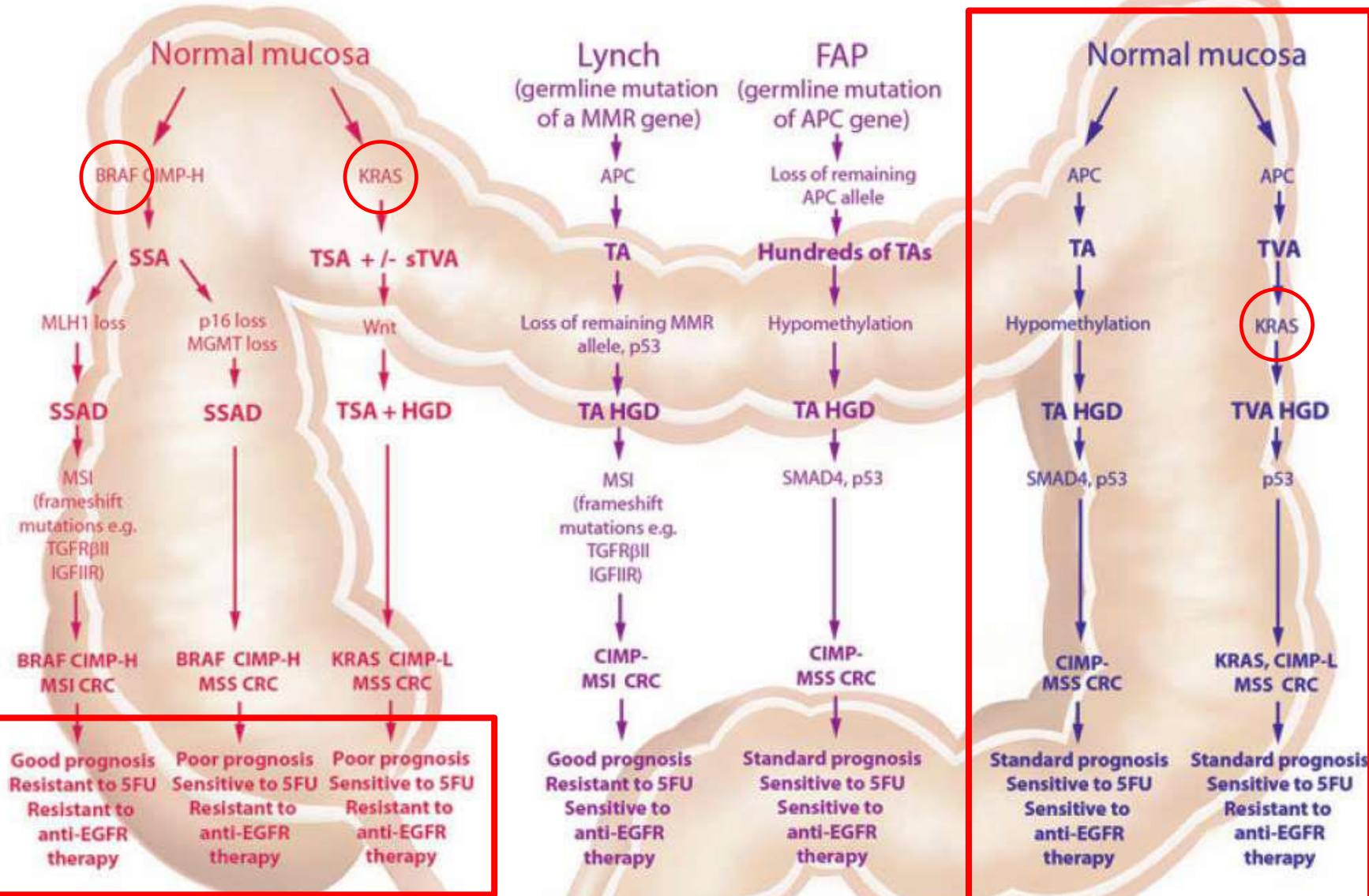


- CCR esporádico
- Poliposis adenomatosa familiar
- CCR en enfermedad inflamatoria intestinal crónica (mutaciones precoces en *TP53* y tardías en *APC*)
- Síndrome asociado a *POLE/POLD1*

Serrated pathways

Familial pathways

Conventional pathways

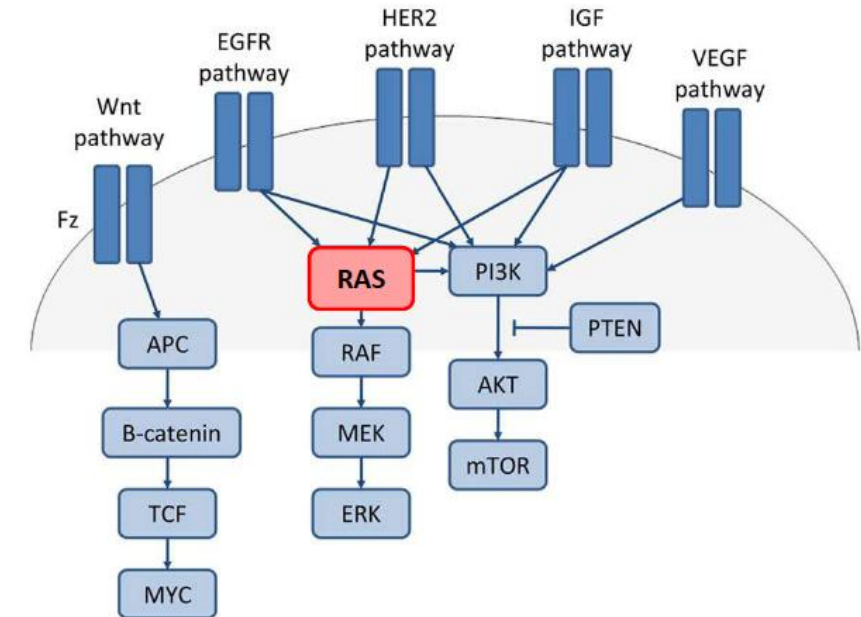
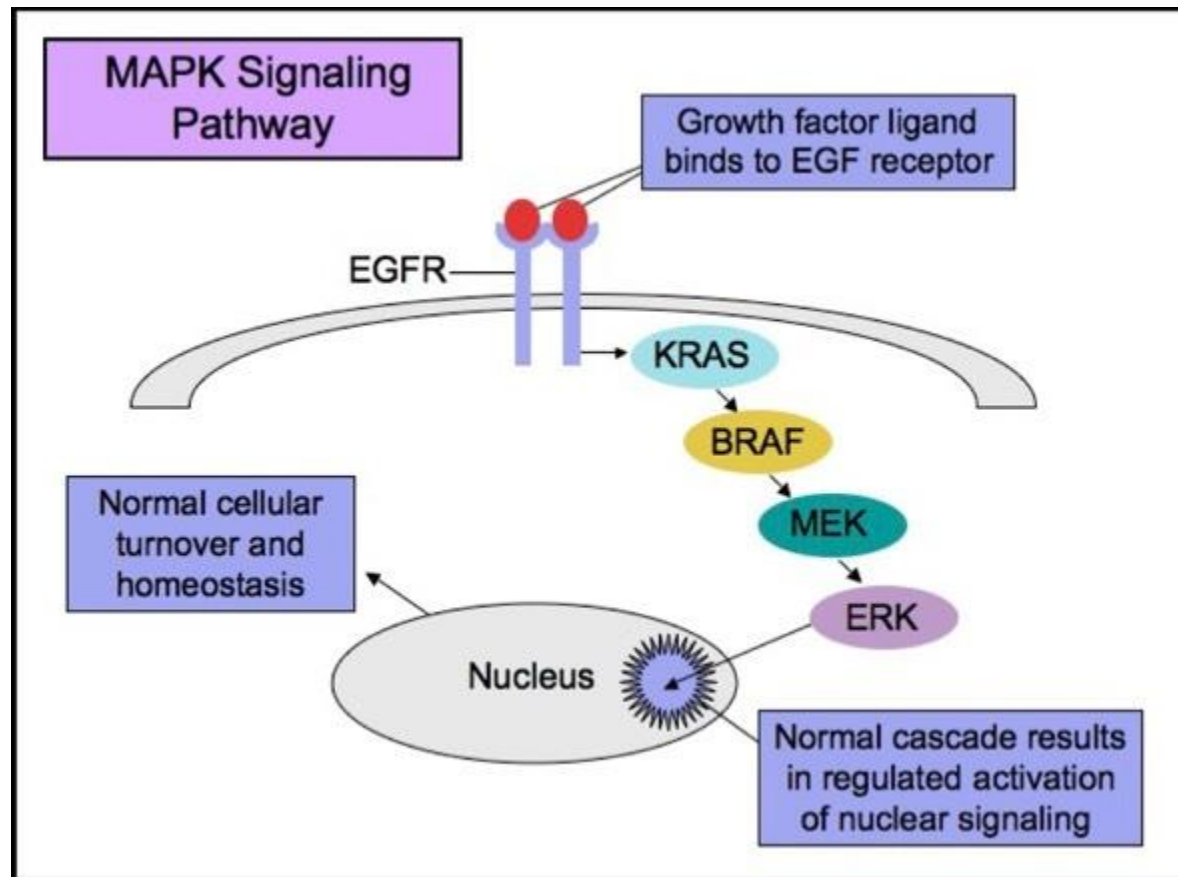


Inestabilidad Cromosómica

- CCR esporádico
- Poliposis adenomatosa familiar
- CCR en enfermedad inflamatoria intestinal crónica (mutaciones precoces en *TP53* y tardías en *APC*)
- Síndrome asociado a *POLE/POLD1*

Vías moleculares en cáncer colorectal

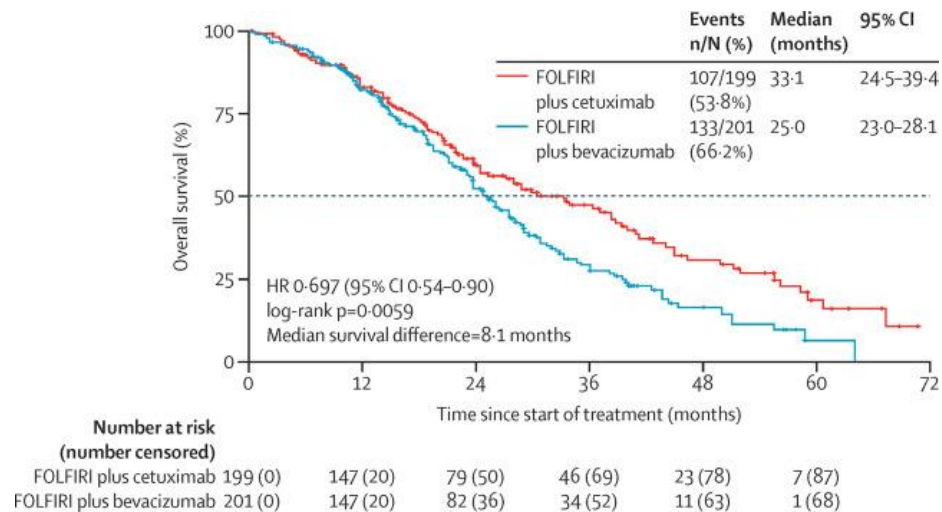
- Detección de mutaciones en los genes **K/NRAS** (en pacientes metastáticos)
- Detección de mutaciones en *B-RAF*



ORIGINAL ARTICLE

Panitumumab–FOLFOX4 Treatment
and RAS Mutations in Colorectal Cancer

Jean-Yves Douillard, M.D., Ph.D., Kelly S. Oliner, Ph.D., Salvatore Siena, M.D., Josep Tabernero, M.D., Ronald Burkes, M.D., Mario Barugel, M.D., Yves Humblet, M.D., Ph.D., Gyorgy Bodoky, M.D., Ph.D., David Cunningham, M.D., Jacek Jassem, M.D., Ph.D., Fernando Rivera, M.D., Ph.D., Ilona Kocákova, M.D., Ph.D., Paul Ruff, M.D., Maria Błasińska-Morawiec, M.D., Martin Šmakal, M.D., Jean Luc Canon, M.D., Mark Rother, M.D., Richard Williams, M.B., B.S., Ph.D., Alan Rong, Ph.D., Jeffrey Wizeorek, M.D., Roger Sidhu, M.D., and Scott D. Patterson, Ph.D.



All-RAS Testing in Metastatic Colorectal Cancer

- There is mounting support for testing metastatic colorectal patients for mutations in the *RAS* gene (*KRAS* and *NRAS*) beyond *KRAS* exon 2; approximately 15% of patients have relevant mutations beyond *KRAS* exon 2.
- In a retrospective analysis of the 20050181 trial of panitumumab plus FOLFIRI, all-*RAS* wild-type patients receiving the EGFR inhibitor had a 20% reduction in deaths; median overall survival was 16.2 months in the panitumumab arm and 13.9 months with FOLFIRI alone among patients with wild-type *RAS*.
- In a new analysis of FIRE-3, which compared cetuximab and bevacizumab plus FOLFOX4, among all-*RAS* wild-type patients, cetuximab provided an overall survival benefit over bevacizumab.
- Additional analyses of OPUS and CECOG/CORE2 confirmed the benefit of cetuximab among all-*RAS* wild-type patients.

KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer



Mutaciones en CCR metastático (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*)

Detección de mutaciones en ***K/NRAS*** y ***BRAF*** en pacientes con CCR metastático

- Indicado antes de tratamiento con cetuximab o panitumumab – anti EGFR (predictor de respuesta)
- Genes *KRAS* y *NRAS* exón 2 (codones 12 y 13), exón 3 (codón 59, 61) y exón 4 (codones 117 y 146)
- Gen *BRAF*, exon 15 (codón 600). Otros exones, 11, 12 (codon 599)

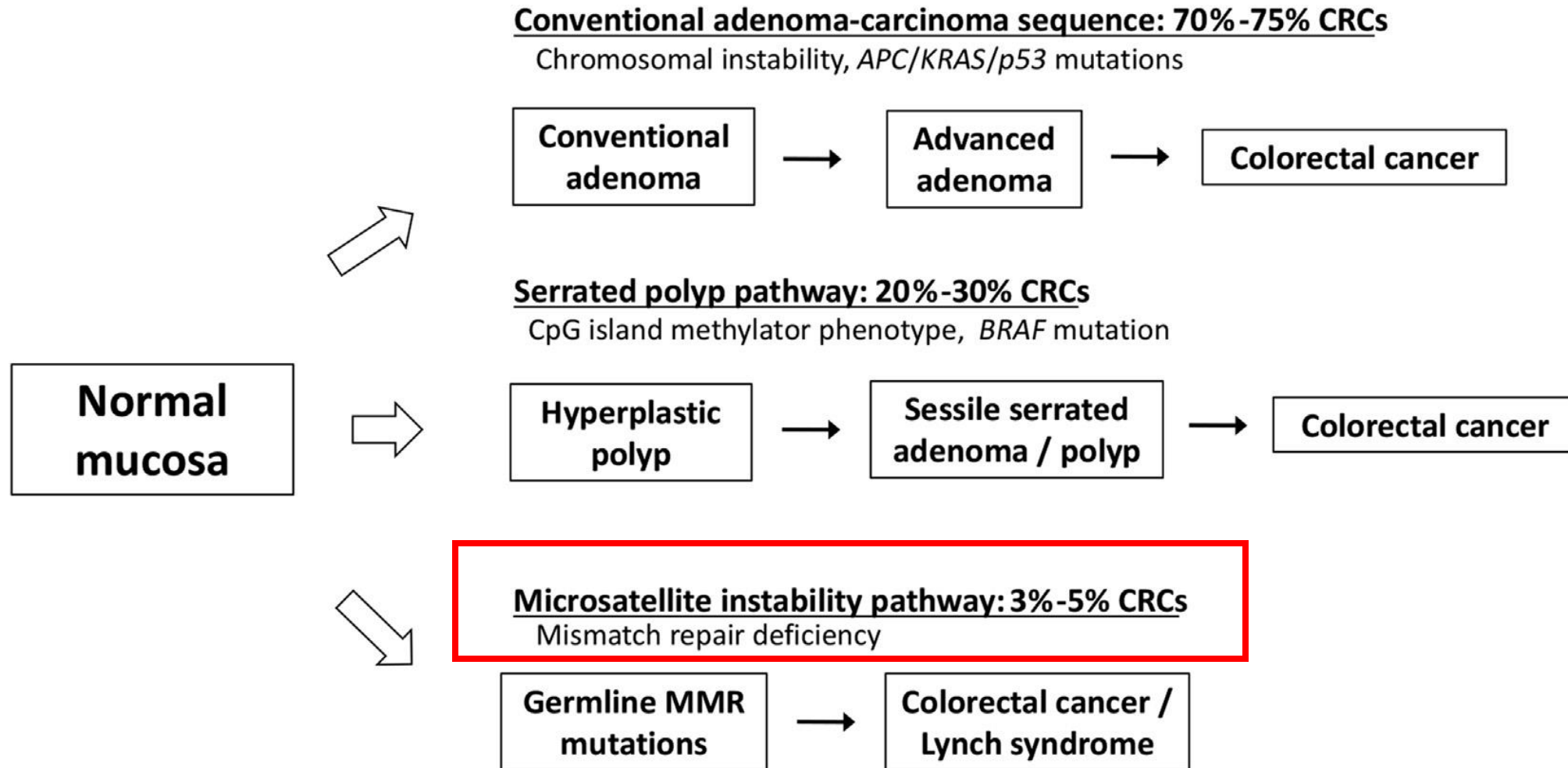
Poliposis Adenomatosa Familiar

- Síndrome polipósico más frecuente. Autosómico dominante; 25% de novo
- 0,25% de los CCR
- Mutación germinal en **APC** (adenomatous polyposis coli) 5q21, degrada b-catenina via señalización Wnt y estabiliza microtúbulos
- FAP: mutaciones en 3'. Cientos o miles de pólipos
- AFAP: atenuada mutaciones en 5'. Pocos pólipos
- Riesgo 100% CCR a lo largo de la vida (media: 34 años)
- Manifestaciones extracolónicas: Pólipos de glándulas fúndicas gástricos – con displasia, adenomas gástricos, duodenales, hipertrofia congénita del epitelio pigmentado retiniano, carcinoma tiroides papilar cribiforme-morular
- Síndromes Asociados:
 - **Sd. Gardner:** FAP + osteomas, quistes epidermoides, fibromatosis desmoide
 - **Sd. Turcot:** FAP + meduloblastoma (también es variante de síndrome de Lynch)

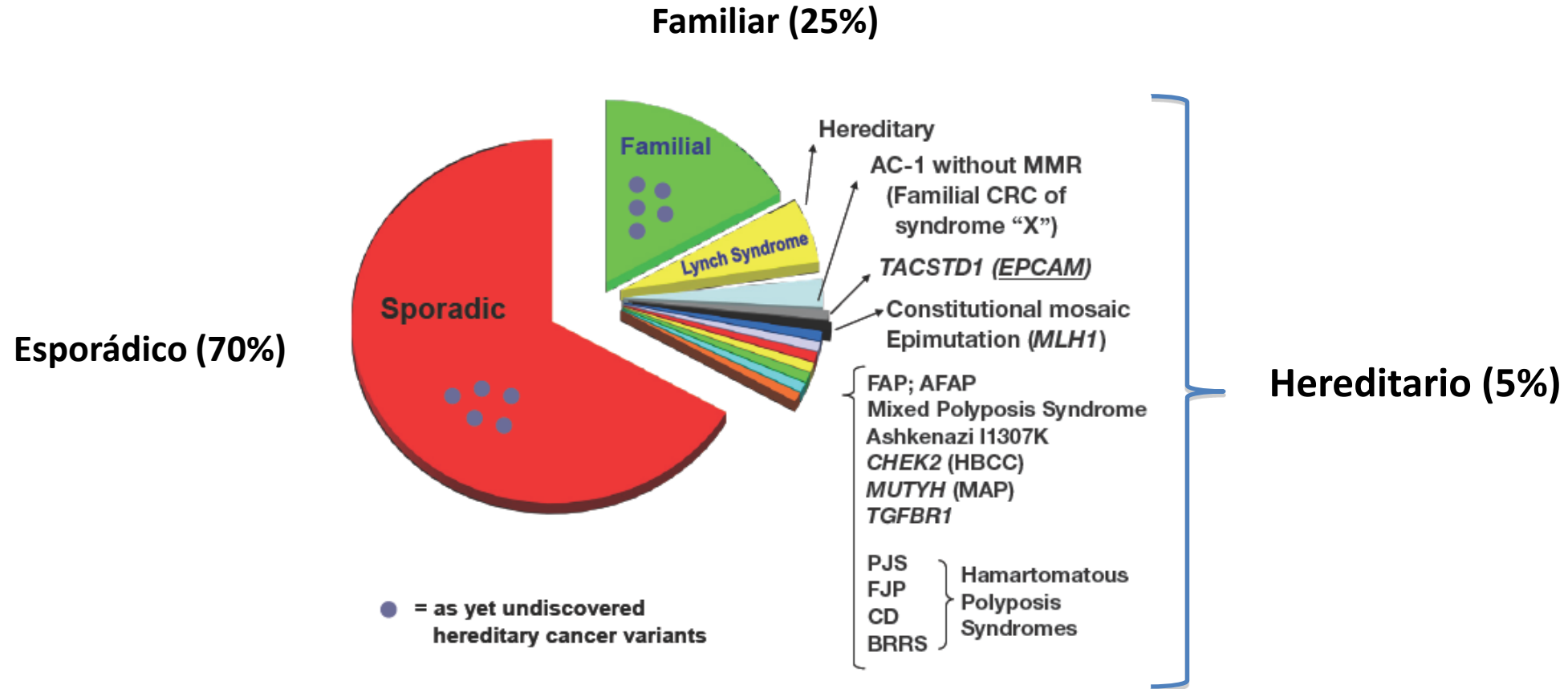
Síndrome asociado a *POLE/POLD1*

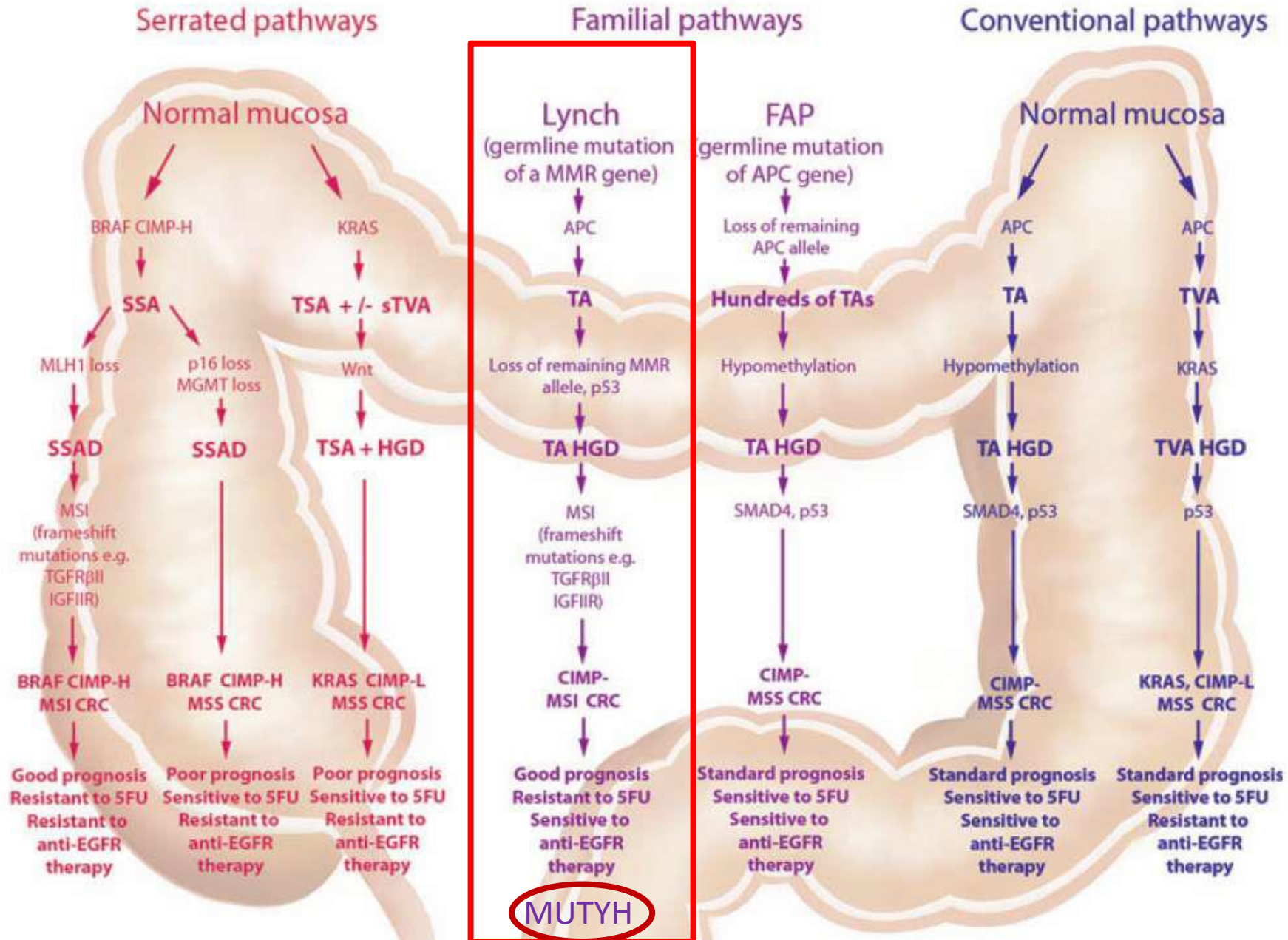
- Frecuentemente mutaciones de novo
- Codifican proteínas de subunidades de los complejos de DNA polimerasa
- Tumores hipermutados, MSS
- Gen *POLE* p.L424V mutado en línea germinal: tumores cerebrales, mama y endometrio
- Poliposis atenuada o pocos pólipos

Alteraciones moleculares en CCR



Riesgo de cáncer colorrectal

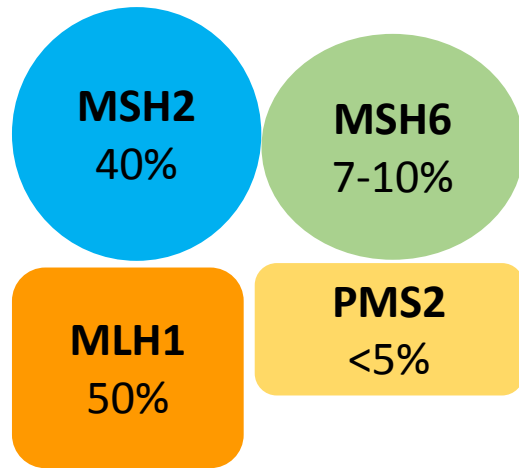




Síndrome de Lynch

Etiopatogenia

50-80% variaciones secuencia
17-50% deleciones/reordenamientos



90-95% variaciones secuencia
5-10% deleciones/reordenamientos

La causa son mutaciones en
línea germinal en los genes del
sistema de reparación del DNA
(**MMR system**)

IMS = Inestabilidad de MicroSatélites

Microsatélites

Secuencias repetitivas de nucleótidos en el DNA:

Mononucleótidos **AAAAAAAAA**

Dinucleótidos **CACACACA**

Trinucleótidos **AGCAGCAGC**

etc...

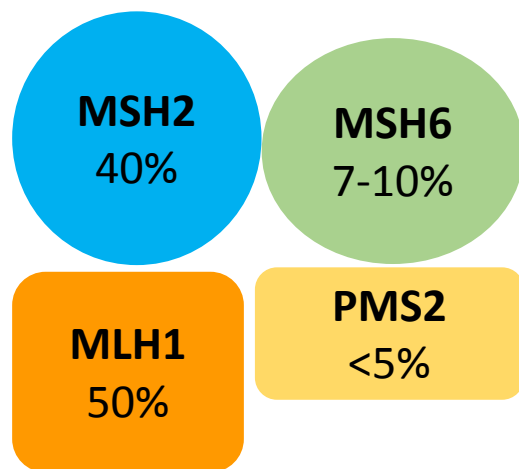
Polimórficas (longitud variable):

Entre individuos

Entre alelos de un mismo individuo

Síndrome de Lynch

50-80% variaciones secuencia
17-50% deleciones/reordenamientos



90-95% variaciones secuencia
5-10% deleciones/reordenamientos

La causa son mutaciones
en los genes del sistema
de reparación del DNA
(**MMR system**)

IMS = Inestabilidad de MicroSatélites

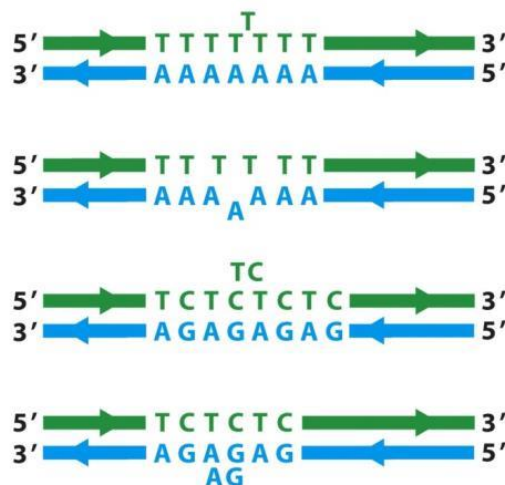


Figure 12-8a The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

PCR

Amplificando secuencias de microsatélites

IHQ

Ac anti proteínas de los genes reparadores

- El sistema de reparación de DNA falla. Alteración en la secuencia del DNA, no se corrigen los nucleótidos introducidos de más o de menos durante la replicación del DNA
- Concentración de mutaciones en secuencias MI → MSI
- Alteración de genes con MI; regulación ciclo celular, crecimiento, apoptosis, *TCF4*, *IGF2R*, *BAX*, *MSH6/3*, *TGF-βRII* → promueve el crecimiento neoplásico, carcinogénesis, supervivencia celular

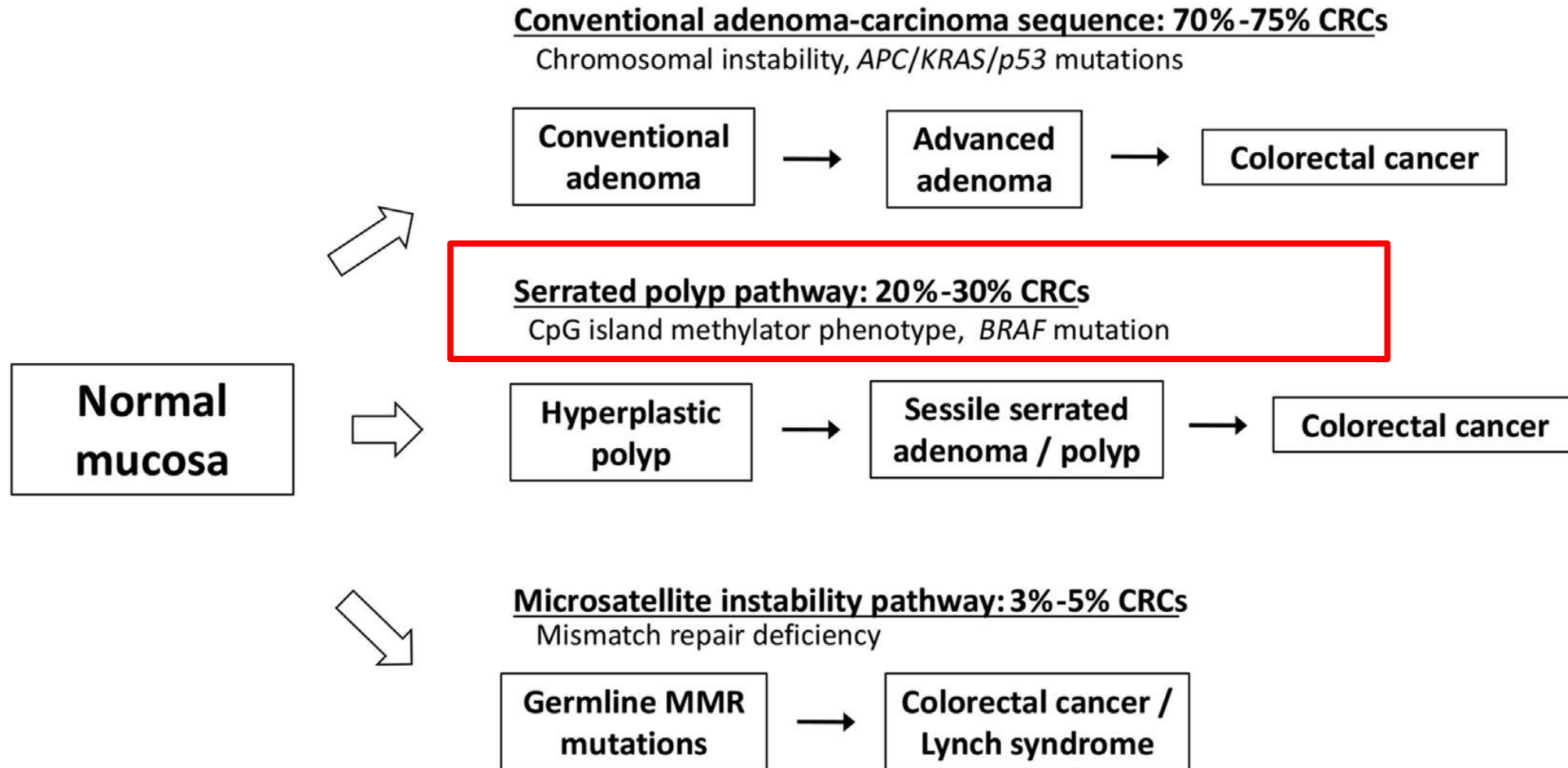
Poliposis asociada a *MUTYH* (MAP)

- Gen *MUTYH*; 1p34 codifica proteína escindidora de bases
- Repara el daño oxidativo del DNA
- Adenomas, riesgo aumentado de CCR
- <1% CCR
- Se necesita mutación bialélica para manifestarse
- Ausencia de mutación en APC
- Se asocia a adenomas gástricos y duodenales

Poliposis asociada a reparación de escisión de bases

- Mutación germinal en *NTHL1*; poliposis adenomas y CCR
- Rara

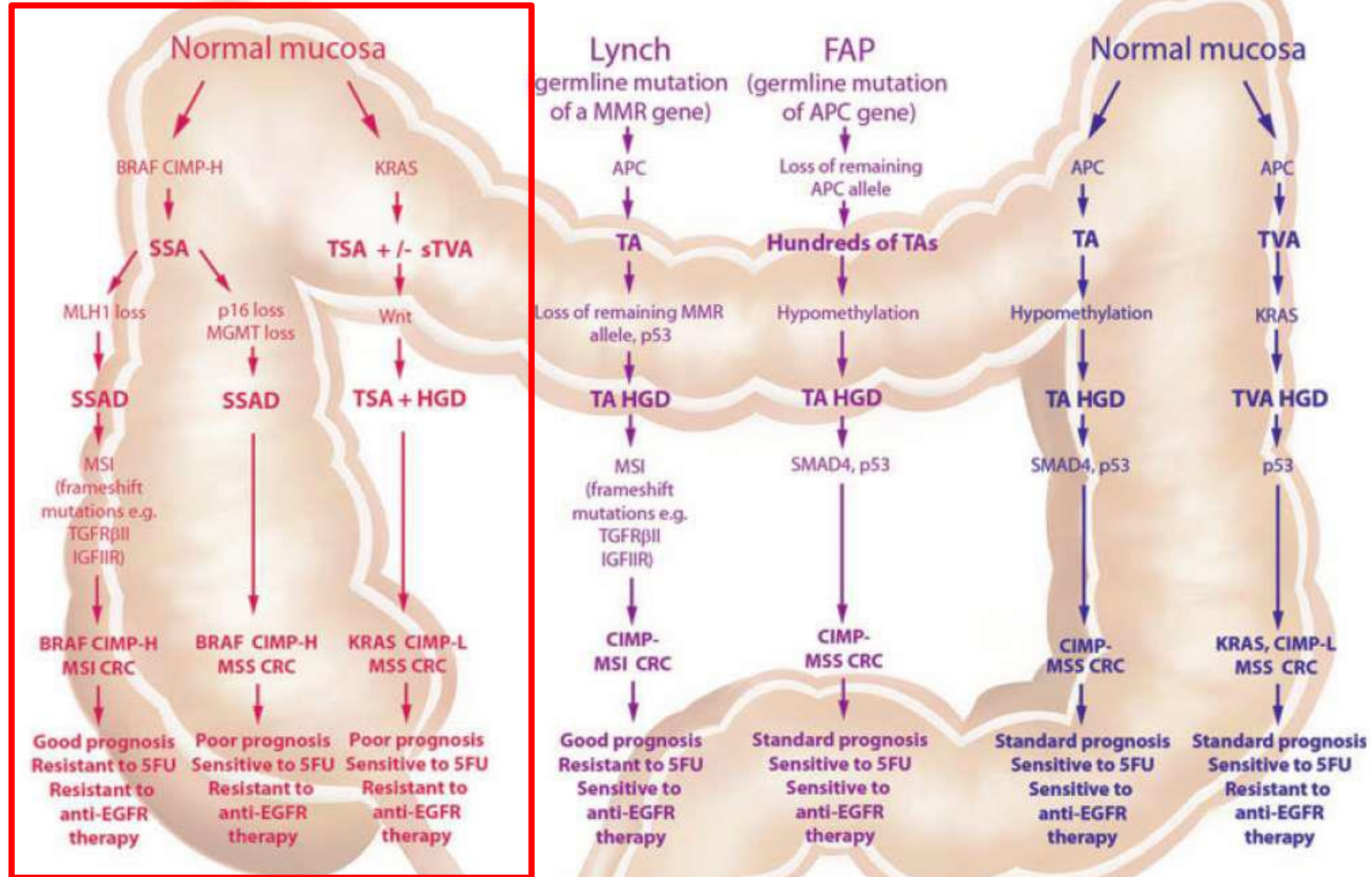
Alteraciones moleculares en CCR



Serrated pathways

Familial pathways

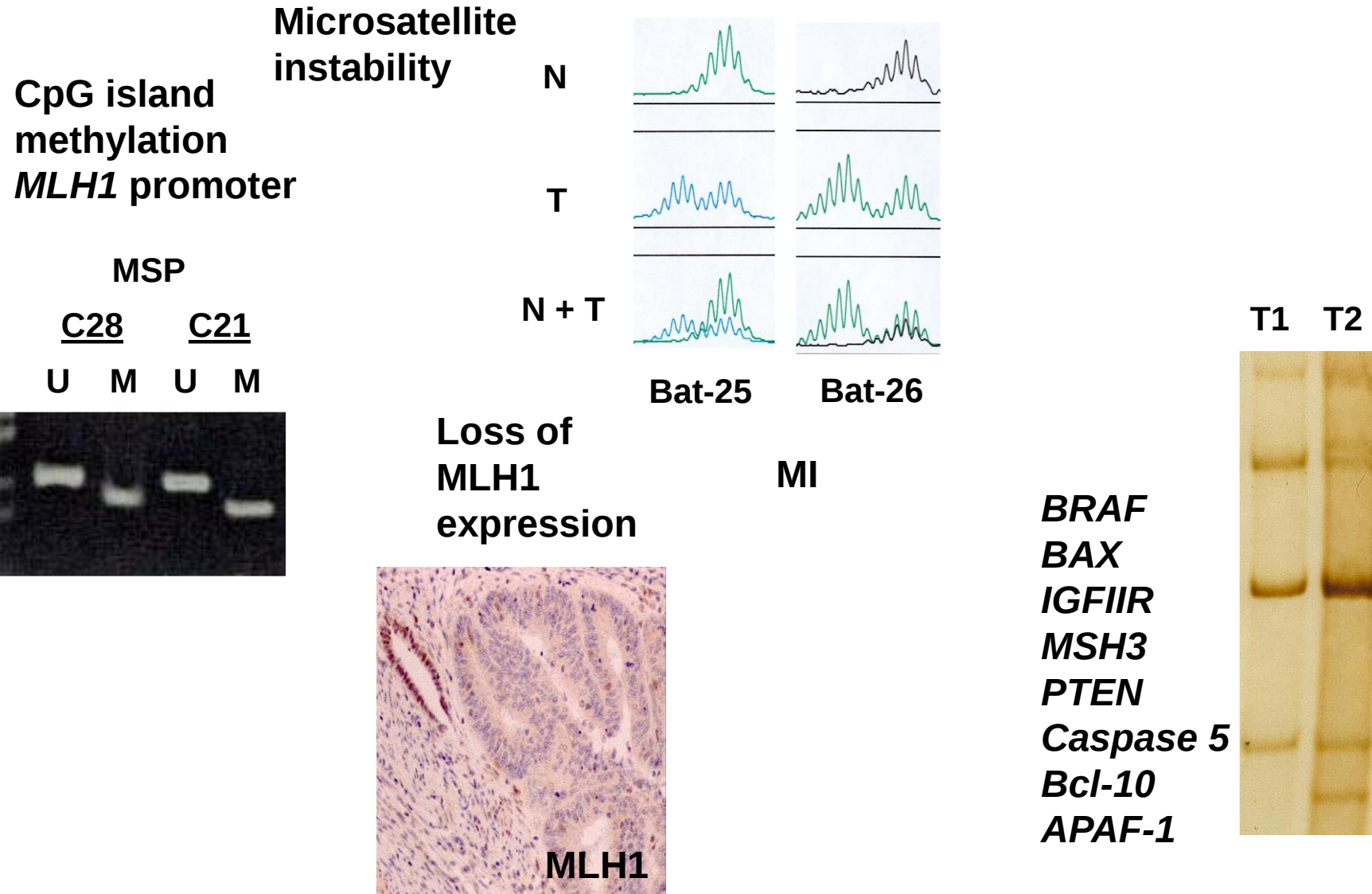
Conventional pathways



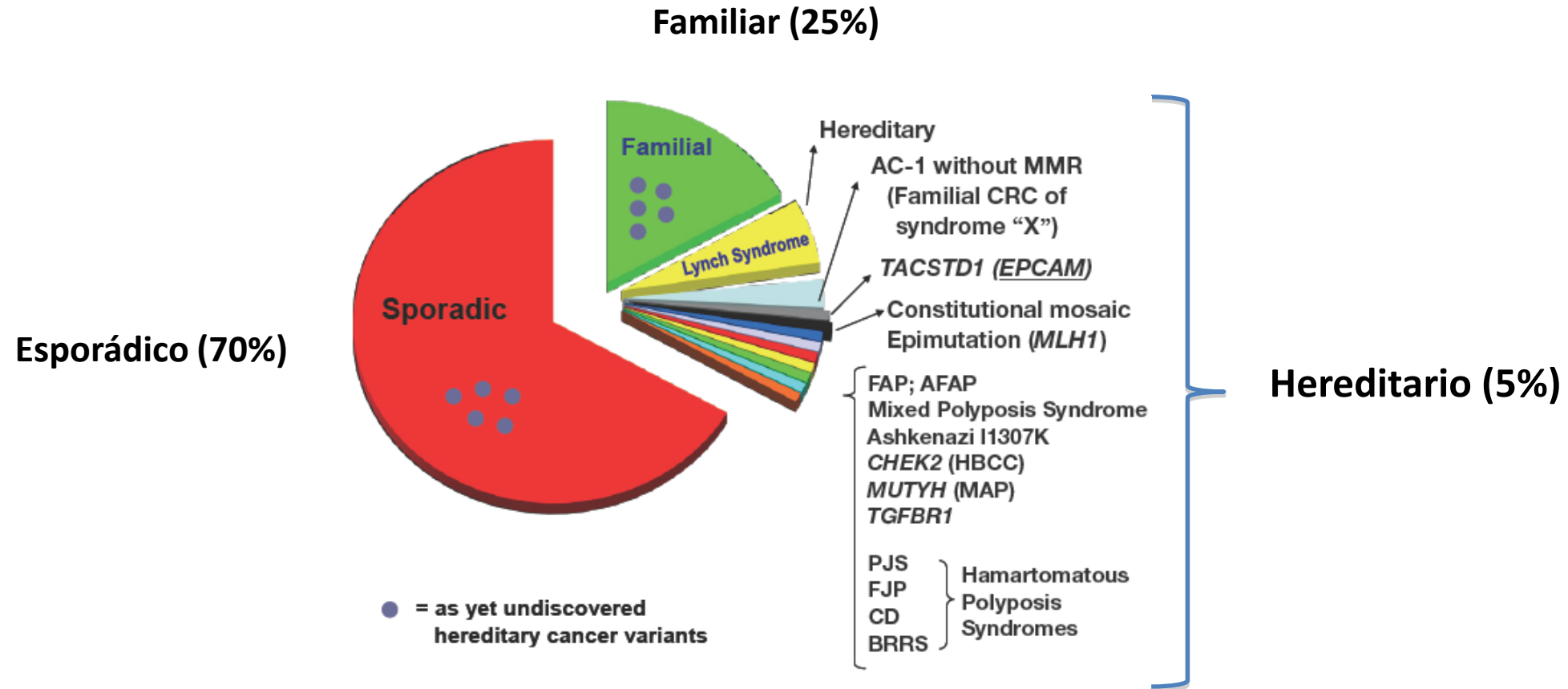
Síndrome de Poliposis Serrada

- Lesiones serradas sesiles en colon (no intestino delgado/extracolónico)
- Afecta igual mujeres y hombres
- Nueva definición WHO-2019 de poliposis serrada (2 criterios)
 1. ≥ 5 lesiones serradas proximales a recto, ≥ 5 mm, con ≥ 2 de ≥ 10 mm
 2. > 20 lesiones serradas de cualquier tamaño en todo el colon, con > 5 proximales a recto
- Todo tipo de pólipo cuenta, se suman todos de forma acumulativa
 - Pólipo hiperplásico, lesión serrada sesil con o sin displasia, Adenoma serrado tradicional, adenoma serrado no clasificable
- Se asocia a tabaco y sobrepeso IMC alto; cierta agregación familiar
- Mutación germinal en 2% en *RNF43*
- Poliposis serrada se asocia a síndrome de poliposis-*MUTYH*, a poliposis por *GREM1*
- Mutación *BRAF* 73%; *KRAS* 8%; 40% *MLH1*-def.

CIMP - MSI



Cáncer colorectal hereditario



Riesgo de CCR en función de Antecedentes Familiares de CCR

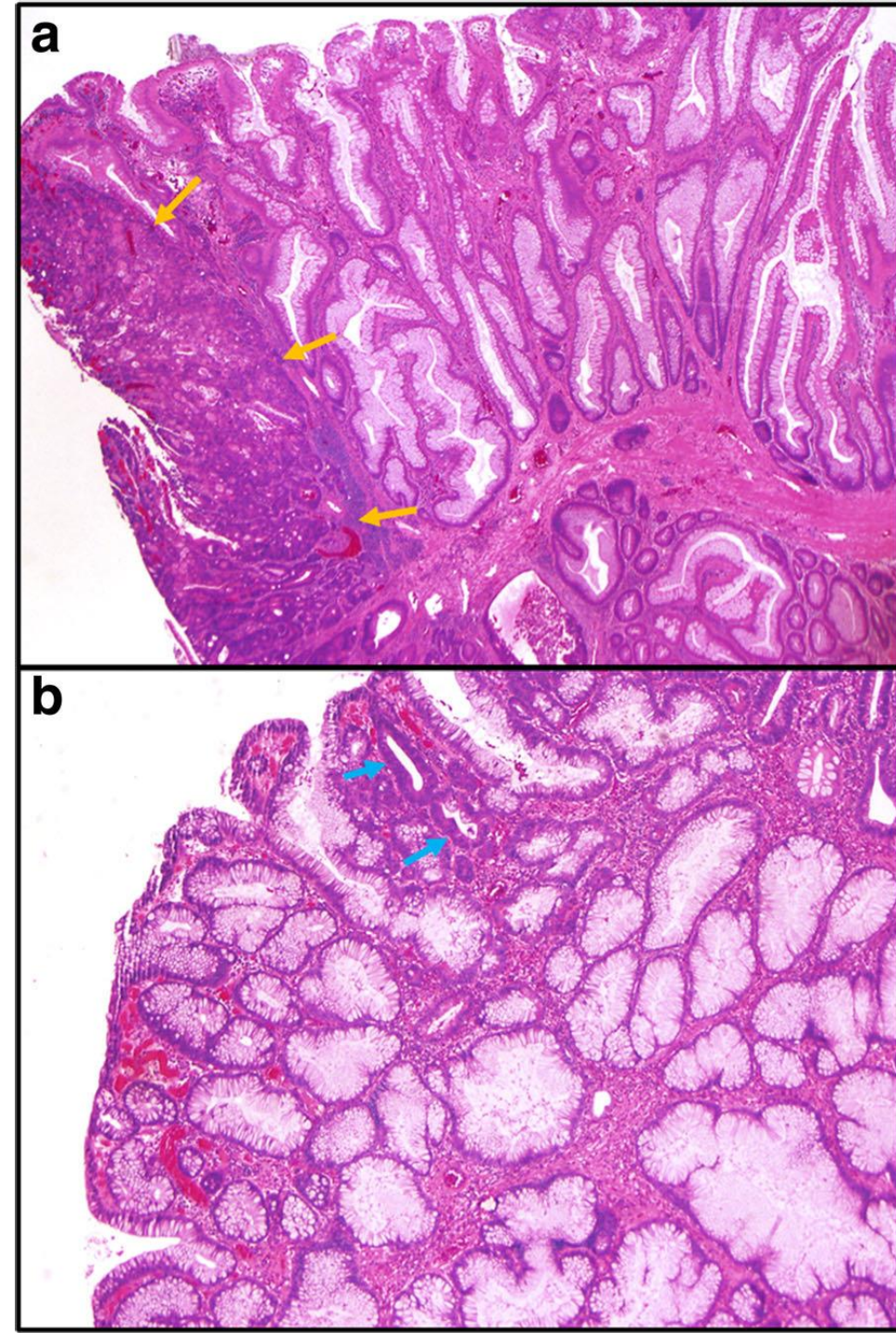
- Cerca de un 15% de la población general tiene AF de CCR (motivo de consulta más frecuente en consultas de alto riesgo)
- Probable origen poligénico + genes alta penetrancia no identificados
- Los antecedentes familiares de CCR aumentan el riesgo de CCR
- **Factores asociados:**
 - Número
 - Parentesco
 - Edad al diagnóstico

Síndromes de Poliposis Hamartomatosas

- Síndrome de Peutz-Jeghers: mutación germinal o delección de *STK11*
 - Autosómico dominante
 - Pólipos hamartomatosos en estómago, intestino Delgado y colon + pigmentación mucocutània
 - 50% carcinoma GI
- Síndrome de Polipoisis Juenil: Mutación germinal en *SMAD4* y *BMPR1A*
 - Pólipos juveniles GI, glándulas dilatadas
 - Algunos *BMPR1A* desarrollan síndrome de poliposis hereditària mixta, también con mutación en *SCGS*
- Mutaciones germinales en *PTEN*:
 - **Síndrome de Cowden**, hamartomas GI-pólipos juveniles y ganglioneuromas, lesiones cutàneas y viscerales, carcinoma de mama
 - **Síndrome de Bannayan–Riley–Ruvalcaba** (poliposis GI), Síndrome de Proteus y tipo Proteus, no malignizan
 - **Síndrome de Cronkhite-Canada**, poliposis hamartomatosa adquirida, pólipos juveniles GI, edema mucosa, dilatación glandular y congestión, autoinmune? Desarrollan CCR

Pólipos hamartomatosos

- Peutz-Jegher con carcinoma intramucoso
- Pólipo juvenil con displàsia de bajo grado



Biomarcadores en CCR. Tests Moleculares y MSI

- CCR en estadio II con MSI, no se beneficia de tratamiento con 5-FU
- CCR con MSI se benefician de inmunoterapia
- CCR con mutaciones en *KNRAS* / *BRAF* no se benefician de tratamiento anti-EGFR
- CCR con mutación en *BRAF* y MSS – muy mal pronóstico

Análisis de múltiples mutaciones en genes por NGS

- *KNRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *PIK3CA*, etc.
- Ensayos clínicos, multi-target testing technologies
- En carcinomas sincrónicos con metástasis – análisis del tumor metastático

Biopsia líquida:

- Útil en monitorización de pacientes metastáticos
- Clon prevalente en heterogeneidad tumoral

Nuevos paneles de genes en el cáncer colorrectal

Ambry Genetics	ColoNext	<i>APC, BMPR1A, CDH1, CHEK2, EPCAM, GREM1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, SMAD4, STK11, and TP53.</i>
Emory Genetics Laboratory	High Risk Colorectal Cancer Panel	<i>APC, ATM, BLM, BMPR1A, CDH1, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, PTEN, SMAD4, STK11, TP53</i>
Fulgent Diagnostics	Colon Cancer NGS Panel	<i>APC, AXIN2, BMPR1A, BUB1B, CDH1, CDKN2A, CHEK2, EPCAM, EXO1, FLCN, GALNT12, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS1, PMS2, PTEN, SMAD4, STK11, TP53</i>
GeneDx	Colorectal Cancer Panel	<i>APC, ATM, AXIN2, BMPR1A, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, SCG5/GREM1, SMAD4, STK11, TP53</i>
Illumina	TruSight Cancer	<i>94 genes and 284 SNPs associated with a predisposition towards cancer</i>
Invitae	Colorectal cancer panel	<i>APC, AXIN2, BMPR1A, CDH1, CHEK2, EPCAM, GREM1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, SMAD4, STK11, TP53, BUB1B, ENG, FLCN, GALNT12, MLH3</i>
Myriad Genetics	MyRisk	<i>APC, ATM, BARD1, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A (P16INK4a y p14ARF), CHECK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, TP53, RAD51C, RAD51D, SMAD4 y STK11</i>

Patología molecular en cáncer colorectal

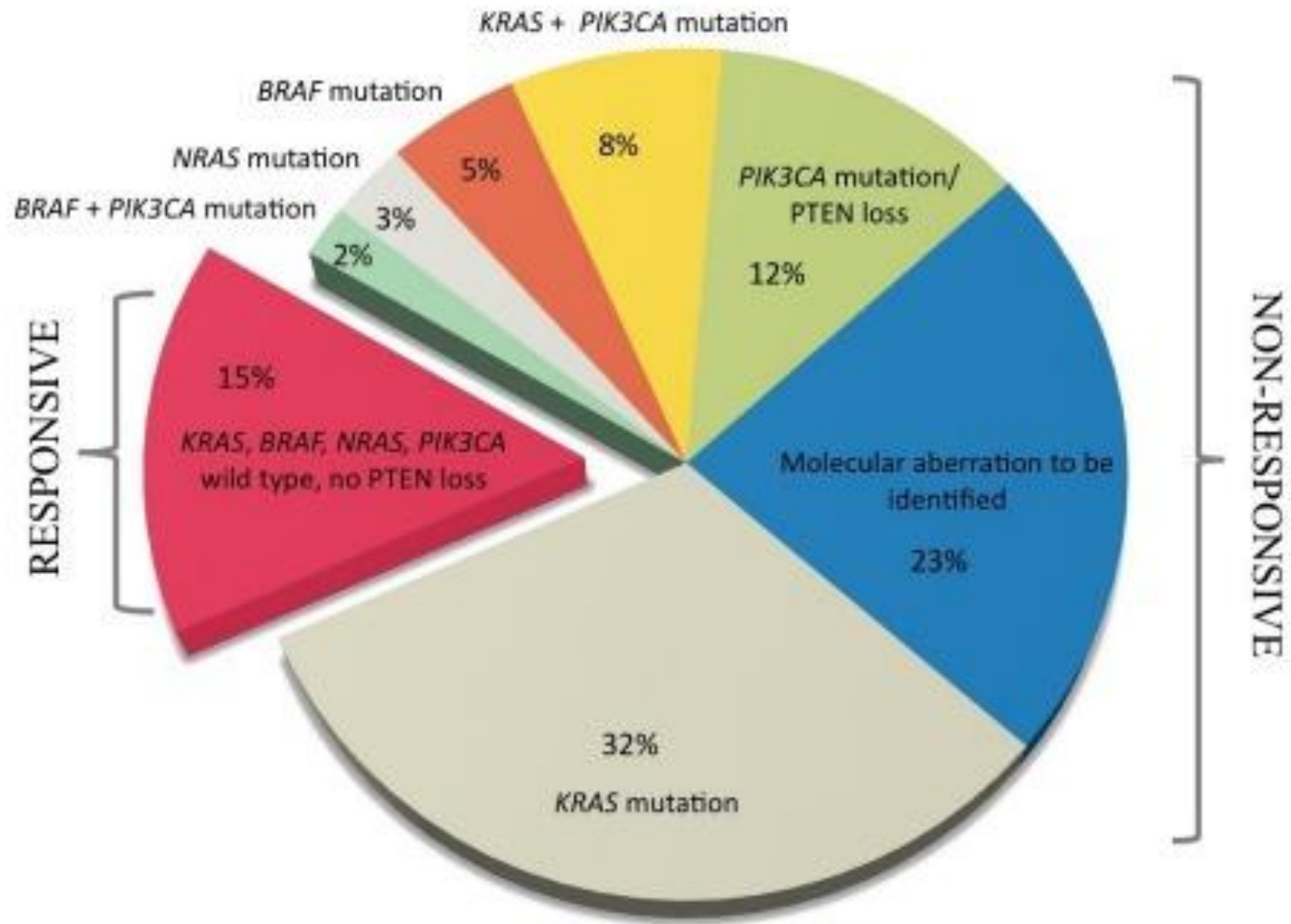
Implicación del patólogo en la práctica diaria:

Cribado de cáncer hereditario

Manejo terapéutico – dianas/inmunoterapia

- Inestabilidad de microsatélites MSS/MSI (IHQ o PCR)
- **K/NRAS** (*en pacientes metastáticos*)
- **BRAF**

Test molecular para **identificar** pacientes con **síndromes hereditarios de CCR** o individuos **genéticamente susceptibles** de desarrollar un CCR, ayuda a identificar biomarcadores moleculares para el manejo terapéutico del paciente



¡Muchas Gracias!

