



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Departamento de Medicina

Programa de doctorado: Medicina

**ANALISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE MEDIADORES
MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ANGIOGENESIS LDH5 Y
VEGFR2/pKDR EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL
AVANZADO: DETERMINACIÓN DE SU VALOR COMO
BIOMARCADORES**

TESIS DOCTORAL presentada por:

Javier Garde Noguera

Dirigida por:

Prof. Dr. Carlos Camps Herrero

Dr. Antonio Llombart Cussac

Valencia, 2016



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA
Departament de Medicina

CARLOS CAMPS HERRERO
Profesor Titular
Departamento de Medicina
Universidad de Valencia

INFORMA:

Que Don Javier Garde Noguera, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **"ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE MEDIADORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ANGIOGENESIS LDH5 Y VEGFR2/pKDR EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL AVANZADO: DETERMINACIÓN DE SU VALOR COMO BIOMARCADORES"**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.



Fdo.: Carlos Camps
Profesor Titular de Medicina
Facultad de Medicina
Universitat de València

En Valencia, a 11 de Febrero de 2017

Prof. Carlos Camps Herrero
DNI: 22517012N



Universidad
Católica
de Valencia
San Vicente Mártir

Antonio Llombart Cussac
Profesor Titular
Departamento de Medicina
Universidad de Católica de Valencia

INFORMA:

Que Don Javier Garde Noguera, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **"ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE MEDIADORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ANGIOGENESIS LDH5 Y VEGFR2/pKDR EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL AVANZADO: DETERMINACIÓN DE SU VALOR COMO BIOMARCADORES"**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

En Valencia, a 11 de Febrero de 2017

Dr. Antonio Llombart Cussac
DNI: 1985939F

A mi mujer y mis hijos

**A mi padre, mi madre
y mi hermana**

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mis agradecimientos a todas las personas que han contribuido a que esta tesis doctoral haya sido posible.

En primer lugar, a mis directores:

Al Dr. Carlos Camps Herrero. Mi jefe durante el periodo de residencia en el Hospital General Universitario de Valencia donde tuve la fortuna de recibir mi formación como oncólogo médico, y que desde entonces es un referente para mí. Le agradezco no sólo la ayuda para realizar esta tesis, sino también todo su apoyo y estímulo para mi formación como médico y como persona.

Al Dr. Antonio Llombart Cussac. Por ser un ejemplo de trabajo, esfuerzo y dedicación a la oncología, que me ha brindado la posibilidad de crecer a su lado como profesional y de formar parte de su gran equipo de trabajo en el Hospital Arnau de Vilanova de Valencia.

A los pacientes, sus familias y cuidadores. Por su generosidad al compartir la información relativa a su enfermedad y sus tratamientos, necesaria para la realización de proyectos de investigación.

A la Dra. Mireia Gil, la Dra. Elena Evgenyeva, la Dra. Laia Bernet, la Dra. Eloisa Jantus y el Dr. Jose Ángel García. Todos ellos grandes profesionales y excelentes personas, a las que he tenido la suerte de encontrar durante la realización de este trabajo. Ellos me ofrecieron su esfuerzo, su tiempo y sus conocimientos de forma generosa y desinteresada. Sin su ayuda hubiese sido imposible llevar a cabo este proyecto.

Al Servicio de Oncología Médica del Hospital Arnau de Vilanova, tanto médicos adjuntos como residentes, coordinadores de estudios, enfermeras y auxiliares. Por toda su ayuda en el día a día, y por su gran compañerismo que ha convertido nuestro Servicio en un gran equipo de trabajo, al que me siento muy orgulloso de pertenecer.

A todos mis antiguos compañeros de los Servicios de Oncología Médica del Hospital General Universitario de Valencia, del Hospital de San Juan de Alicante y del Hospital de Denia.

A mi tío Jose Luís, que siempre me ha motivado y estimulado para interesarme y adentrarme en el mundo de la investigación, y que ha contribuido con sus correcciones y comentarios a mejorar este trabajo.

A mis padres, Jesús y Emilia, por haberme dado todo su amor y dedicación, por haberme ofrecido el mejor ejemplo imaginable y transmitido los valores en que se fundamenta mi vida, y que espero ser capaz de transmitir a mis propios hijos.

A mi mujer, Ana, con quien comparto mi vida.

Tabla de contenido

I. INTRODUCCION GENERAL.....	17
1. Concepto de Cáncer.....	17
2. Cáncer Colorrectal.....	17
2.1 Epidemiología.....	17
2.2 Factores de Riesgo.....	19
Factores de Riesgo Genéticos.....	19
Factores de Riesgo Ambientales.....	20
2.3 Clasificación anatomopatológica.....	22
2.4 Patrones de diseminación y estadificación.....	26
2.5 Tratamiento.....	28
Estadios precoces.....	28
Estadio avanzado.....	30
3. Biología Molecular del Cáncer Colorrectal.....	31
3.1 Características moleculares del cáncer.....	31
3.2 Alteraciones moleculares del Cáncer Colorrectal.....	34
Oncogenes.....	35
Genes supresores de tumores.....	36
3.3 Caracterización Molecular del Cáncer Colorrectal.....	37
4. Neovascularización Tumoral.....	42
4.1 Vasculogénesis.....	43
4.2 Angiogénesis.....	43
4.3 Linfangiogénesis.....	45
5. Factores estimuladores e inhibidores de la angiogénesis y linfangiogénesis.....	47
5.1 Factores estimuladores e inhibidores de la angiogénesis y linfangiogénesis.....	47
5.2 Adaptación metabólica celular a condiciones anaerobias. Papel de Lactato Deshidrogenasa 5 (LDH5).....	48
5.3 Familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	48
Ligandos VEGF.....	49
Receptores de VEGF.....	52

6. Biomarcadores	53
6.1 Biomarcadores de angiogénesis y linfangiogénesis	54
Biomarcadores en tejido	54
Biomarcadores circulantes.....	56
II. OBJETIVOS.....	58
Objetivos primarios	58
Objetivos secundarios.....	58
III. METODOLOGIA.....	59
1. Población de estudio	59
Característica de los Pacientes	59
Variables Clínicas	59
Variables clínicas demográficas basales.....	59
Variables relacionadas con el tumor.....	60
Variables relacionadas con el tratamiento.	60
Variables relacionadas con el seguimiento (recidiva y mortalidad).....	61
Variables moleculares.....	61
2. Análisis Inmunohistoquímico.....	62
Construcción de micro-array tisular (TMA)	62
Análisis Inmunohistoquímico de pKDR	62
Análisis inmunohistoquímico de LDH5	63
3. Análisis de Mutaciones de RAS	64
4. Análisis estadístico	65
Variables del estudio	65
Cálculo de la muestra	66
Fases del estudio	66
Métodos Estadísticos.....	66
IV. RESULTADOS.....	69
1. Análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de la población.....	69
2. Expresión inmunohistoquímica de VEGFR2/pKDR como biomarcador pronóstico en CCR	71
2.1 Característica de los pacientes	71

2.2 Tratamiento y Tasa de Respuesta	72
2.3 Supervivencia global y Supervivencia Libre de Progresión	73
3. Expresión inmunohistoquímica de LDH5 como biomarcador pronóstico en CCR	74
3.1 Característica de los pacientes	74
3.2 Tratamiento y Tasa de Respuesta.....	75
3.3 Supervivencia global y Supervivencia Libre de Progresión	75
4. Análisis del estatus mutacional de RAS como factor pronóstico en pacientes con CCR avanzado tratados con Quimioterapia con o sin Bevacizumab.	76
4.1 Características de los pacientes.....	76
4.2 Eficacia del Tratamiento	77
5. Tratamiento con Bevacizumab y Resección del Tumor Primario: Análisis de su papel como factores pronósticos de supervivencia y Análisis de Toxicidad y Seguridad.....	79
5.1 Tratamiento con Bevacizumab	79
5.1.1 Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Progresión	81
5.1.2 Toxicidad y efectos adversos por quimioterapia	82
5.1.3 Análisis de eficacia de tratamiento con Bevacizumab en función de la expresión de VEGFR2/pKDR.....	83
5.1.4 Análisis de eficacia de tratamiento con Bevacizumab en función de la expresión de LDH5	84
5.1.5 Análisis de eficacia de tratamiento con Bevacizumab en función del estado mutacional de RAS	85
5.2 Resección del Tumor Primario.....	85
5.2.1 Supervivencia Global y Supervivencia libre de Progresión	87
5.2.2 Respuesta al tratamiento.....	87
5.2.3 Complicaciones derivadas del tumor y postoperatorias	88
6. Análisis de las variables clínico-patológicas y moleculares pronósticos de supervivencia	90
6.1 Supervivencia Global	90
6.2 Supervivencia Libre de Progresión.....	95
V. DISCUSIÓN.....	97
1. VEGFR2/pKDR como biomarcador pronóstico y predictivo en CCR avanzado	97
2. LDH5 como biomarcador pronóstico y predictivo en CCR avanzado	99
3. Análisis del estado mutacional de RAS como biomarcador pronóstico y predictivo en CCR avanzado	102
4. Análisis del impacto pronóstico de la resección del tumor primario en pacientes con CCR avanzado	105
5. Análisis de las características clínico-patológicas y moleculares con implicación pronóstica en CCR avanzado ...	109

VI. CONCLUSIONES FINALES 113

ANEXOS 115

BIBLIOGRAFIA 157

I. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AJCC/UICC: American Joint Comitee on Cancer/Unión Internacional contra el Cáncer.

ALL: Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase. Receptor tirosina quinasa de linfoma anaplásico.

ANG: Angiopoyetina .

AP-1: Activator protein 1. Proteína de activación 1.

APAF: Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada.

APC: Gen de la poliposis adenomatosa coli.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATP: Adenosin trifosfato.

aTNM: Estadificación TNM tras la autopsia.

BRAF: v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1

CDH17: Cadherina 17.

CDX2: Caudal-type homebox 2.

CEA: Carcinoembrionic antigen. Antígeno carcinomembriónico.

CCHNP: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico.

CCR: Carcinoma Colorectal

CK7: Citoqueratina 7.

CK20: Citoqueratina 20

CP: Carcinomatosis Peritoneal.

CTC: Células Tumorales Circulantes.

cMET: MET proto-oncogene.

cTNM: Estadificación clínica TNM.

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

EE: Enfermedad Estable.

EGF: Epidermal growth factor. Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Epidermal growth factor receptor. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

FGF: Fibroblast growth factor. Factor de Crecimiento de Fibroblastos

FOLFOX: Esquema de quimioterapia que combina Oxaliplatino y 5-Fluorouracilo.

GTP: Guanosina Trifosfato.

HE: Hematosilina-Eosina.

HER2: Receptor 2 factor de crecimiento epidérmico humano.

HGB: Hemoglobina.

HIF: Hypoxia inducible factor. Factor de transcripción inducible por hipoxia.

HRAS: Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogen Homolog.

HRE: Elemento de respuesta a hipoxia.

HTA: Hipertensión Arterial.

IHQ: Inmunohistoquímico.

KDR: Kinase Insert Domain Receptor.

KRAS: v-ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogen Homolog.

LDH: Lactato Deshidrogenasa.

LDH5: Lactato Deshidrogenasa 5.

MAPK: Mitogen-activated protein kinases. Proteína quinasa activada por mitógenos.

MMPS: Metaloproteasas de matriz extracelular.

MMR: Mismatch repair system. Sistema de reparación

MLH1: Mutl homolog 1.

MSH2: MutS protein homolog 2.

MSH6: MutS protein homolog 6.

MSI: Inestabilidad de Microsatélites.

MYC: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog. Oncogén homólogo de la mielocitomatosis viral.

NA: No alcanzada

NCI-CTC: National Cancer Institute Common Toxicity Criteria. Criterios comunes de toxicidad del Instituto Nacional del Cáncer.

NFκB: Nuclear factor kappa B. Factor nuclear kappa B.

NRAS: Neuroblastoma Rat Sarcoma Viral oncogen homolog.

NRP1: Neuropilin-1 precursor. Precursor de Neuropilin-1

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar.

PCR: Polymerase Chain Reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: Platelet-derived growth factor. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PD1: Proteína de muerte programada 1.

PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor. Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PDL1: Ligando de proteína de muerte programada 1.

PHD: Prolil 4-hidroxilasa.

PIGF: Factor de crecimiento placentario.

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase. Fosfatidil-inositol 3-quinasa

pKDR: Phosphorylated Kinase Domain-containing Receptor. Receptor Dominio-Kinase fosforilado.

PS: Performance status. Estado funcional.

PMS2: PMS1 homolog 2, mismatch repair system component

pTNM: Estadificación patológica TNM.

RB1: Retinoblastoma 1.

RAF: v-Raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog

RAS: Rat Sarcoma Viral Oncogen Homolog

RASmut: RAS mutado

RASwt: RAS wild-type (ausencia de mutaciones en los genes de la familia RAS)

RECIST: Response evaluation criteria in solid tumors. Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos.

RC: Respuesta Completa.

ROS1: v-ROS Avian UR2 Sarcoma Virus Oncogene Homolog 1

RP: Respuesta Parcial.

RR: Riesgo Relativo.

rTNM: Estadificación TNM tras recidiva tumoral.

SATB2: Special AT-Rich sequence-binding protein 2.

SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results Program. Base de datos de vigilancia y epidemiología de los Estados Unidos

SG: Supervivencia global.

SLP: Supervivencia libre de progresión.

SMAD: Mothers Against Decantaplegic.

SRC: v-Src Avian Sarcoma Viral

TAC: Tomografía axial computerizada.

TGF-beta: Transforming growth factor beta. Factor de crecimiento transformante beta.

TIE2: Endothelium-specific receptor tyrosine kinase 2. Receptor tirosina-quinasa 2 específico del endotelio.

TK: Tyrosine-Kinase. Tirsina quinasa.

TMA: Tissue Microarray. Micromatriz de tejido.

TNM: Tumor/Nódulos/Metástasis.

TP53: Tumour protein 53. Proteína tumoral 53.

TR: Tasa de Respueta.

VEGF: Vascular endothelial growth factor. Factor de crecimiento del endotelio vascular.

VEGFR: Vascular endotelial growth factor receptor. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular.

VHL: Von Hippel-Lindau.

VPF: Factor de permeabilidad vascular.

XELOX: Esquema de quimioterapia que combina Capecitabina oral y Oxaliplatino.

yTNM: Estadificación TNM tras tratamiento neoadyuvante.

I. INTRODUCCION GENERAL

1. Concepto de Cáncer

Bajo el nombre genérico de cáncer se engloban un conjunto de patologías que pueden afectar a distintos tipos de células y tejidos y que tienen en común el crecimiento descontrolado y desordenado de las células neoplásicas. Las cuales pueden adquirir la capacidad de desplazarse desde el tejido de origen hacia otros tejidos y órganos, en el proceso conocido como metástasis. La tumorigénesis es un proceso con varias etapas que implican cambios dinámicos en el genoma. Estos cambios liberan a las células cancerosas de los mecanismos homeostáticos que dirigen la proliferación normal y controlada ⁽¹⁾, confiriéndoles ventajas evolutivas en el crecimiento, que les permiten adquirir características diferentes de las de las células normales.

2. Cáncer Colorrectal

2.1 Epidemiología

El cáncer constituye un importante problema de salud pública, siendo la principal causa de muerte en los países desarrollados y la segunda en países en vías de desarrollo. Las tasas de incidencia y mortalidad del Carcinoma Colorrectal (CCR) varían notablemente en todo el mundo. A nivel mundial, se diagnostican 1,4 millones de casos nuevos al años, y en el año 2012 se estimó una mortalidad de aproximadamente 694.000 muertes ⁽²⁾. El cáncer de colon es la tercera causa de cáncer más frecuente en el varón, y la segunda en la mujer, siendo responsable del 10% de las muertes por cáncer en ambos sexos ⁽³⁾. Las tasas de incidencia y mortalidad son sustancialmente mayores en hombres que en mujeres. En los Estados Unidos, la incidencia y la mortalidad han ido disminuyendo de forma lenta pero constante durante los últimos años ⁽⁴⁾. Anualmente, se diagnostican aproximadamente 134.490 nuevos casos de cáncer de intestino grueso en ese país, de los cuales 95.270 son de colon y el resto cánceres rectales ⁽⁵⁾. (Figura 1)

A nivel mundial, la incidencia de CCR varía a lo largo de las diferentes áreas geográficas ⁽⁶⁾. En los últimos datos publicados de la base de datos Globocan de 2012, las mayores tasas de incidencia están en Australia y Nueva Zelanda, Europa y América del Norte, y las más bajas se encuentran en África, Asia del Sur, y Centroamérica ⁽³⁾. Estas diferencias geográficas parecen ser atribuibles a diferencias en las exposiciones alimentarias y ambientales, así como a posibles diferencias en la susceptibilidad genética. En Estados Unidos, las tasas de incidencia de CCR han disminuido alrededor del 3 - 4 por ciento por año durante los últimos 15 años ⁽⁴⁾. Las tasas de incidencia en la mayoría de los países occidentales se han mantenido estables o aumentaron ligeramente durante este período. En contraste, las tasas de incidencia de CCR han aumentado rápidamente en varias áreas históricamente de bajo riesgo, incluyendo España, y una serie de países de Asia del Este y Europa del Este ^(2,7). Las tasas de mortalidad por CCR han disminuido progresivamente desde mediados de la década de 1980 tanto en los Estados Unidos como en muchos otros países occidentales ^(4,5). Esta mejoría se puede atribuir, al menos en parte, a la instauración de campañas de detección precoz y la eliminación de pólipos de colon en fases tempranas de la tumorigénesis, a la detección de CCR en estadios iniciales, y a la introducción de tratamiento neoadyuvantes y adyuvantes más eficaces. En contraste con estos datos, las tasas de mortalidad siguen aumentando en muchos países con recursos limitados y con peores infraestructuras sanitarias, sobre todo en Europa del Este, América Central y América del Sur ⁽⁷⁾.

Figura 1. Estimación mundial de nuevos casos y muertes por cáncer en 2017 según los principales tipos de localización del cáncer (Siegel et al., 2017)



2.2 Factores de Riesgo

Existen diferentes factores ambientales y genéticos que pueden aumentar la probabilidad de desarrollar CCR ⁽⁸⁾. Aunque la susceptibilidad heredada es responsable de las mayores tasas de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en los pacientes portadores de las mismas, la mayoría de los CCR son esporádicos y no familiares.

Factores de Riesgo Genéticos

Se conoce como síndromes hereditarios asociados a CCR a varios trastornos genéticos específicos, la mayoría de los cuales se heredan de forma autosómica dominante, que se asocian con un riesgo muy alto de desarrollar cáncer de colon. La poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis [CCHNP]) son los más comunes entre los síndromes de cáncer de colon familiar, pero en conjunto tan sólo representan alrededor del 5 por ciento de todos los casos de CCR ⁽⁹⁾. La poliposis adenomatosa familiar (PAF) y sus variantes (síndrome de Gardner, síndrome de Turcot y poliposis adenomatosa familiar atenuada) representan menos del 1 por ciento de los cánceres colorrectales. La PAF típica se caracteriza por la aparición de numerosos adenomas de colon durante la infancia. Los síntomas aparecen a una edad promedio de aproximadamente 16 años, y el cáncer de colon se produce en el 90 por ciento de las personas no tratadas antes de los 45 años. Una forma atenuada de PAF (AFAP) conlleva un alto riesgo de cáncer de colon, pero se caracteriza por un menor número de adenomas y una edad media más elevada de diagnóstico de cáncer, 54 años. La PAF es causada por mutaciones en la línea germinal del gen de la poliposis adenomatosa coli (APC), que se localiza en el cromosoma 5. El mismo gen está implicado en la forma atenuada de PAF, pero los sitios de las mutaciones del gen APC son diferentes.

El Síndrome de Lynch o síndrome de cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC), es un síndrome autosómico dominante más común que la PAF, representa aproximadamente el 3 por ciento de todos los adenocarcinomas de colon. El Síndrome de Lynch se debe sospechar especialmente cuando el paciente presenta antecedentes familiares de CCR, carcinoma de endometrio, y otros tipos de cáncer. El término síndrome de Lynch se reserva en la actualidad para las familias en las que se ha demostrado la presencia de un defecto genético que causa la enfermedad en uno de los genes de reparación del ADN de la familia MMR, más comúnmente hMLH1,

hMSH2, hMSH6, o PMS2. Como regla general, los pacientes con síndrome de Lynch tienen una mutación de línea germinal en un alelo de un gen MMR, y el segundo alelo es somáticamente inactivado en los cánceres colorrectales por mutaciones somáticas, pérdida de heterocigosidad o silenciamiento epigenético por el promotor de la hipermetilación. Como resultado, los CCR secundarios a Síndrome de Lynch tienen alterada la capacidad de reparación del ADN, son hipermutables, y presentan inestabilidad de microsatélites. Los tumores colorrectales que se desarrollan en pacientes con síndrome de Lynch se caracterizan por aparecer a una edad temprana y por un predominio de las lesiones en el hemicolon derecho. La edad media al diagnóstico del cáncer es de aproximadamente 48 años, y algunos pacientes se presentan en su tercera década de vida. Aproximadamente el 70 por ciento de las primeras lesiones surgen proximales al ángulo esplénico, y aproximadamente el 10 por ciento presentan varios tumores sincrónicos (aparición simultánea de dos o más tumores distintos) o metacrónicos (nuevos tumores, al menos, seis meses después del diagnóstico del tumor inicial). La probabilidad de desarrollar cáncer colorrectal metacrónico en los pacientes sometidos a resección segmentaria es alta; en un estudio reciente de 382 pacientes portadores de esta alteración genética, el 16 por ciento presentó una segunda neoplasia durante a los 10 primeros años de seguimiento, llegando a una tasa del 62 por ciento a los 30 años ⁽¹⁰⁾.

Factores de Riesgo Ambientales

El bajo nivel socioeconómico también se asocia con un mayor riesgo para el desarrollo de CCR. Un estudio estimó el riesgo de CCR se incrementaba en el nivel socioeconómico más bajo en aproximadamente un 30 por ciento en comparación con el quintil más alto ⁽¹¹⁾. Algunos comportamientos potencialmente modificables como la inactividad física, la dieta poco saludable, el tabaquismo, o la obesidad podrían explicar una proporción sustancial (entre un tercio y la mitad) de la disparidad en el riesgo de desarrollar CCR en función del estatus socioeconómico ⁽¹²⁾. Otros factores como la tasa más baja de exposición a las campañas de cribado y detección precoz de CCR, también contribuyen sustancialmente a las diferencias en el riesgo de CCR entre los diferentes estratos socioeconómicos de la población ⁽¹³⁾. Otros factores importantes que pueden estar implicados en el desarrollo del CCR son la historia personal o familiar de CCR esporádico o de pólipos adenomatosos ⁽¹⁴⁾, antecedentes personales de enfermedad inflamatoria intestinal que incrementa el riesgo entre 5 y 15

veces comparado con la población general ⁽¹⁵⁾, y la historia previa de irradiación abdominal ⁽¹⁶⁾.

La edad es un factor de riesgo muy importante para el CCR esporádico. El cáncer de intestino grueso es raro antes de los 40 años; la incidencia comienza a aumentar de manera significativa entre las edades de 40 y 50 años, y las tasas de incidencia específicas por edad aumentan en cada década subsiguiente ⁽¹⁷⁾. Datos procedentes de la base de datos de vigilancia y epidemiología de los Estados Unidos (SEER) ⁽¹⁸⁾ y otros registros de cáncer de países occidentales sugieren que la incidencia de cáncer colorrectal está aumentando en el grupo de menores de 50 años, mientras que está disminuyendo en los grupos de mayor edad ^(5,19). En los Estados Unidos, la incidencia de CCR en hombres y mujeres menores de 50 años aumentó de forma constante a un ritmo de 2,1 por ciento por año desde 1992 hasta 2012 ⁽⁵⁾. Algunos registros informan de un incremento en la incidencia de CCR, incluso entre los adultos jóvenes de 20 a 39 años de edad, aunque la incidencia absoluta en este grupo de edad sigue siendo muy inferior al de los adultos de 50 años o más ⁽¹⁹⁾. Este aumento de incidencia es debido fundamentalmente a cánceres en colon izquierdo, y particularmente en recto ⁽²⁰⁾. La literatura actual sugiere que más del 86 por ciento de los diagnosticados menores de 50 son sintomáticos al diagnóstico, lo que se asocia con estadios más avanzados al diagnóstico y peor pronóstico ⁽²¹⁾. En la actualidad, la detección precoz no está recomendada para personas menores de 50, a menos que tengan una historia familiar de riesgo o estén diagnosticados de un síndrome de predisposición hereditaria. En los Estados Unidos, se estima que el 35 por ciento de estos cánceres en adultos jóvenes están asociados a síndromes hereditarios de CCR, aunque las causas de este aumento de la incidencia siguen siendo desconocidas ⁽²²⁾. Curiosamente, también se han observado tendencias similares en los países en desarrollo, incluidos los países de bajos recursos, tradicionalmente con las tasas de CCR más bajas ⁽⁷⁾. Los esfuerzos actuales para reducir la incidencia y mortalidad de CCR en los adultos jóvenes se centran en la identificación de los pacientes candidatos a procedimientos de detección precoz a edades más tempranas, basados en la historia familiar y la educación sanitaria mediante la información sobre el potencial riesgo de cáncer cuando aparecen síntomas de riesgo, tales como el sangrado rectal persistente a cualquier edad.

El consumo de carne roja cocinada a alta temperatura, probablemente por la producción de hidrocarburos poli-aromáticos y otros carcinógenos ⁽²³⁾ también ha sido asociado con un aumento del riesgo de desarrollo de CCR. Así mismo, el consumo de tabaco conlleva un aumento del riesgo relativo de 1,18 (95% CI 1.11-1.25) de desarrollar CCR frente a no fumadores, tal y como se observó en un metanálisis de 106 estudios observacionales ⁽²⁴⁾. La ingesta de alcohol también se ha asociado con un mayor riesgo de CCR en un metaanálisis que analizó un conjunto de estudios con un total de 27 cohortes de pacientes y 34 de casos control. El análisis de estos datos concluyó que los bebedores moderados presentaban un aumento significativo en el riesgo de CCR frente a los no bebedores (dos a tres bebidas al día, riesgo relativo (RR) 1,21 , 95 % CI 1.13 a 1.28) y grandes bebedores (≥ 4 bebidas por día , RR 1,52, IC del 95 % 1,27 a 1,81), pero no para bebedores ligeros (≤ 1 bebida por día , RR 1,00 ; IC del 95%: 0,95-1,05) ⁽²⁵⁾.

Existen también factores que se han relacionado con un menor riesgo de CCR, que podrían tener un factor protector frente a esta enfermedad ⁽²⁶⁾. Entre estos factores se incluyen la actividad física regular, una variedad de factores dietéticos, el uso regular de aspirina o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), y la terapia de reemplazo hormonal en mujeres posmenopáusicas. Ninguno de estos factores se utiliza actualmente para estratificar las recomendaciones de cribado de CCR .

2.3 Clasificación anatomopatológica

La clasificación anatomopatológica del cáncer colorrectal se basa en técnicas histológicas y patológicas. La evaluación histológica se realiza sobre muestras de tejido de biopsia obtenidas mediante colonoscopia, punciones o procedimientos quirúrgicos.

Los CCR se originan en adenomas o a partir de lesiones de displasia plana. Estas lesiones premalignas sufren un proceso evolutivo hasta desarrollar patrones morfológicos de la invasión y expansión. Los tumores en el extremo proximal o colon derecho por lo general aparecen en forma de pólipos o como masas exofíticas. En estos casos la forma de presentación típica es la de anemia ferropénica por pérdidas de sangre. Por el contrario, los tumores que afectan el colon distal o izquierdos son más comúnmente lesiones anulares que estenosan el asa intestinal y que producen la clásica imagen de "corazón de manzana". El lumen del intestino se estrecha, produciendo síntomas de la disfunción del intestino (por ejemplo, estreñimiento,

diarrea, u obstrucción intestinal). La presencia de obstrucción intestinal o perforación de la pared empeora el pronóstico general ⁽²⁷⁾.

A pesar de las diferencias en su aspecto macroscópico, los cánceres de colon derecho e izquierdo son microscópicamente similares, y parece que tienen un pronóstico similar cuando se presentan en estadios iniciales (enfermedad locorregional) ⁽²⁸⁾. Sin embargo, en el contexto de la enfermedad metastásica, al menos algunos datos sugieren un peor pronóstico para las personas con un tumor primario del lado derecho ⁽²⁹⁾. Los cánceres de colon sincrónicos, definidos como dos o más tumores primarios separados por tejido intestinal normal y no debidos a la extensión directa o metastásica, ocurren en 3-5 por ciento de los pacientes con CCR. La incidencia es de aproximadamente un 2,5 por ciento cuando se excluyen los pacientes con síndrome de Lynch ⁽³⁰⁾. La gran mayoría de las neoplasias de colon y recto son carcinomas. Otros tipos histológicos (tumores neuroendocrinos, hamartomas, tumores mesenquimales, linfomas) son relativamente inusuales. De los carcinomas, más del 90 por ciento son adenocarcinomas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció la clasificación de los carcinomas de colon y recto que se proporciona en la tabla (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de Carcinoma de Colon y Recto de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Adenocarcinoma
- Adenocarcinoma cribiforme tipo comedón
- Carcinoma medular
- Carcinoma micropapilar
- Adenocarcinoma mucinoso (coloide)
- Adenocarcinoma serrado
- Carcinoma con células en anillo de sello
Carcinoma Adenoescamoso
Carcinoma de células fusiformes
Carcinoma Epidermoide
Carcinoma Indiferenciado

Algunas de estas variantes morfológicas conllevan asociado un significado pronóstico. A modo de ejemplo, los cánceres en anillo de sello son un subtipo de adenocarcinoma agresivo con un mal pronóstico en general, mientras que el subtipo medular, que a menudo se asocia con las proteínas de reparación de genes deficientes, tiene un pronóstico relativamente favorable ⁽³¹⁾.

En el caso de un Adenocarcinoma no especificado (NOS), se puede clasificar además por el grado histológico de diferenciación, basado en la presencia de glándulas bien formadas en el tumor: Grado 1 o bien diferenciado si la formación glandular es >95%, Grado 2 o moderadamente diferenciado si está entre el 50-95%; y Grado 3 o pobremente diferenciado si es <50%). La formación de la glándula está presente en mayor o menor grado en los tumores bien diferenciados y moderadamente diferenciados respectivamente. Por el contrario, los adenocarcinomas pobremente diferenciados o no diferenciados (tumores de alto grado) no forman estructuras glandulares bien definidas, consistiendo predominantemente en placas macizas o cordones de células inmunológicas, que a menudo presentan marcada atipia celular, pleomorfismo y un alto índice mitótico. En la mayoría de los estudios, la importancia pronóstica del grado de diferenciación se establece en el análisis estadístico como variable de estratificación de dos niveles: grado bajo (bien y moderadamente diferenciado) frente alto grado (pobremente diferenciado o indiferenciado).

Muchos tumores producen mucina, que puede permanecer dentro de las células o ser secretada al exterior. La mucina extracelular puede diseccionar a través de la pared del tumor, ayudando a su extensión local. Los tumores que producen grandes cantidades de mucina extracelular (es decir, que comprende mucina ≥ 50 por ciento de la masa tumoral) se clasifican como carcinomas mucinosos, y representan aproximadamente entre el 11 y el 17 por ciento de todos los CCR. Los carcinomas mucinosos aparecen más frecuentemente en el lado derecho del colon, y generalmente tienen una pobre respuesta a la quimioterapia y la radioterapia adyuvante o neoadyuvante ⁽³²⁾. En algunos carcinomas que no forman glándulas, la mucina intracelular puede ser un rasgo dominante que desplaza los núcleos celulares a un lado. Cuando ≥ 50 por ciento del tumor está compuesto de células de este tipo, se clasifica como un carcinoma de células en anillo de sello. Representan tan sólo del 1 al 2 por ciento de todos los CCR, siendo una variante agresiva, con una alta propensión a la diseminación intramural y al desarrollo de carcinomatosis peritoneal ⁽³³⁾.

Algunos tipos de cáncer, particularmente los que surgen en el colon distal, contienen áreas de diferenciación escamosa y se denominan carcinomas adenoescamosos. Estos tumores raros representan entre 0,05 y 0,2 por ciento de todos los CCR y están asociados con una mortalidad global y colorrectal específica más alta en comparación con los adenocarcinomas ⁽³⁴⁾. Aproximadamente el 10 por ciento de los CCR, especialmente los pobremente diferenciados, contienen focos de diferenciación neuroendocrina. Aquellos tumores no formadores de glándulas con predominio de diferenciación neuroendocrina se clasifican como tumores neuroendocrinos bien diferenciados (carcinoides), que tienen un pronóstico más favorable que los adenocarcinomas y carcinomas neuroendocrinos pobremente diferenciados, que tienen un mal pronóstico en general.

El subtipo de carcinoma medular es un tipo distintivo de cáncer no formador de glándulas compuesto de grandes células poligonales y eosinofílicas, que crecen en láminas sólidas y que generalmente están fuertemente infiltrados por linfocitos (linfocitos infiltrantes de tumor) ⁽³⁵⁾. La importancia de reconocer este subtipo histológico es su asociación con deficiencias en una o más proteínas de reparación de genes, incluyendo aquellos que surgen en el contexto de síndrome de Lynch. La huella biológica de estos tumores es un alto grado de inestabilidad de microsatélites.

En cuanto al diagnóstico Inmuno-histoquímico (IHQ), cabe destacar que la Citoqueratina 20 (CK20) y el Caudal-type homeobox 2 (CDX2) son dos de los marcadores más sensibles y específicos de diferenciación intestinal y son marcadores de IHQ extremadamente útiles para identificar correctamente los adenocarcinomas de origen colorrectal. Sin embargo, es importante destacar que a diferencia de los adenocarcinomas colorrectales convencionales, los carcinomas medulares con altos niveles de inestabilidad de microsatélites con frecuencia carecen de CSX2 y de la expresión de CK20, y en su lugar pueden expresar marcadores como calretinina, CK7, SATB2 , y CDH17 ⁽³⁶⁾.

La IHQ también es útil para identificar tumores con deficiente expresión de proteínas de reparación de genes (MMR). La utilidad clínica de la identificación de estos tumores se basa en dos aspectos fundamentales:

- En mutaciones esporádicas somáticas de genes MMR, el tejido tumoral muestra pérdida de la tinción de una o más proteínas MMR, pero la mucosa normal circundante será positiva, sirviendo como un control interno para la tinción. Los

tumores con deficiencia de proteínas MMR tienen un pronóstico relativamente favorable, y este análisis se puede utilizar en el proceso de toma de decisiones para decidir la indicación de quimioterapia adyuvante, particularmente para pacientes con estadio II del cáncer de colon (ganglios negativos).

- Las mutaciones germinales en los genes MMR que causan el síndrome de Lynch suelen dar lugar a una proteína truncada MMR. Este defecto se traduce en la pérdida de la tinción de la proteína en las células tumorales, y su ausencia de expresión en el análisis inmuno-histoquímico. Por lo general se lleva a cabo la prueba de MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6. La probabilidad de encontrar una mutación de línea germinal en uno de los genes MMR en base a los resultados de IHQ varía dependiendo de la proteína que este ausente.

El estudio de las alteraciones moleculares en CCR contribuye a conocer mejor el proceso de carcinogénesis, ya que la heterogeneidad histológica y biológica son fenómenos bien conocidos en esta enfermedad. La generalización de técnicas de biología molecular aplicadas al conocimiento de las neoplasias permite por una parte la identificación de múltiples mutaciones relevantes clínicamente que mejoran la comprensión de la patogénesis en cáncer, además de aportar la confirmación de la heterogeneidad en este grupo de neoplasias. Además, puede conducir a la renovación completa de la clasificación, abriendo el camino hacia una clasificación molecular de estas neoplasias. Estas alteraciones moleculares se describirán con más detalle en el apartado 3.3 “Caracterización Molecular del Cáncer Colorrectal”.

2.4 Patrones de diseminación y estadificación.

El cáncer colorrectal (CRC) se pueden propagar por diseminación hematológica y linfática, así como por diseminación contigua y transperitoneal. Los lugares más frecuentes de diseminación metastásica son los ganglios linfáticos regionales, el hígado y los pulmones. Debido a que el drenaje venoso del tracto intestinal es a través del sistema portal, el primer sitio de diseminación hematológica es generalmente hígado, seguido de los pulmones, hueso, y muchos otros sitios, incluyendo el cerebro (raramente). Sin embargo, los tumores que surgen en el recto distal pueden metastatizar inicialmente a los pulmones debido a que el drenaje de la vena rectal es a través de la vena cava inferior en lugar del sistema venoso portal.

Para proceder al diagnóstico es necesaria la determinación del estadio del cáncer en función de su extensión anatómica. La estadificación del cáncer colorrectal se basa en la “Clasificación de Tumores Malignos” y utiliza tres parámetros: el tamaño tumoral, la infiltración de los nódulos linfáticos y la presencia o no de metástasis (Tumor/Nódulos/Metástasis –TNM), propuesto por el American Joint Committee on Cancer / Unión Internacional contra el Cáncer (AJCC / UICC) (tabla 2 y tabla 3).

Tabla 2. Clasificación TNM para carcinoma colorrectal (7ª edición de la AJCC)

Tumor Primario (T)	
Tx	Tumor primario no puede ser evaluado
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: Intraepitelial o invasión de lámina propia
T1	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la muscular propia
T3	El tumor invade más allá de la muscular propia hasta tejidos pericólicas
T4a	El tumor penetra en la superficie del peritoneo visceral
T4b	El tumor invade directamente estructuras u órganos vecinos
Ganglios linfáticos regionales (N)	
Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	Ausencia de metástasis en ganglios linfáticos
N1	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos <ul style="list-style-type: none"> - N1a. Metástasis en un único ganglio regional - N1b. Metástasis en 2-3 ganglios - N1c. Depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos o perirrectales no peritonealizados sin afectación ganglionar locorregional.
N2	Metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos <ul style="list-style-type: none"> - N2a. Metástasis en 4-6 ganglios - N2b. Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos.
Metástasis a distancia (M)	
M0	No metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia <ul style="list-style-type: none"> - M1a. Metástasis confinadas a un único órgano - M1b. Metástasis en más de un órgano o en Peritoneo

TNM: Tumor/Nódulos/Metástasis

Esta estadificación tumoral puede realizarse en diferentes momentos del proceso diagnóstico-terapéutico, como puede ser: antes de tratamiento (estadificación clínica, cTNM), después del tratamiento quirúrgico (estadificación patológica o post-quirúrgica, pTNM), después o durante el tratamiento de inducción (estadificación yTNM), en el momento de la recidiva tumoral después de un intervalo libre de enfermedad (estadificación rTNM) o en la autopsia (estadificación aTNM) ⁽³⁷⁾. La estadificación clínica permite adjudicar el mejor tratamiento al paciente, mientras que la estadificación patológica es más precisa que la estadificación clínica y se ajusta más a

la realidad de la extensión tumoral, ya que sirve para emitir un pronóstico y para decidir la idoneidad del tratamiento de consolidación. La estadificación después o durante el tratamiento de inducción permite conocer si ha habido algún cambio tumoral en la clasificación clínica y decidir si el paciente puede o no ser sometido a tratamiento quirúrgico tras la terapia de inducción.

Tabla 3. Agrupación por estadios (7ª edición de la AJCC)

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T4a	N0	M0
IIc	T4b	N0	M0
IIIa	T1-2 T1	N1/N1c N2a	M0
IIIb	T3-T4a T2-T3 T1-T2	N1/N1c N2a N2b	M0
IIIc	T4a T3-T4a T4b	N2a N2b N1-N2	M0
IVa	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVb	Cualquier T	Cualquier N	M1b

2.5 Tratamiento

La elección del tratamiento en el CCR depende de la extensión de la enfermedad, la localización del tumor primario, la clasificación anatomopatológica y la presencia o no de comorbilidades en el paciente.

Estadios precoces

Aproximadamente el 80 por ciento de los CCR se diagnostican en estadios precoces, limitándose la enfermedad en la pared del colon y/o en los ganglios linfáticos regionales. La cirugía es la única modalidad curativa para el cáncer de colon localizado. El objetivo de la cirugía para el cáncer invasivo es la extirpación completa del tumor, el pedículo vascular mayor, y la cuenca de drenaje linfático del segmento de colon afectado. Restaurar la continuidad intestinal usando una anastomosis

primaria puede llevarse a cabo sin complicaciones en la mayoría de los pacientes sometidos a una colectomía. Sin embargo, puede ser necesaria la colocación de una colostomía de derivación proximal o una ileostomía temporal en el caso de peritonitis difusa o perforación intestinal, o cuando el paciente se encuentra inestable para no prolongar el tiempo de la cirugía. En ocasiones, también es aconsejable realizar este tipo de técnicas, para pacientes con cáncer de colon del lado izquierdo que condiciona obstrucción intestinal.

El tratamiento neoadyuvante con quimio-radioterapia previa a la cirugía inicial es un enfoque común para el cáncer de recto localmente avanzado que se apoya en datos de ensayos aleatorios ⁽³⁸⁾. Por otra parte la estrategia de quimio-radioterapia neoadyuvante no está tan clara en pacientes con carcinoma de colon, aunque podría considerarse en un paciente con cáncer de colon localmente avanzado con invasión de órganos adyacentes. La evidencia científica en esta situación concreta se limitan a comunicaciones de casos aislados y a pequeñas series de casos ⁽³⁹⁾.

Para los pacientes que han sido sometidos a una resección potencialmente curativa de un cáncer de colon, el objetivo de la quimioterapia postoperatoria (adyuvante) es erradicar las micrometástasis, reduciendo así la probabilidad de recurrencia de la enfermedad y aumentar la tasa de curación. Los beneficios de la quimioterapia adyuvante han sido más claramente demostrado en pacientes con enfermedad en estadio III (ganglios positivos). El beneficio estimado en este grupo de pacientes, con los esquemas de quimioterapia modernos, es una reducción de aproximadamente el 30 por ciento en el riesgo de recurrencia de la enfermedad y una reducción de entre 22 y el 32 por ciento de la mortalidad ⁽⁴⁰⁾. La mayoría de los tratamientos implican una combinación de varios medicamentos de quimioterapia, administrados por vía intravenosa, en un orden específico en días específicos. Para los pacientes con cáncer de colon con ganglios positivos, un tratamiento de seis meses de quimioterapia con Oxaliplatino es el tratamiento estándar para la mayoría de los pacientes. En pacientes con ausencia de infiltración ganglionar en la resección (estadio II), el beneficio de la quimioterapia es controvertido. Las decisiones de tratamiento deben ser individualizados, y los riesgos y beneficios estimados de la quimioterapia adyuvante deben ser discutidos con el paciente analizando con detalle algunas características clínico-patológicas que pueden decidir la indicación del tratamiento. Entre los aspectos que deben tenerse en cuenta al evaluar el riesgo de recurrencia y el beneficio estimado de los regímenes de quimioterapia específicos son: la presencia

de características clínico-patológicas de alto riesgo (menos de 12 ganglios aislados en la pieza quirúrgica; estadio T4; la presencia de perforación u obstrucción intestinal, la presencia de tumores indiferenciados, o de invasión linfovascular o perineural), el estado de las enzimas de la familia de reparación de genes (MMR), la evaluación de las comorbilidades y la esperanza de vida estimada, así como los riesgos potenciales asociados con el tratamiento.

Estadio avanzado

Aproximadamente el 20 por ciento de los CCR son metastáticos en el momento de presentación. Durante los últimos años se han producido grandes avances en la quimioterapia sistémica y se han ampliado las opciones terapéuticas para estos pacientes, consiguiéndose una importante mejora de esperanza de vida, que ha pasado de ser de menos de un año, a más de 20 meses en la actualidad. Sin embargo, menos del 10 por ciento de los pacientes tratados con quimioterapia están vivos a los cinco años, y esencialmente no hay ninguno libre de enfermedad a menos que se pueda llevar a cabo la resección o ablación de todas las metástasis. La cirugía proporciona una opción potencialmente curativa para pacientes seleccionados con enfermedad metastásica limitada, predominantemente en el hígado y el pulmón. La supervivencia a largo plazo que se puede lograr con metastasectomías es de hasta el 50 por ciento de los casos, y se justifica un abordaje quirúrgico agresivo tanto del tumor primario como de los sitios de metástasis, en combinación con la quimioterapia sistémica. Sin embargo, incluso después de la resección completa de las metástasis, la mayoría de los pacientes que están vivos a los cinco años presentan enfermedad activa; sólo alrededor del 20 al 30 por ciento permanecen libres de recurrencia a largo plazo y pueden ser curados ⁽⁴¹⁾.

La mayoría de los pacientes (80-90%) diagnosticados de CCR avanzado no son candidatos para la resección completa inicial del tumor primario y las metástasis, y en esos casos el tratamiento indicado es la quimioterapia con intención paliativa. Durante más de 40 años, el tratamiento de elección para los pacientes con carcinoma colorrectal (CCR) avanzado fue la quimioterapia con 5-Fluorouracilo, que proporcionaba tasas de respuesta de entre 10-20% como agente único ⁽⁴²⁾. La introducción del Oxaliplatino e Irinotecan en los esquemas de quimioterapia para estos pacientes, significó un importante avance en el tratamiento de la enfermedad, incrementando tanto las tasas de respuesta como la supervivencia global de los

pacientes ⁽⁴³⁾. Finalmente, los anticuerpos monoclonales con actividad antiangiogénica frente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y los dirigidos frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se han incorporado a los esquemas de tratamiento citostático, y también han conseguido aumentar la eficacia, incrementando tanto las tasas de respuesta como prolongando la supervivencia de los pacientes ^(44,45). Bevacizumab (Avastin®), es un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), mediador fundamental de la angiogénesis ⁽⁴⁶⁾. La combinación de quimioterapia con Oxaliplatino, Fluoropirimidinas y Bevacizumab ofrece medianas de Supervivencia Libre de Progresión (SLP) de 9.4 meses y de Supervivencia Global (SG) de 21.3 meses, siendo actualmente uno de los esquemas de tratamiento más utilizados en primera línea de pacientes con CCR avanzado, especialmente para los pacientes portadores de tumores con mutaciones en la vía de RAS, que no se benefician de tratamientos dirigidos anti-EGFR.

Diferentes características clínico-patológicas se han propuesto como factores pronósticos capaces de predecir la evolución de los pacientes con CCR avanzado tratados con quimioterapia de primera línea, como la presencia de carcinomatosis peritoneal ⁽⁴⁷⁾, el número de localizaciones metastásicas, la resección del tumor primario previo al inicio del tratamiento, los niveles séricos elevados de marcadores tumorales, la presencia de mutaciones de KRAS ⁽⁴⁸⁾, o la localización del tumor primario ⁽⁴⁹⁾. Sin embargo, hasta la fecha no existe una estrategia fiable para la predicción de la supervivencia de los pacientes individuales sometidos a quimioterapia. Existe un interés creciente en la identificación de factores pronósticos que podrían permitir una mejor estratificación de los pacientes, con el objetivo de ayudar a los oncólogos y sus pacientes en la toma de decisiones de tratamiento.

3. Biología Molecular del Cáncer Colorrectal

3.1 Características moleculares del cáncer

Hanahan y Weinberg postularon en el año 2000 un modelo unificador que proponía seis características o alteraciones en la fisiología celular compartidas por todos los tipos celulares tumorales, esenciales para el desarrollo del cáncer (Hallmarks of cancer). Estas alteraciones se definen como capacidades funcionales adquiridas por las células tumorales, vía distintos mecanismos y en varios momentos durante el

curso de la tumorigénesis, que les confieren ventajas en supervivencia, proliferación y diseminación⁽¹⁾. Recientemente se ha postulado la necesidad de incorporar a estas seis características, otros 4 atributos distintos que presentan las células cancerosas fundamentales también para el desarrollo del cáncer. Además, en su última revisión, estos autores postulan que la biología de los tumores no puede entenderse simplemente por la enumeración de los rasgos del cáncer, sino que debe abarcar también la contribución del microambiente tumoral ⁽⁵⁰⁾.

1. Independencia de las señales de crecimiento.

Las células normales requieren señales mitogénicas para pasar de un estado quiescente a un estado proliferativo. Estas señales son transmitidas al interior celular (transducción) mediante receptores transmembrana a los que se unen diferentes tipos de moléculas de señalización o comunicación intercelular como factores de crecimiento solubles y componentes de la matriz celular, entre otros. En ausencia de estas señales estimuladoras, las células normales no pueden crecer. Por el contrario, las células tumorales pueden crecer sin necesidad de que se produzcan dichas interacciones, ya que o bien generan muchas de sus propias señales de crecimiento o bien activan intrínsecamente a los receptores transmembrana en ausencia de ligando, reduciendo así su dependencia de la estimulación desde el microambiente del tejido normal.

2. Insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento.

Múltiples señales antiproliferativas funcionan en las células normales para mantener la quiescencia celular y la homeostasis tisular. Por ejemplo, las señales inhibitoras del crecimiento son finalmente canalizadas a través de la proteína retinoblastoma (RB1). A nivel molecular el gen RB1 juega un papel muy importante, por eso en muchos tumores aparece mutado. En las células neoplásicas la disrupción de la vía de RB1 permite la liberación de factores de transcripción que controlan la expresión de genes esenciales para la progresión desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Esto permite la proliferación celular y hace a las células insensibles frente a los factores que evitan el crecimiento y que normalmente actúan a lo largo de esta vía.

3. Evasión de la apoptosis.

La capacidad de las poblaciones de células tumorales para expandirse en número está determinada por una ratio entre mitosis y muerte celular por necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La resistencia a la apoptosis por parte de las células

tumorales puede darse según diferentes estrategias, siendo la más común la pérdida de función del regulador proapoptótico TP53, debido a mutaciones en dicho gen. De esta manera se consigue eliminar un componente clave que induce la apoptosis cuando se detecta daño en el ADN.

4. Potencial replicativo ilimitado.

Las células de mamíferos poseen un programa intrínseco que limita el número de divisiones celulares que puedan ocurrir (60-70 duplicaciones), el límite de Hayflick, pasado el cual, dichas células detienen su crecimiento e inician un proceso denominado senescencia ⁽⁵¹⁾. La senescencia en las células normales es producida debido a la pérdida de la función protectora de los telómeros. En cambio, en las células neoplásicas se ha evidenciado el mantenimiento de la longitud de los telómeros en la mayoría de tipos de cáncer ⁽⁵²⁾ debido a una mayor actividad de la enzima telomerasa.

5. Angiogénesis sostenida.

La angiogénesis forma parte también de las principales características de las células tumorales, descritas ya en el año 2000 por Hanahan y Weinberg. El aporte de oxígeno y nutrientes es esencial para la función y supervivencia celular. Por ello, la generación de nuevos vasos sanguíneos es imprescindible para que el tumor pueda crecer más allá de 1-2mm³ ⁽⁵³⁾. La angiogénesis está regulada por el equilibrio entre factores inductores y factores inhibidores. Los tumores tienen la capacidad de activar la angiogénesis inclinando la balanza a favor de los inductores de este proceso.

6. Invasión tisular y metástasis.

La capacidad de invasión permite a las células neoplásicas escapar de la masa tumoral primaria y colonizar otras partes del cuerpo (metástasis). Al igual que en el tumor primario, el éxito en estos procesos depende de la adquisición de las cinco características anteriores. Los procesos de invasión y metástasis son extremadamente complejos, implicando cambios en las relaciones físicas entre las células y su microambiente y la activación de las proteasas extracelulares.

7. Inestabilidad genómica y mutación.

La adquisición de las múltiples alteraciones mencionadas anteriormente depende en gran medida de una sucesión de alteraciones en el genoma de las células neoplásicas. Los sucesivos pasos de la progresión tumoral pueden ser entendidos como una secuencia de expansiones clonales, cada una de las cuales es provocada

por la adquisición de un genotipo mutante favorable que resulta en una ventaja selectiva.

8. Inflamación.

Está demostrado que la generación de sustancias químicas muy reactivas que acompañan a la inflamación tiene un marcado papel genotóxico en las células. Además se ha constatado que tejidos crónicamente inflamados son más susceptibles a desarrollar tumores. La inflamación es evidente en muchos casos en estadios tempranos del cáncer y por ello, se ha incluido como otro de los puntos esenciales del proceso neoplásico. Sustentan esta inclusión, estudios que demuestran que ciertos mecanismos relacionados con la inflamación producen inestabilidad genética permitiendo la acumulación de alteraciones moleculares.

9. Reprogramación del metabolismo energético.

La enfermedad neoplásica no solo implica la desregulación del control de la proliferación celular, sino también los ajustes correspondientes en el metabolismo energético con el fin de estimular el crecimiento y la división celular. Otto Warburg fue el primero en observar una característica anómala en el metabolismo energético de las células cancerosas que denominó “glicólisis aerobia” ⁽⁵⁴⁾. Este tipo de metabolismo parece estar presente también en tejidos embrionarios, lo que apoya su importancia en los programas de gran escala biosintética que se requieren para la proliferación celular activa.

10. Evasión del sistema inmunológico.

La aparición de tumores parece reflejar, de alguna manera, que las células cancerosas han logrado evitar la detección por parte del sistema inmune o han sido capaces de limitar el alcance de la destrucción inmunológica y por tanto de evadir su erradicación. De manera simplificada se podría decir que las células cancerosas altamente inmunogénicas pueden evadir la destrucción inmunológica mediante la desactivación de componentes del sistema inmune que han sido enviados para eliminarlas.

3.2 Alteraciones moleculares del Cáncer Colorrectal

Actualmente se acepta que la transformación de la mucosa intestinal normal a cáncer colorrectal requiere de una serie de alteraciones moleculares tanto genéticas como epigenéticas. Estos cambios moleculares dan lugar finalmente a la derogación de las

principales vías de control de la regulación y el crecimiento celular. Los principales tipos de genes involucrados en la carcinogénesis son los oncogenes y los genes supresores de tumores. Desde una perspectiva funcional, un oncogén es un gen que tiene potencial para transformar una célula normal en maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer; en cambio, un gen supresor tumoral es un gen con capacidad para inhibir el crecimiento de una célula tumoral. Las alteraciones genéticas pueden conducir a una ganancia de función, en el caso de los oncogenes, o a una inactivación de la proteína codificada, en los genes supresores de tumores.

Los oncogenes habitualmente están activados a través de mutaciones puntuales, amplificaciones génicas o translocaciones cromosómicas; mientras que los genes supresores de tumores son inactivados mediante alteraciones bialélicas, que son combinaciones de mutaciones puntuales, deleciones e hipermetilación del promotor ⁽⁵⁵⁾. Durante el proceso de carcinogénesis, estos y otros cambios pueden influir en los procesos de invasión, metástasis y resistencia al tratamiento. La importancia de estas alteraciones moleculares es que su conocimiento ha permitido incorporar a la práctica clínica nuevos fármacos y estrategias terapéuticas. Por tanto es importante identificar la naturaleza y frecuencia de las alteraciones, evaluar si presentan una asociación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad y determinar si tienen un uso práctico en el diagnóstico temprano, la monitorización de los tratamientos o pueden servir como dianas para el desarrollo de nuevas terapias ⁽⁵⁶⁾.

Oncogenes

Entre los oncogenes más importantes implicados en CCR esporádicos encontramos RAS, SRC, MYC, y el Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2).

El oncogén RAS existe como tres variantes celulares, HRAS, KRAS, y NRAS. Aunque los tres oncogenes cuando están alterados tienen la capacidad para transformar las células normales en neoplásicas, son las mutaciones de KRAS las que más frecuentemente encontramos en los CCR ⁽⁵⁷⁾. Los oncogenes RAS codifican una familia de pequeñas proteínas con homología con las proteínas G que regulan la transducción de señales celulares, actuando como un conmutador de una sola vía para la transmisión de las señales de crecimiento extracelulares al núcleo ⁽⁵⁸⁾. Las mutaciones de RAS resultan en una proteína unida a GTP constitutivamente activa y un estímulo de crecimiento continuo. Los datos de modelos animales sugieren que las

mutaciones RAS pueden contribuir a la tumorigénesis colorrectal mediante la activación de las células madre de cáncer que ya han sido activadas por las mutaciones en el gen de la poliposis adenomatosa coli (APC) ⁽⁵⁹⁾. Las mutaciones de RAS se encuentran en hasta un 50 por ciento de los CCR esporádicos, y en el 50 por ciento de los adenomas de colon mayores de 1 cm; pero rara vez se ven en los adenomas pequeños ⁽⁶⁰⁾. KRAS también se ha implicado en el proceso de invasión tumoral y metástasis ⁽⁶¹⁾.

Genes supresores de tumores

En contraste con los oncogenes, los genes supresores de tumores normalmente tienen una influencia inhibitoria sobre el ciclo celular. Una vez que estos genes se eliminan o reducen su función, los mecanismos normales de control ya no son operativos, y se desencadena la proliferación incontrolada. A nivel celular, los genes supresores de tumores actúan de forma recesiva, es decir, que la función de la proteína normal se pierde sólo cuando ambas copias (alelos) del gen son inactivados por mutaciones puntuales, reordenamientos o deleciones.

El gen supresor APC tal vez sea el más crítico en el desarrollo temprano de CCR. Las mutaciones somáticas en ambos alelos están presentes en el 80 por ciento de los CCR esporádicos, y una sola mutación germinal en este gen es responsable de la poliposis adenomatosa familiar (PAF), un síndrome hereditario dominante que se caracteriza por el desarrollo de cientos a miles de pólipos colorrectales durante la segunda y tercera década de la vida.

Otro gen supresor importante en CCR es TP53. Se localiza en el cromosoma 17p, y es el gen más comúnmente mutado en el cáncer en humanos. En aproximadamente 50 a 70 por ciento de los CCRs, se produce la inactivación de TP53 por una mutación de un alelo, seguido de la pérdida del gen de tipo salvaje restante. Existe una pérdida de secuencias de 17p en hasta el 75 por ciento de los CCR, mientras que rara vez se pierden en adenomas y focos de criptas aberrantes, lo que sugiere que la pérdida de función de p53 representa un evento relativamente tardío en la carcinogénesis de colon ⁽⁶²⁾. De acuerdo con esta hipótesis, un gran estudio internacional de 3583 pacientes con CRC encontró un aumento en la frecuencia de mutaciones TP53 en función del estadio de la enfermedad, siendo más frecuente en las fases más avanzadas ⁽⁶³⁾.

El gen TP53 "de tipo salvaje" o no mutado, produce una proteína (p53) de unión a ADN que actúa como un activador transcripcional de genes inhibidores del crecimiento. p53 de tipo salvaje es particularmente crítico cuando las células están bajo estrés. Normalmente, las células detienen su crecimiento en respuesta a agentes que dañan el ADN y otros factores de estrés (por ejemplo, hipoxia) a través de la inducción/activación de p53 ⁽⁶²⁾. Una vez activado, p53 induce una variedad de respuestas limitantes del crecimiento, incluyendo la detención del ciclo celular (con el fin de facilitar la reparación del ADN), la apoptosis, la senescencia y la diferenciación. p53 produce estas respuestas en gran medida mediante la alteración de la expresión de un número de genes diana, al menos 20 de los cuales han sido descritos bajo el control transcripcional de p53. Debido a su papel central en la prevención de la propagación de las células con daño en el DNA, p53 es conocido como el "guardián del genoma".

Otros genes supresores de tumores implicados en el desarrollo de los CCR son los localizados en el cromosoma 18q (DCC, SMAD4 y SMAD2), TFG-beta o los genes reparadores de ADN Mismatch-repair (MMR).

3.3 Caracterización Molecular del Cáncer Colorrectal

Los avances en el conocimiento de las bases moleculares del CCR anuncian una revolución en el tratamiento personalizado de estos pacientes ⁽⁶⁴⁾. El primer biomarcador incorporado en la práctica clínica fue el análisis de mutaciones en el exón 2 de KRAS (codón 12/13) como un predictor establecido de la falta de respuesta a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR Cetuximab y Panitumumab en pacientes con CCR avanzado ⁽⁶⁵⁾. Las mutaciones en KRAS producen la anulación de la actividad GTP-asa lo que resulta en la activación de la señalización RAS/RAF. Esta alteración está presente en el 35%-42% de los CCRs. Otras mutaciones en otros miembros de la familia del oncogén RAS (exones KRAS 2, 3 y 4, NRAS exones 2, 3 y 4) han sido descritas también, aunque son mucho menos frecuentes. Las mutaciones de NRAS aparece en aproximadamente el 2% de los pacientes con CCR avanzado ⁽⁶⁶⁾. La presencia de mutaciones menos frecuentes de KRAS y de las mutaciones NRAS también se han relacionado con la ausencia de eficacia de las terapias anti-EGFR ⁽⁶⁷⁾. La evaluación del amplio panel de mutaciones de RAS es un biomarcador predictivo de respuesta en primera línea, ya que identifica a la población de pacientes que no se benefician de terapias anti-EGFR. Hoy en día es un procedimiento de rutina en todo el

mundo. Es motivo de controversia si las mutaciones de KRAS, con independencia del uso de terapias anti-EGFR, tiene un papel pronóstico en CCR avanzado ⁽⁶⁸⁾. Diferentes estudios publicados hasta la fecha no han sido concluyentes, y el papel del estado mutacional de KRAS y las NRAS como predictores de la eficacia de la quimioterapia y terapias antiangiogénicas sigue siendo incierto.

Las mutaciones de BRAF aparecen en un 5-15% de los CCRs metastásico . Y su presencia se ha identificado como un factor de mal pronóstico en diferentes estudios clínicos. Las mutaciones de BRAF frecuentemente se asocian con características histológicas adversas y tumores indiferenciados ⁽⁶⁹⁾. Los pacientes con CCR portadores de mutaciones en el oncogén BRAF podrían beneficiarse de un tratamiento más agresivo o de terapias dirigidas con inhibidores específicos de BRAF.

Durante los últimos años se ha hecho un progreso significativo en la investigación e identificación de biomarcadores candidatos a predecir la respuesta a nuevas estrategias terapéuticas. El ensayo clínico FIRE-3 sugiere que los pacientes con cáncer de colon derecho parecen beneficiarse menos de tratamiento con fármacos anti-EGFR ⁽⁷⁰⁾, además, estos pacientes son más propensos a presentar mutaciones de BRAF e inestabilidad de microsatélites (MSI). Los microsatélites son repeticiones múltiples de 1 a 5 nucleótidos que están distribuidos por todo el genoma. Debido a su estructura repetitiva, los microsatélites son susceptibles a errores durante el proceso de replicación. La inestabilidad en microsatélites se origina como consecuencia de una deficiencia en el mecanismo post-replicativo de reparación de apareamientos erróneos. Se conocen varios genes cuyos productos están involucrados en este mecanismo y que están mutados en los tumores del cáncer colorrectal hereditario no polipoide. Para determinar inestabilidad en microsatélites en tumores de pacientes portadores se emplean diversas técnicas, entre las que se encuentran polimorfismo de conformación de cadena simple y técnicas inmuno-histoquímicas. Estos datos son especialmente relevantes, ya que los tumores con MSI están asociados frecuentemente con infiltración linfocítica y sobreexpresión de PD-1 y PDL-1, y ya existen evidencias preliminares de ensayos clínicos fase I que muestran respuestas alentadoras de estos tumores cuando son tratados con anticuerpos monoclonales anti-PD-1, y sugieren que este subgrupo específico de pacientes podría beneficiarse de terapias inmunológicas ⁽⁷¹⁾.

Otros marcadores predictivos potenciales incluyen la amplificación de HER2, reordenamientos de ALK y ROS1 o amplificaciones cMET. Todos ellos podrían tener no solamente un papel en la resistencia primaria del tumor a las terapias anti-EGFR, sino que también representan una oportunidad para el desarrollo de terapias dirigidas. La amplificación de HER2 está presente en aproximadamente el 3% de los pacientes y en estos tumores ya se han observado respuestas a fármacos anti-HER2 en seres humanos ⁽⁷²⁾. Las translocaciones de ALK y la amplificación de cMET se han observado en una pequeña proporción de pacientes (1 y 2% respectivamente), pero ambas anomalías biológicas podrían predecir el éxito de terapias dirigidas frente a dichas dianas y existen en el momento diferentes líneas de investigación con estas terapias en CCR avanzado ⁽⁷³⁻⁷⁴⁾.

El otro fármaco con indicación en el tratamiento de primera línea del CCR avanzado es Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido frente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Este fármaco fue el primer inhibidor de la angiogénesis aprobado para el tratamiento del CCR avanzado en combinación con quimioterapia, y desde entonces ha habido una intensa búsqueda de marcadores moleculares capaces de predecir la respuesta y eficacia del fármaco. Lamentablemente no ha sido posible relacionar el éxito de esta terapia con ningún marcador molecular o característica clínica o patológica del paciente o el tumor. Por lo tanto, actualmente no es posible predecir de antemano qué pacientes se beneficiarán de Bevacizumab ⁽⁷⁵⁾. VEGFR-2/KDR es el principal receptor de la factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y con frecuencia se sobreexpresa en el CCR. Varios autores han relacionado esta sobre-expresión con un aumento significativo en la vasculatura del tumor y un aumento de la capacidad metastásica de los tumores ⁽⁷⁶⁾. La unión de VEGF a VEGFR-2/KDR conduce a la fosforilación y activación de una vía de señalización que estimula la proliferación, la migración y la inhibición de la apoptosis y la maduración de las células endoteliales y las estructuras vasculares ⁽⁷⁷⁾. VEGF es un regulador importante de la angiogénesis fisiológica y patológica, y se encuentra sobre-expresado en muchos tipos de tumores diferentes. Se ha descrito cómo la vía de señalización RAS aumenta la expresión de VEGF y reprime a los reguladores negativos de la angiogénesis, lo que sugiere que las aberraciones RAS podrían modular la respuesta del tumor a las terapias anti-angiogénicas ⁽⁷⁸⁾.

En los últimos años se han propuesto diversas clasificaciones del CCR basadas en la caracterización molecular del tumor con la intención de identificar subgrupos de

pacientes en función del pronóstico y la respuesta al tratamiento. En el año 2012, la red “The Cancer Genome Atlas” publicó una caracterización molecular del CCR, cuyos resultados fueron la base para el desarrollo racional de firmas moleculares posteriores ⁽⁷⁹⁾. Se identificó un grupo de pacientes (16%) con hipermutación genética, tres cuartos de los cuáles presentaban a su vez Inestabilidad de Microsatélites (MSI). Se observaron diferencias importantes en el perfil mutacional entre los subgrupos con y sin hipermutación genética (mayor frecuencia de mutaciones en el gen *TGFBR2* y menor frecuencia de mutaciones en los genes *P53* y *APC* en el subgrupo con hipermutación genética). Estos hallazgos indican que la progresión tumoral en ambos subgrupos de pacientes se produjo a través de una secuencia de eventos genéticos diferente.

De las firmas moleculares desarrolladas posteriormente destacamos dos de ellas. La primera, publicada por De Sousa y colaboradores, clasificó 90 pacientes con CCR estadio II en tres subtipos llamados CCS1 (“Colorectal Cancer Subtype”), CCS2 y CCS3. CCS1 se caracterizó principalmente por la ausencia de MSI, la ausencia de Fenotipo Metilador de Islas CpG (FMIC), la presencia de mutaciones en los genes *KRAS* y/o *P53* y localización izquierda predominante del tumor primario. El subtipo CCS2 reveló una fuerte asociación con la presencia de MSI, de FMIC+ y la localización derecha predominante del tumor primario. El subtipo CCS3 fue heterogéneo en lo que respecta a la estabilidad/inestabilidad de microsatélites, el estado del FMIC y la localización del tumor primario, y mostró una elevada tasa de mutaciones en los genes *KRAS* y *BRAF*. Los pacientes clasificados en este último subtipo mostraron peor pronóstico ⁽⁸⁰⁾.

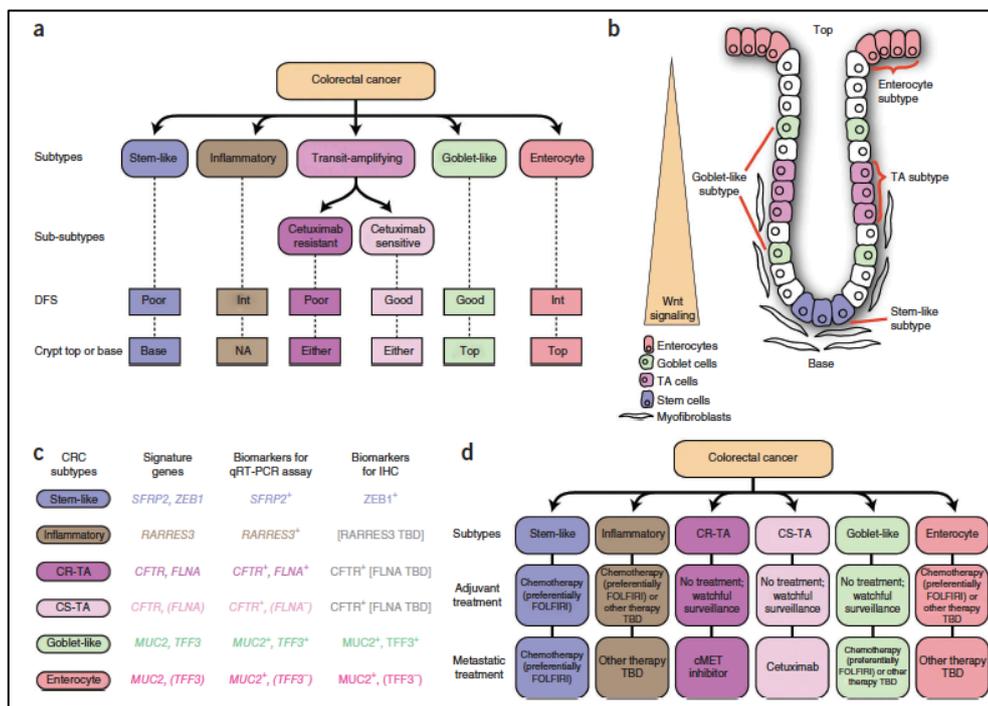
La segunda, publicada por Sadanandam y colaboradores, propuso seis subtipos moleculares que compartían importantes similitudes con los patrones de expresión de los diferentes subtipos celulares presentes en una cripta colónica normal ⁽⁸¹⁾. Los subtipos moleculares propuestos también mostraron diferencias significativas en el pronóstico (figura 2).

En un intento de resolver las diferencias entre las múltiples clasificaciones propuestas hasta el momento y facilitar su uso en la práctica clínica, en 2015 se publicó el consenso internacional de subtipos moleculares de CCR ⁽⁸²⁾, basado en las características comunes de los trabajos previos. Dicho consenso propone 4 subtipos moleculares con la siguiente nomenclatura: CMS1/IMS inmune; CMS2/Canónico;

CMS3/Metabólico y CMS4/Mesenquimal. En la figura 3 se detallan las principales diferencias biológicas entre los distintos subtipos moleculares. Un 13% de los tumores analizados presentan características combinadas, hecho que posiblemente representa un fenotipo de transición o indica heterogeneidad tumoral.

Desde una perspectiva biológica, dicha clasificación aporta un mayor conocimiento de los subtipos “no-MSI” que suponen un 85% de los CCRs y describe fuertes asociaciones moleculares. Aunque han emergido posibles marcadores genéticos y epigenéticos en los distintos subtipos propuestos, desde un punto de vista clínico todavía no está claramente establecido cuales son los marcadores más relevantes que permitan una predicción precisa del pronóstico y de la respuesta a los tratamientos disponibles. Sin embargo, una clasificación homogénea del CCR y un mejor conocimiento de los eventos moleculares principales implicados en el desarrollo y la progresión de la enfermedad nos permitirá avanzar en el desarrollo de nuevos tratamientos.

Figura 2: Sistema de clasificación de CCR asociado al fenotipo celular y la respuesta terapéutica.



a) Características de los 6 subtipos moleculares propuestos. b) Correlación del fenotipo de los subtipos propuestos con la localización de diferentes células que componen la cripta colónica. c) Biomarcadores candidatos en función del subtipo propuesto. d) Estrategias terapéuticas en función de los subtipos propuestos.

Figura 3: Propuesta de clasificación del CCR, reflejando las diferencias biológicas en la expresión genética entre los subtipos moleculares.

CMS1 MSI immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermutation	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

CIMP, CpG island methylator phenotype; MSI, microsatellite instability; SNA, somatic copy number alterations.

Las clasificaciones propuestas hasta el momento deben ser perfeccionadas ya que no todos los casos de CCR encajan perfectamente en uno de los subtipos. Por otra parte, son clasificaciones complejas de difícil implantación en la práctica clínica

4. Neovascularización Tumoral

La neovascularización es el mecanismo de formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor. Este proceso se inicia en etapas tempranas de la enfermedad, resultando clave en el crecimiento y diseminación tumoral. Tanto es así, que sin la formación de nuevos vasos sanguíneos, la carencia de oxígeno y nutrientes limita la expansión de la masa neoplásica a un tamaño de 1-2 mm ⁽⁵³⁾. La neovascularización tiene un efecto dual sobre el tumor. Por un lado, suministrar nutrientes y oxígeno, además de factores de crecimiento que estimulan el crecimiento de las células tumorales ⁽⁷⁸⁾. Por otro lado, junto con la linfangiogenesis, es un elemento esencial para la formación de metástasis al proveer un sitio de entrada a la circulación, permitiendo que las células que se desprenden del tumor viajen a través del torrente circulatorio, pudiendo llegar a órganos a distancia donde metastatizar ⁽⁸³⁾ La neovascularización puede darse mediante dos mecanismos: la vasculogénesis y la angiogénesis.

4.1 Vasculogénesis

La vasculogénesis se define como la formación de novo de vasos sanguíneos por diferenciación y ensamblaje de precursores de células endoteliales y otras células derivadas de médula ósea ⁽⁸⁴⁾. Este proceso ocurre en el desarrollo temprano del embrión, aunque hallazgos recientes muestran que bajo circunstancias específicas, las células precursoras (tanto de médula ósea como de la sangre) pueden contribuir también en la angiogénesis adulta ⁽⁸⁵⁾.

4.2 Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente en respuesta a estímulos, y es el mecanismo más estudiado y conocido. Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis: la fisiológica y la patológica. La primera, ocurre durante el crecimiento necesario de vasculatura que comienza en la embriogénesis y que continúa después del nacimiento en el desarrollo temprano postnatal, para proveer de manera adecuada el oxígeno y los nutrientes requeridos por los órganos en crecimiento, además de proporcionar señales morfológicas. A lo largo del crecimiento, así como en la etapa adulta, la velocidad de proliferación y renovación de las células endoteliales es muy baja. Las excepciones fisiológicas en las que se produce angiogénesis, bajo una estrecha regulación, ocurren únicamente en el ovario en mujeres menstruantes, debido a que el crecimiento folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo dependen de la proliferación de nuevos vasos capilares; en la placenta durante el embarazo y también en la reparación o cicatrización de heridas. El mecanismo fisiológico implica una estructura y funcionamiento jerárquico bien ordenado de la vasculatura corporal, con arteriolas, capilares y vénulas fácilmente distinguibles ⁽⁸⁶⁾.

Por el contrario, la angiogénesis patológica se caracteriza por un crecimiento descontrolado y desordenado de la vasculatura y aparece cuando hay un desequilibrio entre los estimuladores e inhibidores angiogénicos. Los vasos tumorales se desarrollan a menudo en haces desorganizados que contienen numerosos brotes y el diámetro de la luz del vaso es irregular. Debido a la organización anormal y a la estructura de los vasos tumorales, el flujo sanguíneo en los tumores es caótico ⁽⁸⁷⁾. La primera descripción de este proceso la realizó Judah Folkman en los años 70 ⁽⁸⁸⁾.

El desarrollo tumorogénico implica la expresión de un fenotipo angiogénico, en el que la suma de las actividades de las moléculas expresadas y secretadas permitan inducir el proceso de angiogénesis. Las células tumorales pueden sobreexpresar uno o más reguladores positivos de la angiogénesis, movilizar una proteína angiogénica de la matriz extracelular, reclutar células huéspedes como los macrófagos (que producen sus propias proteínas angiogénicas) o pueden combinarse todos estos procesos. La angiogénesis tumoral está mediada por factores de crecimiento secretados por el tumor que interactúan con sus receptores expresados en la superficie de las células endoteliales. La sobreexpresión de un factor angiogénico no es suficiente por sí misma para inducir la angiogénesis tumoral, ya que algunos reguladores negativos o inhibidores del crecimiento vascular deberán también estar infraexpresados. Por tanto, la inducción del fenotipo angiogénico está regulada por un cambio en el equilibrio local entre reguladores positivos y negativos del crecimiento de vasos ⁽⁸⁹⁾. La magnitud y calidad de la respuesta angiogénica tumoral está determinada específicamente por la suma de las señales pro y antiangiogénicas en múltiples tipos celulares. Se denomina “interruptor angiogénico” a la transición de la fase latente a la fase invasiva de un tumor maligno, y representa un paso fundamental en el desarrollo del tumor que puede ocurrir en diferentes etapas de la progresión tumoral, dependiendo de la naturaleza del tumor y su microambiente. La combinación de señales estimuladoras dentro del microambiente tumoral provoca cambios en múltiples tipos de células ⁽⁹⁰⁾.

La activación de la angiogénesis se inicia con el incremento de la permeabilidad vascular de los vasos preexistentes, en respuesta a factores estimuladores como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF) o la angiopoyetina 1 (ANG-1). Esto va acompañado del desprendimiento de las células perivasculares de los vasos sanguíneos maduros, lo cual se debe principalmente a la función de la angiopoyetina 2 (ANG-2) y su receptor TIE2 (receptor TK selectivamente expresado en las células endoteliales). Este fenómeno posibilita la extravasación de proteínas plasmáticas que establecen una matriz provisional en la que las células endoteliales activadas migran. La membrana basal y la matriz extracelular son localmente degradadas por metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), permitiendo que las células endoteliales subyacentes migren al espacio perivascular, atraídas por los estímulos angiogénicos que producen las células tumorales y el microambiente. Varios tipos de células se exponen a los estímulos angiogénicos e inflamatorios que intensifican la respuesta. Las plaquetas

son reclutadas a los sitios de membrana basal expuesta, donde se activan y liberan múltiples factores de crecimiento al microambiente, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el VEGF, el factor de crecimiento transformante (TGFA y TGFB1), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) y ANG-1. Estos factores estimulan la proliferación y migración endotelial, así como la formación del tubo. Las células endoteliales progenitoras y las células mieloides de médula ósea migran hacia los tejidos en el proceso angiogénico, gracias a señales quimiotácticas debidas a la liberación de factores solubles a nivel local. Además, las células madre tumorales pueden diferenciarse para convertirse en células endoteliales y las células tumorales pueden participar físicamente en la formación de nuevos vasos a través de mimetismo vascular ⁽⁹¹⁾.

Como consecuencia de los estímulos angiogénicos, las células endoteliales proliferan formando una columna migratoria en el espacio perivascular, guiadas presumiblemente por los pericitos, y se adhieren entre sí para crear un lumen. Finalmente, los nuevos vasos sanguíneos en formación deben estabilizarse o madurar. El proceso de estabilización vascular se rige por ANG-1 y su receptor TIE2. La unión de ANG-1 a TIE2 en las células endoteliales activadas conduce a la producción de PDGF y al reclutamiento de células musculares lisas y pericitos que recubren la nueva membrana basal. Sin embargo, en la vasculatura tumoral el recubrimiento de pericitos disminuye o es inadecuado, existen fenestraciones y huecos transcelulares, la membrana basal es incompleta y además, las paredes de los vasos sanguíneos tumorales pueden estar formadas tanto por células endoteliales como tumorales, lo que explica que se presenten diámetros irregulares y anomalías estructurales ⁽⁹²⁾. La angiogénesis no participa en la carcinogénesis en sí, pero sí promueve la progresión tumoral ⁽⁹³⁾ y es un elemento esencial para la formación de metástasis al proveer un sitio de entrada a la circulación.

Debido a la importancia de este proceso en el crecimiento y progresión tumoral, la angiogénesis ha sido foco de intensos estudios en los últimos años, incluyendo también el desarrollo de agentes farmacológicos que la inhiben como una atractiva diana antitumoral.

4.3 Linfangiogénesis

La linfangiogénesis representa el proceso de formación de nuevos vasos linfáticos a partir de los ya existentes y resulta relevante en la formación de metástasis. La

vasculatura linfática consiste en una capa fina de endotelio poco recubierto de pericitos o células musculares lisas vasculares, y su función fisiológica consiste en recoger líquido extravasado, macromoléculas y leucocitos y transportarlos hacia los ganglios linfáticos regionales para proceder a la vigilancia inmunitaria y, en último término, efectuar su transporte hacia la circulación. En adultos, el crecimiento de los vasos linfáticos parece deberse principalmente al proceso de brotado de nuevos vasos linfáticos a partir de los ya preexistentes. La linfangiogénesis es un proceso complejo, controlado por muchos factores producidos por distintos tipos de células y cuyo resultado funcional puede depender del efecto combinado de todos ellos ⁽⁹⁴⁾. Igual que sucede en la vasculatura sanguínea, los vasos linfáticos de la mayoría de los tejidos y órganos del adulto se mantienen quiescentes en condiciones fisiológicas, y es en respuesta a la señales del crecimiento cuando tienen que proliferar, migrar y formar una vasculatura madura y funcional. A diferencia del endotelio del vaso sanguíneo, los vasos linfáticos contienen una membrana basal incompleta que podría degradarse para exponer las células endoteliales a los mitógenos, aunque no se conoce demasiado sobre el proceso de degradación de la membrana basal y de los sucesos de ramificación de los vasos linfáticos en crecimiento ⁽⁹⁵⁾.

La diseminación de las células tumorales desde el tumor primario hacia otros órganos puede tener lugar a través de los vasos sanguíneos y también a través de las redes linfáticas. De hecho, el mecanismo más común por el que se genera la metástasis consiste en la propagación de las células neoplásicas dentro de los vasos linfáticos. Se ha propuesto que la entrada de las células cancerosas en los vasos linfáticos podría estar facilitada por su mayor permeabilidad en comparación con los vasos sanguíneos y por la ausencia de una barrera de la membrana basal normal ⁽⁹⁶⁾. El estudio del desarrollo de las redes linfáticas es un campo de creciente interés en oncología y ha tomado gran envergadura dentro de la investigación en angiogénesis ⁽⁹⁷⁾. Inicialmente, la mayoría de estudios se focalizaban en el tumor primario en crecimiento y tejidos adyacentes, proceso conocido como “linfangiogénesis tumoral”. Sin embargo, también se ha observado linfangiogénesis alrededor de los nódulos linfáticos, en particular de los ganglios centinelas, donde inicialmente metastatiza el tumor, y esto se conoce como “linfangiogénesis de nódulos linfáticos” ⁽⁹⁸⁾. Evidencias recientes indican que las células tumorales pueden inducir linfangiogénesis de nódulos linfáticos, aún antes de metastatizar, y que las células tumorales metastásicas continúan induciendo el crecimiento de vasos linfáticos en los ganglios centinela,

teóricamente promoviendo su futura diseminación metastásica ⁽⁹⁹⁾, por lo que el estudio en profundidad de los mecanismos moleculares involucrados en este tipo de procesos, genera gran expectativa como posibles nuevas dianas de acción terapéutica.

5. Factores estimuladores e inhibidores de la angiogénesis y linfangiogénesis.

5.1 Factores estimuladores e inhibidores de la angiogénesis y linfangiogénesis.

La hipoxia es uno de los principales factores implicados en la progresión tumoral, ya que regula la angiogénesis. Aunque se han reportado varios factores de transcripción involucrados en la respuesta al estrés hipóxico, como la Proteína de Activación 1 (AP-1) o el Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B), el Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1) es el inductor más potente. HIF-1 es un activador transcripcional heterodimérico compuesto por una subunidad α (HIF-1A) y una subunidad β (HIF-1B) ⁽¹⁰⁰⁾. La síntesis de HIF-1A está regulada por la activación de las vías de PI3K y MAPK, las cuales pueden ser activadas por la señalización a través de receptores TK, receptores no TK o receptores acoplados a proteína G. En condiciones de normoxia, la enzima prolin 4-hidroxilasa (PHD) se une al oxígeno molecular e hidroxila residuos de prolina en HIF-1A. HIF-1A hidroxilado es reconocido por la proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau (VHL), es ubiquitinilado por ésta y rápidamente degradado a través de la vía del proteosoma. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, se inhibe la hidroxilación de HIF-1A, de manera que éste se estabiliza y no es reconocida por VHL, lo que permite la formación del heterodímeros α/β , que actúa activando la transcripción de más de 40 genes implicados en la proliferación celular, angiogénesis y respuesta metabólica a estrés metabólico. La hipoxia regula la angiogénesis a través de un aumento de HIF-1A, que inicia un programa de supervivencia y expresión génica adaptativa. Entre los genes activados por HIF-1, los cuales contienen en la región promotora un elemento de respuesta a hipoxia (HRE), hay muchos que codifican para proteínas involucradas en metabolismo de glucosa, proliferación celular, supervivencia, apoptosis, invasión, metástasis y angiogénesis, y entre ellos destaca VEGF. La activación de genes vía hipoxia, tiene como finalidad incrementar el aporte de oxígeno o la adaptación metabólica a la hipoxia. HIF-1A se encuentra sobre-

expresado en cánceres humanos como resultado de la hipoxia intratumoral, así como por alteraciones genéticas ⁽¹⁰⁰⁾.

5.2 Adaptación metabólica celular a condiciones anaerobias. Papel de Lactato Deshidrogenasa 5 (LDH5)

Las condiciones de hipoxia a las que el tumor se ve sometido hacen que uno de los fenómenos más importantes para conseguir su adaptación y crecimiento sea la producción de proteínas que permitan a la célula obtener ATP en condiciones anaeróbicas. Esto lo consigue activando la vía de la Glicólisis, consistente en la transformación de Piruvato a ácido láctico a través de la actividad catalítica de diferentes enzimas, entre las que destaca la Lactato Deshidrogenasa 5 (LDH-5) ⁽¹⁰¹⁾. Es importante resaltar que la sobreexpresión de HIF-1a y LDH5 se observa en los tumores malignos humanos, pero sólo en el componente canceroso. LDH5 es inhibido en el estroma del tumor, que a menudo sobreexpresa la isoenzima LDH1 favoreciendo la oxidación de ácido láctico de nuevo a piruvato. Estas observaciones representan un nuevo concepto en el que las células tumorales, su estroma y los vasos asociados a un tumor no deben ser vistos como un dominio de morfología unificada, sino como dominio funcional con una verdadera cooperación entre metabolismo anaerobio (células cancerosas) y compartimentos aeróbicos (fibroblastos formados y neovasos) ⁽¹⁰²⁾. Si esta estructura funcional organizada es una característica necesaria para la supervivencia de las células cancerosas es una hipótesis aún en estudio, tanto más cuando la manipulación del metabolismo de los tumores puede conducir a nuevos enfoques terapéuticos.

5.3 Familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

Actualmente se reconoce al sistema que incluye al VEGF y sus receptores como el principal regulador de los procesos angio y linfangiogénicos. Esta familia incluye cinco ligandos descritos en humanos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y Factor de crecimiento placentario (PlGF); y dos ligandos más, VEGF-E, descrito solamente en Orf virus y VEGF-F, aislado en el veneno de ciertas víboras. Cada una de estas proteínas contiene una secuencia señal que se escinde durante la biosíntesis. Además, el procesamiento alternativo (splicing) de sus correspondientes pre-ARNs genera múltiples isoformas de VEGF-A, VEGF-B y Plaf ⁽⁹⁶⁾. El proceso de señalización se encuentra mediado por uniones de alta afinidad de los ligandos con receptores

específicos que tienen actividad TK intrínseca. Hasta hoy, se conocen tres receptores, relativamente específicos de las células endoteliales. Estos son: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, (originalmente denominados FLT-1, KDR y FLT-4, respectivamente) ⁽⁸⁶⁾. En adultos, los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 se expresan principalmente en el endotelio vascular, mientras que el VEGFR-3 se limita en gran medida al endotelio linfático.

El VEGF activo está compuesto por dos subunidades idénticas y la unión a su receptor es mediada por el homodímero a través de la unión del núcleo de la proteína. Los receptores son dímeros anclados a la superficie de las células endoteliales. Cada una de las subunidades tiene siete dominios homólogos a inmunoglobulina en su parte extracelular (región de reconocimiento/unión de ligandos), un dominio transmembrana y un dominio intracelular de señalización con una inserción Quinasa ⁽¹⁰³⁾. La dimerización del receptor tiene lugar en condiciones normales en respuesta a la unión de ligando y se produce auto/transfosforilación, desencadenando una cascada de señalización en la que se fosforilan distintas proteínas que regulan finalmente los mecanismos involucrados en la angio y linfangiogénesis ⁽¹⁰⁴⁾. La sobreexpresión de receptores y ligandos o las mutaciones en los genes que codifican para moléculas receptoras pueden causar alteraciones en la estructura de la proteína que puede producir la activación independiente de ligando. Algunas alteraciones drásticas en la estructura del receptor pueden dar lugar incluso a receptores truncados solubles, consistentes únicamente en el dominio extracelular, que no serían activos en la transducción de señales, pero que sí son capaces de captar ligando, que no estaría de este modo disponible para unirse a receptores en la membrana, y por lo tanto tendrían efectos anti-angiogénicos ⁽¹⁰⁵⁾.

Ligandos VEGF

VEGF-A es el mayor mediador de la angiogénesis tumoral y normalmente es nombrado como VEGF. Fue identificado en los años 80 como un factor de permeabilidad vascular (VPF) y como un factor de crecimiento específico de las células endoteliales vasculares. Está codificado por el gen VEGF, por lo que ha sido referido como VEGF o VPF. El grupo de Senger fue el primero en purificar parcialmente esta proteína en 1983 ⁽¹⁰⁶⁾, aunque hasta 1989 no fue aislada completamente por los grupos de Ferrara ⁽¹⁰⁷⁾ y Connolly ⁽¹⁰⁸⁾. VEGF-A es ligando tanto del VEGFR-1 como del VEGFR-2, teniendo una afinidad por VEGFR-1

aproximadamente 10 veces mayor, pero debido a que sus propiedades de transducción de señal son menores, la señal de VEGF-A se produce mayoritariamente a través de VEGFR-2/KDR ⁽¹⁰⁸⁾. La expresión de VEGF-A está regulada por la hipoxia a través del factor inducible por hipoxia (HIF-1), elemento clave mediador de las respuestas hipóxicas. Además de la hipoxia, otras vías de regulación de VEGF-A incluyen: factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias, hormonas y oncogenes ⁽¹⁰⁹⁾. La expresión in vivo de VEGF-A ha sido asociada con los principales pasos en la angiogénesis y vasculogénesis fisiológicas. Los experimentos en ratones han demostrado que la supresión del gen VEGF-A es letal, ya que resulta en defectos vasculares y anomalías cardiovasculares; mientras que la sobreexpresión genera abundante angiogénesis y psoriasis en la piel y acelera el crecimiento tumoral ⁽¹¹⁰⁾. En humanos, VEGF-A se expresa en prácticamente la totalidad de los tumores sólidos estudiados, así como en algunas enfermedades hematológicas ⁽¹¹¹⁾.

El gen humano de VEGF-B contiene ocho exones y seis intrones y se encuentra localizado en el cromosoma 11. La región promotora de VEGF-B es diferente respecto a la de VEGF-A, lo que podría explicar las diferencias en su regulación por estímulos fisiológicos, ya que pierde los dominios de interacción con HIF-1, impidiendo de este modo la regulación del gen por la hipoxia. VEGF-B es ligando del VEGFR-1 y NRP-1, pero no de VEGFR-2 o VEGFR-3. La activación de su receptor induce una señal mitogénica pobre en las células endoteliales. Por otro lado, VEGF-B puede formar heterodímeros con VEGF-A, lo que podría representar un mecanismo para modular la liberación y disponibilidad de VEGF-A ⁽¹¹²⁾. Actualmente no se conoce claramente cuál es el papel de VEGF-B in vivo, aunque su función parece estar ligada al metabolismo energético de la célula. In vitro se ha observado que la ausencia de VEGF-B afecta a la arteriogénesis, a la respuesta pulmonar en condiciones de hipoxia y a la angiogénesis en procesos inflamatorios como la artritis ⁽¹¹³⁾.

El gen de VEGF-C se encuentra en el cromosoma 4 y consta de 7 exones. VEGF-C se produce como un precursor proteico y requiere procesamiento postraduccional. Se activa proteolíticamente en el espacio extracelular para generar una proteína homodimérica sin uniones disulfuro con alta afinidad por VEGFR-2 y VEGFR-3 ⁽¹¹⁴⁾. Tanto las formas maduras de VEGF-C como las parcialmente procesadas se unen al VEGFR-3 con gran afinidad, participando de forma importante en la regulación de la linfangiogénesis; mientras que sólo las formas completamente procesadas se unen al VEGFR-2 ⁽⁹⁷⁾. VEGF-C es un potente factor de permeabilidad e induce la mitogénesis,

migración y supervivencia de las células endoteliales. Se encuentra expresado en corazón, intestino delgado, placenta, ovario y glándula tiroidea en adultos. La actividad de VEGF-C se ha observado preferentemente en la regulación de la linfangiogénesis en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento del endotelio linfático en adultos. Además, VEGF-C también está implicado en la regulación de la linfangiogénesis y el control de la función inmune en procesos inflamatorios y tumorales ⁽⁹²⁾.

VEGF-D es una glicoproteína secretada que estructuralmente tiene un 48% de homología con VEGF-C. El gen de VEGF-D humano se encuentra en el cromosoma X y contiene siete exones. Del mismo modo que VEGF-C, VEGF-D se sintetiza primeramente como una proteína precursora que se activa mediante procesamiento proteolítico de los extremos N-terminal y C-terminal. Aunque la forma precursora se une a VEGFR-3, importante en linfangiogénesis, la forma madura se une y activa tanto a VEGFR-2 como a VEGFR-3 ⁽¹¹⁴⁾. VEGF-D se ha encontrado expresado en multitud de tejidos incluyendo el endotelio vascular, corazón, músculo esquelético, pulmón e intestino. Induce la proliferación de las células endoteliales y muestra propiedades angiogénicas in vitro e in vivo ⁽¹¹⁴⁾. Por tanto, VEGF-C y VEGF-D son elementos esenciales para el desarrollo del sistema linfático y pueden inducir la angiogénesis y aumentar la permeabilidad vascular. VEGF-D parece tener un papel importante en la angiogénesis y linfangiogénesis tumoral, y su expresión se correlaciona con metástasis de nódulos linfáticos en cáncer colorrectal, pulmón y ovario, por lo que puede representar una potencial diana anticancerosa y antimetastásica ⁽⁹²⁾.

El factor de crecimiento placentario (PlGF) es un miembro de la familia de VEGF que fue identificado por primera vez en la placenta, pero también se conoce que es expresado en corazón y pulmón, así como en diversas condiciones patológicas que incluyen el cáncer colorrectal y CPNM. El gen humano de PlGF se localiza en el cromosoma 14 y está codificado por siete exones. Se han descrito cuatro isoformas generadas por procesamiento alternativo, que son PlGF-1 (PlGF131), PlGF-2 (PlGF152), PlGF-3 (PlGF203) y PlGF-4 (PlGF224) que difieren además de en el tamaño, en las propiedades de secreción y afinidad de unión. PlGF-1 y PlGF-3 son isoformas que no se unen a heparina y difunden libremente, mientras que PlGF-2 y PlGF-4 tienen dominios de unión a heparina ⁽¹¹⁵⁾. PlGFs median su efecto a través de la unión al VEGFR-1. PlGF-2 es capaz de unirse también a NRP-1 y NRP-2. La contribución de PlGF a la angiogénesis se produce a través de varios mecanismos:

por acción directa sobre las células endoteliales a través de la unión a VEGFR-1, por desplazamiento de VEGF-A del VEGFR-1, permitiendo así que VEGF-A active a VEGFR-2, a través de la estimulación vía VEGFR-1, que a su vez resulta en aumento de la sensibilidad de la acción de VEGF-A a través de VEGFR-2, mediante el reclutamiento de monocitos y macrófagos que desempeñan un papel fundamental en el crecimiento de los vasos y, finalmente, a mediante la movilización de las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea. Además, parece que Plaf también podría actuar inhibiendo la angiogénesis mediante la formación de heterodímeros PIGF/VEGF, ya que los análisis comparativos de la actividad mitogénica muestran que el heterodímero PIGF/VEGF es menos potente que las formas homodiméricas, por lo que podría representar un mecanismo para modular la disponibilidad de VEGF-A ⁽¹¹⁶⁾.

Receptores de VEGF

VEGFR-1 (también conocido como Flt-1, fms-like tyrosine kinase) fue el primer receptor identificado de alta afinidad para VEGF. Es una glicoproteína transmembrana codificada en el cromosoma 13 y que contiene 30 exones ⁽⁹²⁾. Se encuentra expresado en células endoteliales, así como en pericitos, placenta, trofoblastos, osteoblastos, monocitos, macrófagos, células renales y algunas células madre hematopoyéticas ⁽⁹⁴⁾. VEGFR-1 se une con alta afinidad a los ligandos VEGF-A, VEGF-B y PIGF. Tiene mayor afinidad por VEGF-A que VEGFR-2 (aproximadamente 10 veces superior), pero por el contrario tiene una actividad de fosforilación TK más débil tras ser estimulado. También puede formar heterodímeros con VEGFR-2, con mayores propiedades de señalización. La activación de VEGFR-1 promueve la angiogénesis y se ha asociado con la quimiotaxis de monocitos y el reclutamiento y supervivencia de las células progenitoras derivadas de médula ósea. La expresión de VEGFR-1 se encuentra aumentada en condiciones de hipoxia, a diferencia del VEGFR-2 y VEGFR-3 ⁽⁹²⁾.

VEGFR-2 o KDR (Flk-1/KDR, Fetal liver kinase-1/Kinase Domain-containing Receptor) fue el segundo receptor de VEGF en ser identificado, codificado en el cromosoma 4. Se une con alta afinidad a VEGF-A y a formas maduras del VEGF-C y VEGF-D. Únicamente la forma glicosilada final de VEGFR-2 es capaz de autofosforilarse en respuesta a VEGF, siendo el principal transmisor de señales e induciendo vasodilatación, proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales. Aunque tiene menor afinidad por VEGF-A que VEGFR-1, exhibe una robusta actividad

TK en respuesta a la unión del ligando. Este receptor se encuentra principalmente expresado en las células endoteliales, además de en células madre hematopoyéticas, megacariocitos y células progenitoras retinales⁽⁹⁴⁾. Igual que en el caso de VEGFR-1, se ha descrito una forma soluble y circulante para VEGFR-2 (sVEGFR-2). Esta isoforma truncada, que mantiene la afinidad de unión a ligando pero no puede activar la cascada de señalización ya que carece de dominio TK, puede tener implicaciones en la regulación de la angiogénesis⁽¹¹⁶⁾.

VEGFR-3 (Flt-4, fms-like tyrosine kinase 4) es una glicoproteína codificada en el cromosoma 5 que presenta solamente seis dominios de Ig, al ser liberado el quinto dominio proteolíticamente tras su biosíntesis y las cadenas resultantes unidas mediante puentes disulfuro. Existen dos isoformas de este receptor generadas por procesamiento alternativo, que difieren en el dominio C-terminal⁽¹¹⁴⁾. VEGFR-3 se encuentra presente en todo el endotelio durante el desarrollo embrionario, sin embargo, en el tejido adulto se encuentra restringido a las células endoteliales del endotelio linfático y a ciertas células endoteliales de las fenestraciones del endotelio vascular. Además, en condiciones patológicas también se encuentra aumentado en las células del endotelio vascular de los tumores. VEGFR-3 y sus ligandos, VEGF-C y VEGF-D, están involucrados principalmente en la linfangiogénesis y también en la angiogénesis⁽¹¹²⁾.

6. Biomarcadores

Un biomarcador ha sido definido como una característica que es por un lado objetivamente medible y por otro, evaluable como indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o una respuesta farmacológica/farmacodinámica frente a determinada intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden dividirse en tres tipos fundamentales:

1. Biomarcadores diagnóstico, entendidos como marcadores tumorales.
2. Biomarcadores pronóstico, que se describen como aquellas características del paciente o del tumor que son indicativas de la biología del tumor y se correlacionan con el pronóstico del paciente sin tener en cuenta el tratamiento, representando el efecto del tumor sobre el paciente.
3. Biomarcadores predictivos, referidos como aquellas características del paciente o del tumor que pueden dar alguna información acerca de si el paciente se puede

beneficiar de un tratamiento dado, por tanto representan el efecto del tratamiento en el tumor ⁽¹¹⁷⁾.

En la práctica clínica de rutina en oncología las características de los pacientes tales como el estado funcional (ECOG-PS), el estadio de la enfermedad, el tipo histológico y otros exámenes de laboratorio son evaluados como marcadores que se asocian con el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Los recientes avances en biología molecular y las diversas tecnologías avanzadas incluyendo la farmacogenómica, la transcriptómica, la proteómica, la metabolómica y el diagnóstico molecular por imagen, se han introducido también en el ámbito clínico y pueden ofrecer un diagnóstico más precoz, la caracterización precisa del tipo histológico y una visión más acertada del pronóstico de la enfermedad y de la respuesta al tratamiento ⁽¹¹⁸⁾. Es importante también remarcar que un biomarcador ideal debería ser detectable con el material clínico accesible, y es por ello que existe un creciente interés en el desarrollo de métodos no invasivos o mínimamente invasivos.

6.1 Biomarcadores de angiogénesis y linfangiogénesis

Numerosos estudios han investigado la relación entre los niveles de diversos marcadores angiogénicos con características clínico-patológicas y la supervivencia de los pacientes con cáncer.

Biomarcadores en tejido

El uso de VEGF en tejido como marcador predictivo se ha evaluado en varios estudios con resultados discordantes ^(119, 120, 121, 122). Algunos estudios encuentran que la expresión tisular de VEGF si se correlaciona con el pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal avanzado. Por ejemplo, Tsai et al compararon la expresión pre y post-tratamiento de VEGF por inmunohistoquímica en 57 pacientes con cáncer colorrectal metastásico que se sometieron a tratamiento con 5- fluorouracilo (5-FU) e Irinotecan (régimen FOLFIRI) combinado con bevacizumab; sus resultados indicaron que la disminución de la expresión de VEGF tras el tratamiento se asociaba de forma significativa con la respuesta al tratamiento y la supervivencia libre de progresión (SLP) ⁽¹²¹⁾. Por otro lado, Jubb et al evaluaron 312 muestras de tejido de 813 pacientes incluidos en un ensayo clínico fase III que comparaba la eficacia de FOLFIRI con o sin bevacizumab . En esta serie, los niveles epiteliales y estromales de

VEGF, analizados por técnicas de hibridación in situ, no se resultaron ser predictivos de la eficacia del tratamiento ⁽¹²²⁾.

La sobreexpresión de la forma activada de VEGFR-2 (pKDR), medida mediante técnicas de inmunohistoquímica, es un fenómeno que ocurre muy frecuentemente en los carcinomas colorrectales, especialmente en tumores grandes (mayores de 6 cm) e indiferenciados, y su presencia se correlaciona con la sobreexpresión tanto de VEGF y HIF α , como con el aumento de la densidad vascular ⁽¹²³⁾, y de la capacidad de proliferación celular y producción de metástasis ⁽¹²⁴⁾. La sobreexpresión de VEGFR/pKDR ha sido asociada con un peor pronóstico en pacientes con CCR en estadios iniciales sometidos a cirugía ⁽¹²⁵⁾ y se ha sugerido como un potencial marcador del proceso de angiogénesis y candidato a biomarcador de eficacia de tratamientos antiangiogénicos.

Otro biomarcador de angiogénesis medible en tejido es Lactato deshidrogenasa 5 (LDH5). LDH5 es una de las cinco isoenzimas de la familia LDH, aparentemente la más importante en la promoción de la glicólisis anaerobia. Se trata de una proteína que cataliza la transformación reversible de piruvato a lactato, lo que la coloca en una posición central dentro del metabolismo anaeróbico celular ⁽¹²⁶⁾. La inducción de la LDH-5 se produce durante la hipoxia, y su transcripción está regulada directamente por el factor de inducible por hipoxia 1 (HIF1). Los niveles séricos de LDH se han correlacionado con mal pronóstico y la resistencia a la quimioterapia y radioterapia en varias enfermedades neoplásicas, y la sobreexpresión de LDH5 medida por inmunohistoquímica ha sido relacionada con un peor pronóstico en pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal, pulmonar, gástrico o endometrial ^(127, 128, 129, 130). Koukouradkis et al, encontraron que la sobreexpresión de LDH5 no sólo se comportaba como un factor pronóstico negativo para los pacientes con CCR avanzado, sino que observaron que además estaba asociada con una peor respuesta al tratamiento de quimioterapia basados en Oxaliplatino y Fluoropirimidinas, proponiendo dicha sobreexpresión como un potencial marcador predictivo negativo de la eficacia de la quimioterapia ⁽¹²⁹⁾. Además, en el mismo estudio objetivaron que el tratamiento con un fármaco antiangiogénico (Vatalanib) revertía el impacto pronóstico negativo de la expresión de LDH5 ⁽¹²⁹⁾.

Biomarcadores circulantes

El valor de los niveles séricos de VEGF ha sido ampliamente estudiados como posible biomarcador. Representa una estrategia atractiva para los estudios de investigación debido a la facilidad de adquisición de muestras permitiendo mediciones seriadas a lo largo del tiempo. Los niveles circulantes de VEGF han sido relacionados con el pronóstico de diferentes tumores sólidos, lo que sugiere que puede ser un indicador de la angiogénesis tumoral ⁽¹³¹⁾. Sin embargo, el valor predictivo de VEGF y/o de los cambios en los niveles de VEGF durante o después del tratamiento con bevacizumab sigue siendo un tema de debate, ya que no se ha podido establecer la su relación con la eficacia del fármaco.

Las células tumorales circulantes (CTC) y la detección de ácidos nucleicos libres (cTNA) en sangre periférica representan una estrategia atractiva para el diagnóstico y evaluación de respuesta en pacientes con CCR, así como para predecir el pronóstico de los pacientes y los resultados del tratamiento ^(131,132). El recuento de CTCs por la plataforma SearchTM celular (Veridex LLC), está actualmente aprobado por la FDA para su uso clínico en el CCR, el cáncer de mama y cáncer de próstata, y es el más ampliamente utilizado. Existe además un interés creciente en la detección de CTNA (ADN o ARN) que puedan reflejar la presencia de CTCs. Diehl et al, demostraron que por cada 100 g de tumor, 3,3 g de ADN-tumoral podría entrar en la corriente sanguínea ⁽¹³²⁾. El ADN circulante el tumor puede dar una idea de las alteraciones genéticas y epigenéticas, además de ser útil para el diagnóstico y la predicción de la respuesta a la terapia. La evidencia preliminar sugiere que los niveles de CTCs puede tener tanto valores pronósticos como predictivos de respuesta en pacientes con CRC avanzado ⁽¹³³⁾. Esta tecnología es prometedora, pero sigue teniendo varias limitaciones. La tasa mediana de detección de CTC es del 35%, y además la tecnología CellSearch requiere la verificación subjetiva de CTCs, no permitiendo el análisis unicelular. A pesar de todo ello, la medición de niveles de CTCs representa un biomarcador prometedor para la predicción de la respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer.

Otros biomarcadores solubles en estudio son los MicroRNA (miRNA). Pequeñas cadenas no codificantes de RNA que pueden regular la expresión de múltiples genes a nivel postranscripcional. Están involucradas por tanto en diversas funciones celulares, incluyendo la proliferación, apoptosis, regulación de stem-cells embrionarias

e invasión. Algunos estudios recientes han demostrado que los miRNAs circulantes son muy estables, lo que les convierte en un potencial biomarcador en cancer ⁽¹³⁴⁾. Los miRNAs pueden modular la angiogénesis tumoral a través de la modulación de la expresión de factores pro y anti-angiogénicos, incluyendo la proteína de señalización RTK, HIF, VEGF y EGF. La implicación de los miARN en la angiogénesis tumoral, ha generado interés en explorar su utilidad como biomarcadores predictivos. miRNA-126 es uno de los más estudiados en CCR avanzado ⁽¹³⁵⁾. La alta expresión de los genes miARN-126 se asocia con un aumento de la señalización de VEGF-A en las células endoteliales y por lo tanto podría un biomarcador prometedor para la terapia antiangiogénica.

II. OBJETIVOS

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo de investigación es contribuir a un mayor conocimiento sobre la expresión de VGFR2/pKDR (marcador relacionado con los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis) y LDH5 (marcador relacionado con el proceso de adaptación metabólica a hipoxia celular) en pacientes con CCR avanzado. Se estudiará la relación entre la expresión de dichos marcadores con las características clínico-patológicas de los pacientes y evaluaremos su utilidad como biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento en esta patología.

Objetivos primarios

1. Cuantificar los niveles de expresión de VGFR2/pKDR y LDH5 en pacientes afectados por CCR avanzado y analizar la correlación entre la expresión de estas proteínas con las características clínico-patológicas y moleculares de dichos pacientes.
2. Estudiar la correlación entre la expresión de VGFR2/pKDR y LDH5 con el pronóstico de los pacientes en términos de Supervivencia Global (SG) y Supervivencia Libre de Progresión (SLP), así como con la eficacia del tratamiento en términos de Tasa de Respuesta (TR).

Objetivos secundarios

1. Estudiar la correlación entre la existencia de mutaciones en los genes de la familia RAS (KRAS y NRAS) con el pronóstico de los pacientes con CCR avanzado, y su papel como predictor de respuesta al tratamiento con quimioterapia y Bevacizumab.
2. Identificar los factores Clínico-patológicos y moleculares asociados a peor pronóstico en pacientes con carcinoma de colon avanzado con metástasis irresecables, tratados con quimioterapia de primera línea con Oxaliplatino y Fluoropirimidinas, con o sin Bevacizumab.

III. METODOLOGIA

Estudio retrospectivo y multicéntrico de pacientes diagnosticados de CCR avanzado y tratados con quimioterapia de primera línea con Fluoropirimidinas y Oxaliplatino, asociados o no a Bevacizumab entre Enero-2009 y Diciembre-2013 en cuatro hospitales de la Comunidad Valenciana: Hospital Marinasalud de Denia, Hospital Arnau de Vilanova de Valencia, Hospital de Sagunto y Hospital de Elda.

1. Población de estudio

Característica de los Pacientes

Se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes que cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- Confirmación Histológica de Adenocarcinoma de Colon o Recto.
- Enfermedad avanzada (Estadio IV) en el momento del diagnóstico.
- No candidatos a cirugía de resección de metástasis en el momento del diagnóstico.
- Haber sido tratados con quimioterapia de primera línea con los esquemas que incluyese combinación de Oxaliplatino con Fluoropirimidinas intravenosa u oral (FOLFOX o XELOX), en combinación o no con Bevacizumab.
- Disponibilidad de tejido tumoral archivado para estudio Inmunohistoquímico, procedente del tumor primario o de alguna localización metastásica.

Variables Clínicas

La evaluación incluyó revisión de historia clínica completa, con medidas basales de la enfermedad tumoral previa al inicio del tratamiento. El diagnóstico y la evaluación del tratamiento se realizaron con TAC. Hemos recogido los siguientes datos de los registros de pacientes:

Variables clínicas demográficas basales.

- Edad: Se midió como variable continua para los datos descriptivos de la serie. Para su estudio como posible factor pronóstico de SG y SLP se dicotomizó en mayores o menores de 70 años (≥ 70 años, < 70 años).
- Sexo (hombre/mujer)

- Performance Status (PS) o escala funcional de la Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG).
- Comorbilidad presente al inicio del tratamiento. Se recogió la información relativa a los siguientes antecedentes médicos: Hipertensión Arterial, cardiopatía, patología respiratoria y patología vascular (historia previa de hemorragias o eventos tromboembólicos).

Variables relacionadas con el tumor.

- Presencia de síntomas relacionados con el tumor (pérdida de peso, sangrado intestinal, u oclusión intestinal).
- Grado de diferenciación o grado histológico.
- Localización de las metástasis.
- Número de órganos con afectación metastásica.
- Datos analíticos previos al inicio del tratamiento sistémico, incluyendo recuentos de células hematológicas, niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) y niveles de Antígeno Carcinoembrionario (CEA). Para su análisis se dicotomizaron los datos en dos grupos: Elevados vs Normales, considerando elevado cualquier nivel por encima de los rangos de normalidad. Rango de normalidad para LDH (<333 UI/L); Rango de normalidad para CEA (<4 mcg/L). La variable anemia se dicotomizó entre Grado 2 o más (Hgb <10 g/dL) vs Grado 1 o normal (Hgb > o igual a 10 g/dL).

Variables relacionadas con el tratamiento.

- Resección de tumor primario previo a inicio de tratamiento sistémico.
- Régimen de quimioterapia empleado.
- Tratamiento con Bevacizumab asociado a la quimioterapia.
- Número de ciclos administrados.
- Toxicidades relevantes durante el tratamiento. La toxicidad del tratamiento se evaluó de acuerdo a los criterios de toxicidad del National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) versión 2.0 ⁽¹³⁶⁾.
- Necesidad de ingresos hospitalarios.
- Necesidad de retrasos de ciclos de tratamiento quimioterápico.
- Necesidad de reducción de dosis durante el tratamiento.

Variables relacionadas con el seguimiento (recidiva y mortalidad).

- Respuesta al tratamiento. La respuesta tumoral se evaluó de acuerdo a los criterios RECIST v1.1 ⁽¹³⁷⁾.
- Progresión de Enfermedad (variable dicotómica si/no): define la supervivencia libre de progresión para cada paciente. La Supervivencia libre de progresión (SLP) se define como el tiempo transcurrido entre el inicio del tratamiento y la documentación de progresión de la enfermedad o muerte del paciente.
- Muerte. Define el tiempo de supervivencia de cada paciente. La supervivencia global (SG) se calculará como el periodo desde el comienzo del tratamiento hasta la fecha de la muerte.
- Tiempo de seguimiento. Desde el inicio del tratamiento hasta el fallecimiento o a la salida del estudio porque el paciente entra en la categoría de perdido.

Variables moleculares.

Para el objetivo principal de este estudio se analizó la expresión de las dos proteínas relacionadas con la angiogénesis (VEGFR/pKDR) y adaptación metabólica (LDH5). La expresión de dichas proteínas se analizó mediante inmunohistoquímica y se hizo de forma semicuantitativa. Para analizar toda la batería de proteínas en todas las muestras tumorales de una sola vez se construyó una matriz de tejido (Tissue Micoarray [TMA]), constituido por muestras correspondientes a piezas de resección del tumor primario, o biopsias de tumor primario, o metástasis de los pacientes. El proceso de construcción de la matriz de tejido de estas características y de la técnica de tinción e interpretación inmunohistoquímica se muestra a continuación, en el Apartado 2 de este capítulo: “Análisis Inmunohistoquímico”.

Para el objetivo secundario del estudio en el que se pretende analizar la importancia de las mutaciones de la familia RAS como marcador pronóstico en CCR avanzado, se llevó a cabo un análisis de genotipificación de las muestras, siguiendo el proceso que se detallará a continuación, en el Aparado 3 de este capítulo: “Análisis de Mutaciones de RAS”.

2. Análisis Inmunohistoquímico

Construcción de micro-array tisular (TMA)

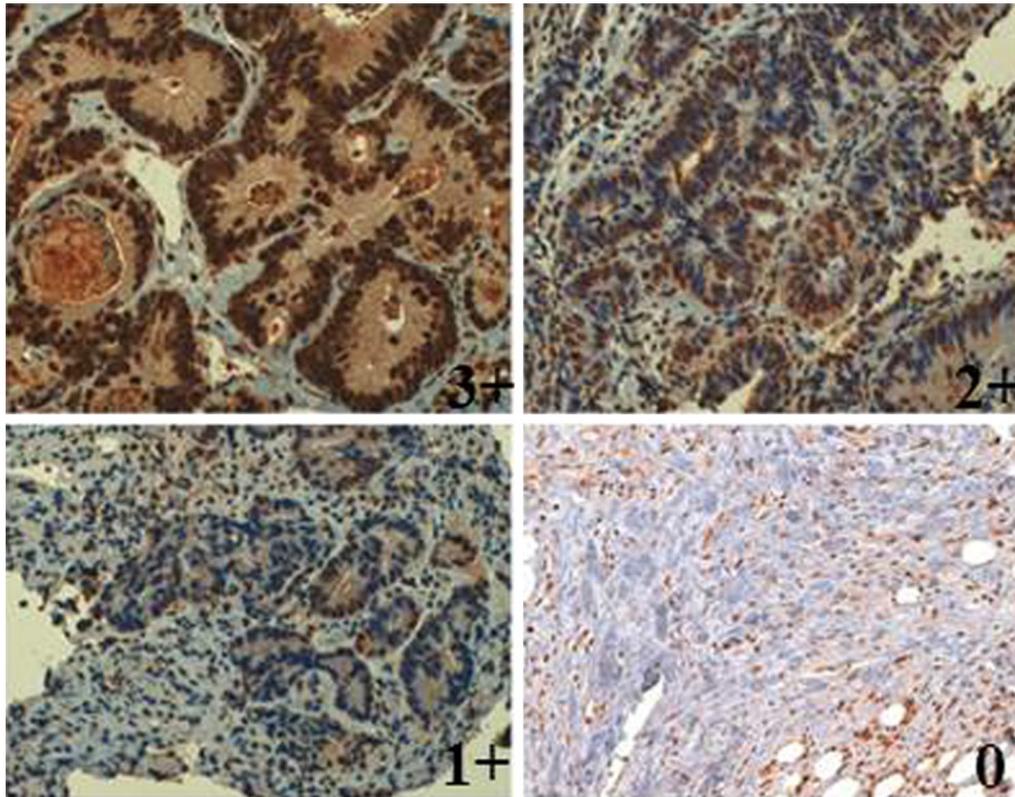
Se realizó una selección previa de los casos atendiendo a los criterios clínicos y la calidad del material disponible. De esta manera, se obtuvo información relevante para crear una base de datos conjunta con una serie homogénea de casos. Después de un examen inicial de todas las muestras con hematoxilina y eosina (HE) se seleccionó un bloque de parafina representativo del tumor de cada uno de los sujetos del estudio. Todos los bloques seleccionados incluyeron tejido viable y se utilizaron para crear un micro-array de tejido (TMA), con dos cilindros tumorales para cada paciente.

De los diferentes bloques donantes, y una vez localizados los focos a adquirir, se obtuvieron mediante un *arrayer* manual (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) las biopsias de 0,6 mm a integrar en el bloque receptor. De esta manera se construyeron 2 TMAs. Las muestras fueron introducidas aleatoriamente en los bloques, pero siguiendo una distribución lineal con una distancia de 1 mm entre los centros de cada muestra, dando lugar a dos matrices de 20 columnas por 11 filas. Una vez que los bloques receptores estuvieron contruidos, se seccionaron en láminas de 6 micras para realizar un control de calidad con tinción de H&E. Posteriormente se realizaron secciones consecutivas de 4 μm . Un corte de cada bloque de cada muestra se tiñó con H&E, y las secciones posteriores fueron utilizadas para inmuno-tinción con los anticuerpos del estudio.

Análisis Inmunohistoquímico de pKDR

La técnica de inmuno-tinción incluyó predigestion y triptinización. El anticuerpo utilizado fue 34a (Oxford Universidad) con una dilución de 1: 2 para VEGFR/pKDR. La expresión de VEGFR/pKDR se cuantificó usando un sistema de clasificación de 4 grupos: de 0 (no detectable) a 3 (alta intensidad), en base a estudios anteriores ⁽¹³⁸⁾. Los pacientes se dividieron en dos grupos para el análisis: grupo 1 con baja expresión (0-1), frente al grupo 2 con alto nivel de expresión (2-3) (Figura 4).

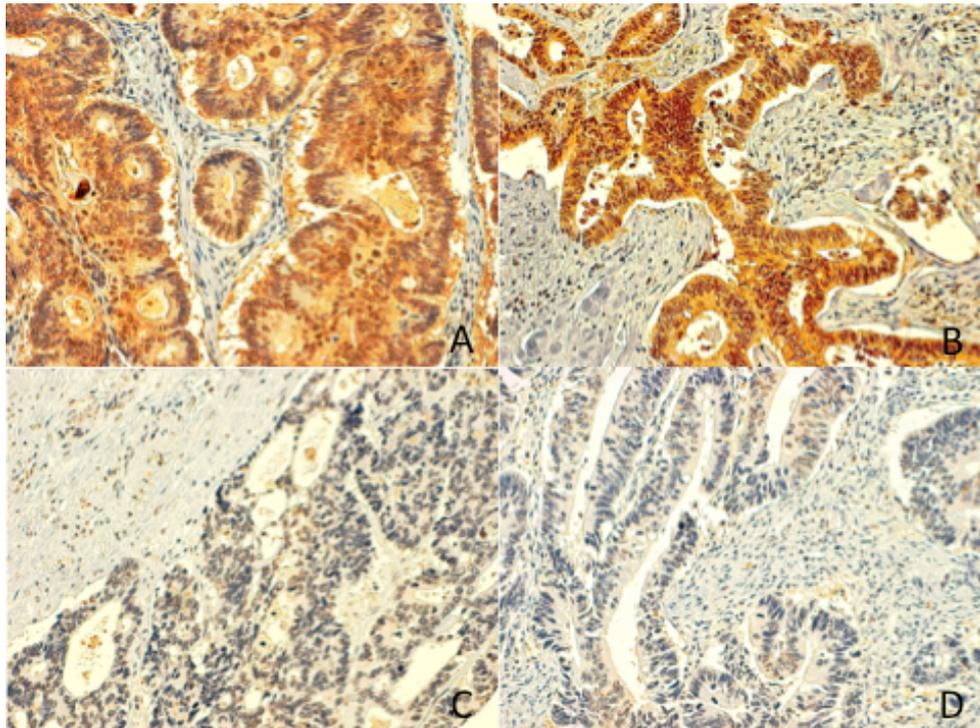
Figura 4. Tinción inmunohistoquímica de biopsias de adenocarcinoma de colon con anticuerpo anti-pKDR: Expresión intensa 3+, expresión moderada 2+, baja expresión 1+, e indetectable 0



Análisis inmunohistoquímico de LDH5

La inmunofijación se realizó mediante la técnica de inmunoperoxidasa seguida de tratamiento con tripsina y predigestion. El anticuerpo utilizado fue el anticuerpo policlonal de oveja 9002 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) generado contra LDH5 humana, y purificado a partir de placenta humana ⁽¹²⁵⁾. El porcentaje de las células cancerosas con una fuerte expresión LDH5 citoplasmática y nuclear se evaluó por separado, tras la inspección de todo el tejido embebido. En cada campo óptico se estimó el porcentaje de células con expresión de la proteína, y la puntuación final para cada caso fue el valor medio obtenido. Los valores inferiores a 10% se evaluaron como 0%. La expresión de LDH5 se cuantificó usando un sistema de clasificación que clasificó a los pacientes en 2 grupos: alta expresión (tinciones con alta y moderada reactividad nuclear o citoplasmática) frente a baja expresión (tinciones con baja o nula reactividad) según lo descrito en estudios previos ⁽¹³⁹⁾. (Figura 5).

Figura 5. Tinción inmunohistoquímica de biopsias de adenocarcinoma de colon con anticuerpo anti-LDH5: Alta expresión A y B. Baja expresión C y D.



3. Análisis de Mutaciones de RAS

Todas las muestras fueron analizadas para la genotipificación de RAS usando dos kits comerciales con marcado CE-IVD (para diagnóstico in vitro): KRAS Pyro kit® (para el análisis de los codones 12, 13 y 61 de KRAS), y RAS Extension Pyrokit® (para los codones 59, 117 y 146 de KRAS, y los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 de NRAS) ambos de Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada muestra se usaron 10 ng de ADN genómico (5 μ l) como molde para las reacciones de PCR, además de 12,5 μ l de PyroMark® pCR Master Mix 2X, 1 μ l del par de cebadores correspondiente a cada reacción (de los cuales uno de ellos se encuentra biotinilado), 2,5 μ l de tampón de carga 10X y 4 μ l de agua libre de nucleadas. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de Mastercycler® (Eppendorf) con las siguientes condiciones: un paso inicial de activación de la enzima realizado a 94°C durante 15 minutos; seguido de 42 ciclos de 3 pasos cada uno de: desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, hibridación a 53°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C 20 segundos. Finalmente se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Los amplicones fueron luego inmovilizados sobre perlas de estreptavidina spherose (GE Healthcare), soporte sobre el que se realiza la reacción de secuenciación, utilizando cebadores específicos. Para la pirosecuenciación se usaron reactivos PyroMark GoldQ24 (mezcla de enzimas, nucleótidos y tampón) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Las mezclas de reacción se cargan en un cartucho para ser dispensados durante el proceso de secuenciación, y seguidamente la placa y el cartucho se cargaron con el Sistema Q24 PyroMark (Qiagen) en el cual se realiza la reacción de secuenciación. Las secuencias se analizaron utilizando el software PyroMark Q24 2.0.7 (QIAGEN).

En cada ejecución se incluyeron dos controles: ADN no metilado como control positivo para las reacciones de amplificación y de secuenciación, y un control negativo (sin ADN molde).

4. Análisis estadístico

Variables del estudio

- Las variables principales objeto del estudio son: sobreexpresión de VEGFR2/pKDR y sobreexpresión de LDH5; así como las variables Supervivencia Global, Supervivencia Libre de progresión y Tasa de Respuesta
- Las variables del objetivo secundario son: Presencia de mutaciones en genes RAS (KRAS y NRAS).
- Los posibles factores predictores:
 - Características clínicas: Edad, Sexo, ECOG-Performance Status (PS); antecedentes de hipertensión (HTA).
 - Variables relacionadas con la enfermedad:
 - Síntomas relacionados con la enfermedad al momento del diagnóstico: pérdida de peso, rectorragia u oclusión intestinal.
 - Localización de metástasis: Metástasis hepáticas, peritoneales, pulmonares o ganglionares.
 - Marcadores analíticos: CEA, Anemia y LDH.
 - Presencia de mutaciones en la vía RAS.

Todas estas variables son categóricas, algunas por su propia naturaleza, y otras porque han sido categorizadas, siendo ésta la práctica habitual en este tipo de estudios

Las variables: Tratamiento con Bevacizumab y Resección del Tumor primario, tendrán un tratamiento especial debido a su interés para el estudio: se utilizarán como estrato o variable de agrupación en algunos casos, sin perjuicio de que pueda ser usada también como factor pronóstico en otros.

Cálculo de la muestra

Para detectar una reducción en el riesgo de muerte del 15% en aquellos pacientes con tumores con baja expresión de VEGFR2/pKDR y LDH5 frente a pacientes con tumores con alta expresión, y asumiendo un error tipo alfa de 0.05 y una potencia estadística del 80%, es necesaria una muestra de 95 pacientes.

Asumiendo además una proporción esperada de pérdidas del 15%, se estima necesaria una muestra de 112 pacientes para cumplir los objetivos del estudio.

Fases del estudio

Se establecen dos fases del estudio:

- Primera fase: análisis univariante para encontrar qué factores pronóstico resulten significativos a la hora de explicar cada una de las variables respuesta.
- Segunda fase: análisis multivariante para obtener un modelo capaz de explicar y predecir cada una de las variables respuesta, integrando los diversos factores que resulten significativos.

Métodos Estadísticos

Se utilizaron los siguientes métodos estadísticos:

- Asociación de variables categóricas con dos o más categorías: el estándar habitual es utilizar tablas de contingencia, el test Chi-cuadrado, y medidas de asociación como por ejemplo el coeficiente de contingencia.

- Modelos multivariantes con respuesta dicotómica: el estándar habitual es la regresión logística, existiendo alternativas como el análisis discriminante o los árboles de clasificación.
- Análisis univariante de supervivencia: el estándar habitual es utilizar las curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier, y evaluar su significatividad mediante el estadístico log-rank.
- Análisis multivariante de supervivencia: el estándar habitual es utilizar la regresión de Cox.

Por tanto, según la fase del estudio y la naturaleza de las variables respuesta, se utilizará la metodología correspondiente, aspecto que queda resumido en la siguiente tabla (tabla 4.).

Tabla 4. Métodos estadísticos utilizados en función de la naturaleza de la variable y fase del estudio.

Variable respuesta	Primera fase	Segunda fase
Continua (datos de supervivencia)	<i>Kaplan-Meier</i>	<i>Regresión de Cox</i>
Categorica	<i>Chi-cuadrado</i>	<i>Regresión logística</i>

En la primera fase del estudio, para el análisis univariado de factores pronósticos se utilizará el valor P asociado al test de log-rank para todas las variables predictivas del estudio. Considerándose una variable significativa si su p-valor es inferior a 0.05. En la segunda fase del estudio, correspondiente al análisis multivariante de factores pronósticos se realizará una evaluación cualitativa de los resultados del análisis univariante previo, y se incluirán en el mismo todas aquellas con el valor P de la estadística de log-rank inferior a 0.2. Asumiéndose la siguiente categorización:

1. Significativo, si p-valor inferior a 0.05.
2. Dudoso si el valor de p es superior a 0.05 pero inferior a 0.2.
3. No significativo (NS), si p-valor > 0.2.

Dado que el propósito del estudio es desarrollar un modelo multivariado, en esta segunda fase aumentaremos el umbral de significación para detectar aquellos factores que pueden jugar un papel importante, aunque no sean muy significativos por sí solos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el SPSS versión paquete estadístico 16.

IV. RESULTADOS

1. Análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de la población

Encontramos un total de 112 pacientes que cumplían los criterios de inclusión del estudio en nuestras bases de datos. Todos los pacientes fueron diagnosticados de CCR avanzado entre enero de 2010 y diciembre de 2013 y fueron tratados con un esquema de quimioterapia que incluía Fluoropirimidinas y Oxaliplatino (XELOX o FOLFOX) con o sin bevacizumab. Las características de los pacientes se resumen en la Tabla 5.

La mediana de edad fue de 65 años, la mayoría de los pacientes tenían un buen estado general (ECOG-PS 0-1) (79,8%), y el 55,4% de ellos habían sido tratados mediante resección del tumor primario. El 53,6% presentaban tan sólo una localización metastásica, y el 67,6% recibieron tratamiento de combinación con quimioterapia más bevacizumab.

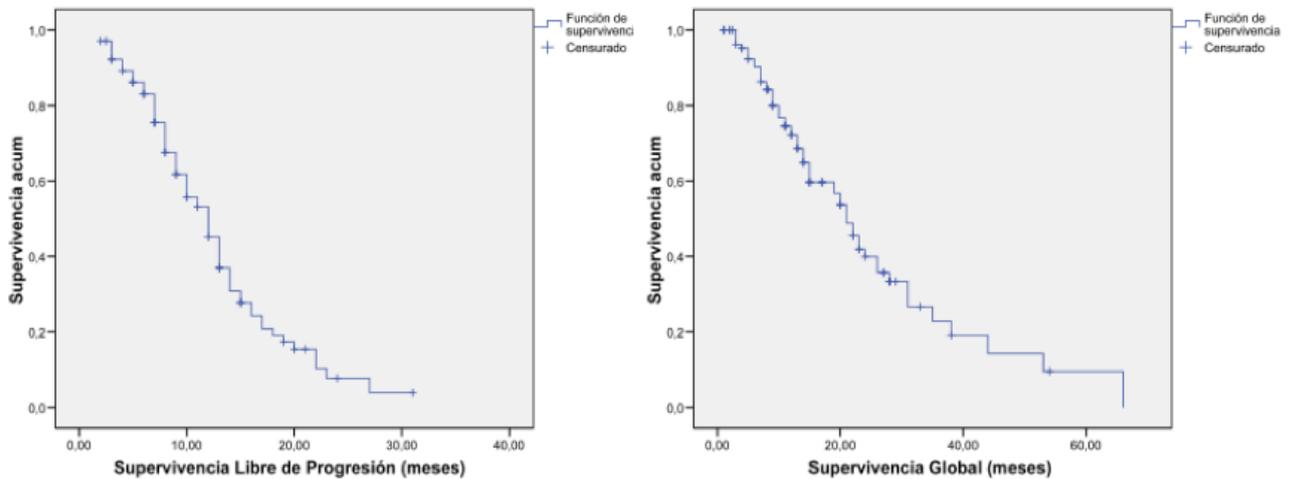
El análisis Inmunohistoquímico fue valorable en 84 pacientes para pKDR (75%) y en 87 pacientes para LDH5 (77,6%). Las muestras se consideraron no valorables en los casos en los que la técnica de tinción se consideró de calidad defectuosa o en aquellos bloques tumorales con escasa representatividad tumoral.

La mediana de SG fue de 23 meses y la mediana de SLP de 12,2 meses (figura 6). Tres pacientes alcanzaron una respuesta completa (CR) (2,7%), y 60 pacientes respuesta parcial (RP) (53,6%), con una tasa de respuesta global (TR) del 56,3%. Dieciséis pacientes presentaron enfermedad estable (EE) y 14 progresaron durante el tratamiento de primera línea.

Tabla 5. Características clínico-patológicas de los pacientes.

Variable	Total n=112
<i>Edad (años), mediana</i>	65 (39-83)
>70	46 (40.7%)
<70	66 (58.3%)
<i>Sexo</i>	
Varón	66 (58.3%)
Mujer	46 (40.7%)
<i>Performance Status</i>	
0-1	87 (79.8%)
2	22 (20.2%)
<i>Síntomas relacionados con el tumor</i>	
Pérdida de peso >10%	21 (18.6%)
Sangrado intestinal	35 (37.6%)
Síntomas oclusivos	10 (10.9%)
<i>Cirugía del tumor primario</i>	
Si	62 (55.4%)
No	50 (44.6%)
<i>Localización de las metástasis</i>	
Hígado	89 (79.5%)
Peritoneo	24 (21.4%)
Pulmón	32 (28.6%)
Hueso	3 (2.7%)
Ganglios linfáticos	27 (24.1%)
<i>Número de localizaciones metastásicas</i>	
1	60 (53.6%)
2 o más	52 (46.4%)
<i>Marcadores séricos</i>	
CEA elevado	76 (80.9%)
LDH elevada	32 (49.2%)
Hemoglobina baja (anemia G2 o más)	46 (54.1%)
<i>Grado de diferenciación</i>	
G1	15 (20%)
G2	49 (65.3%)
G3	10 (13.3%)
<i>Estatus Mutacional de RAS</i>	
Mutado	49 (43.7%)
Salvaje	44 (39.2%)
Desconocido	19 (16.9%)
<i>Tratamiento</i>	
FOLFOX/XELOX	37 (33%)
FOLFOX/XELOX + Bevacizumab	75 (66.9%)
<i>Sobreexpresión de pKDR</i>	
Si	77 (68.7%)
No	7 (6.2%)
Desconocido	28 (25%)
<i>Sobreexpresión de LDH5</i>	
SI	71 (63.3%)
No	16 (14.2%)
Desconocido	25 (22.3%)

Figura 6. Supervivencia Libre de Progresión (4.1) y Supervivencia Global (4.2) del conjunto de la población del estudio.



2. Expresión inmunohistoquímica de VEGFR2/pKDR como biomarcador pronóstico en CCR

2.1 Característica de los pacientes

De los 112 pacientes seleccionados para el estudio, ochenta y cuatro disponían de suficiente material histológico para realizar el análisis Inmunohistoquímico de VEGFR2/pKDR. Los 18 restantes fueron excluidos por los siguientes motivos: 12 de ellos tenían escasa representatividad tumoral en el bloque tumoral, y en 6 casos la calidad de la tinción fue defectuosa.

Siete pacientes (8,3%) presentaban expresión leve o indetectable (grupo 1); mientras que los 77 restantes (91,7%) presentaban expresión moderada o intensa (grupo 2). Las características de los pacientes se resumen en la tabla 5.

La mediana de edad de los pacientes del grupo 1 fue de 71 años, y en el grupo 2 de 68. No se observan diferencias significativas entre los dos grupos en función del sexo, Performance Status (PS), mutaciones de KRAS, uso de Bevacizumab, número de localizaciones metastásicas o la presencia de rectorragia al diagnóstico (Tabla 6).

Tabla 6. Características clínicas de los pacientes en función de la expresión de pKDR

	GRUPO 1. Baja expresión de pKDR n 7	GRUPO 2. Alta expresión de pKDR n 77	p Valor
Mediana Edad	71 años	68 años	
SEXO V/M	5/2 (71% vs 29%)	45/84 (53.5 vs 46.5%)	0,4
PS 0-1 vs 2	6 vs 1 (85.7 vs 14.3%)	60 vs 17 (71.4 vs 28.6%)	
HTA al diagnóstico	1/6 (16.6%)	36/67 (53.7%)	0,09
PERDIDA PESO >10%	1/6 (16.6%)	15/47 (31.9%)	0,56
RECTORRAGIA	2/6 (33%)	24/63 (38%)	0,59
SINTOMAS OCLUSIVOS	1/6 (16.6%)	6/62 (4,8%)	0,09
>1 LOCALIZACIÓN METASTASICA	2/7 (28,5%)	35/77 (45.4%)	0,34
CEA ELEVADO	3/4 (75%)	55/71 (77.4%)	0,65
ANEMIA	1/2 (50%)	8/68 (11,7%)	0,24
LDH ELEVADO	0/2 (0%)	31/54 (57.4%)	0,19
QUIMIOTERAPIA CON AVASTIN	3/7 (42,8%)	51/77 (66.2%)	0,22
MUTACIÓN KRAS	4/7 (57.1%)	45/77 (58,4%)	0,51

2.2 Tratamiento y Tasa de Respuesta

De los 7 pacientes del grupo 1, tres (42.8%) recibieron tratamiento de quimioterapia en combinación con Bevacizumab, mientras que los cuatro restantes recibieron quimioterapia exclusivamente. De los 77 pacientes del grupo 2, 49 (63.6%) recibieron tratamiento de quimioterapia con Bevacizumab, y los 28 restantes recibieron quimioterapia exclusivamente. Setenta y siete pacientes fueron evaluables para respuesta, todos los del grupo 1, y 70 del grupo 2. Los siete pacientes no evaluables fallecieron antes de la reevaluación (5 después del 2º ciclo y 2 tras el 1º ciclo de quimioterapia). La tasa de respuesta al tratamiento de los pacientes con baja expresión de VEGFR2/pKDR fue del 100% (7 RP), frente al 54.2% en el grupo de

pacientes con alta expresión de VEGFR2/pKDR (1 RC, 37 RP, 19 EE y 13 PE), diferencias que son estadísticamente significativas ($p=0,019$). Tabla 7.

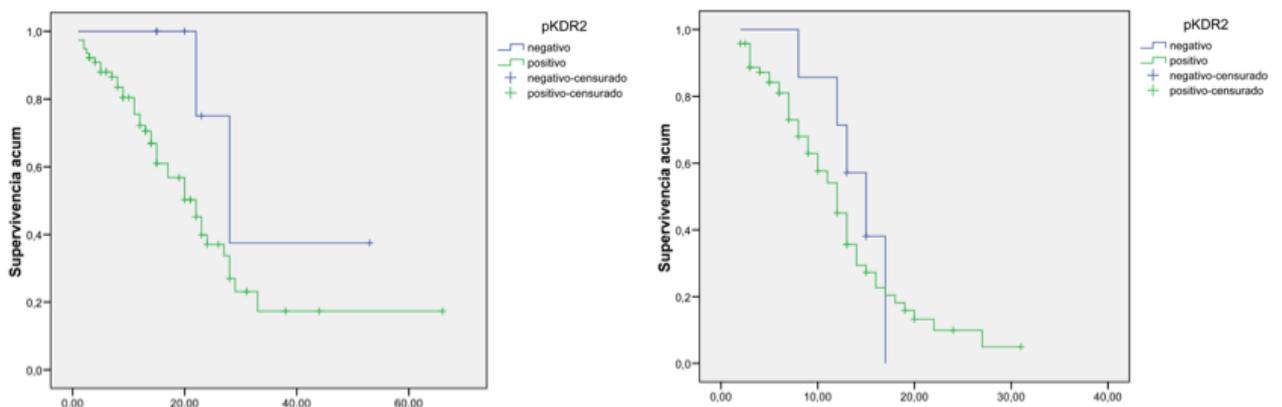
Tabla 7. Respuesta al tratamiento en función de la expresión de pKDR

RESPUESTA	GRUPO1 Low pKDR	GRUPO2 High pKDR	p Valor
RESPUESTA COMPLETA RESPUESTA PARCIAL	7 (100%) 0	1 (2,3%) 37 (44%)	0,019
ENFERMEDAD ESTABLE	0	19 (24,6%)	
PROGRESIÓN ENFERMEDAD	0	13 (16.8 %)	

2.3 Supervivencia global y Supervivencia Libre de Progresión

La mediana de supervivencia de los pacientes del grupo 1 fue de 28 meses, frente a 22 meses en el grupo de pacientes del grupo 2 ($p = 0.09$). El tiempo hasta la progresión fue superior en el grupo 1, aunque en este caso las diferencias tampoco alcanzaron la significación estadística (15 vs 12 meses, $p=0,4$). Figura 7.

Figura 7. Supervivencia global (1.1) y Supervivencia libre de progresión (1.2) en función de la expresión de pKDR.



3. Expresión inmunohistoquímica de LDH5 como biomarcador pronóstico en CCR

3.1 Característica de los pacientes

Ochenta y siete de los 112 pacientes tenían suficiente material para el análisis Inmunohistoquímico de LDH5. Los 15 restantes fueron excluidos por los siguientes motivos: 12 de ellos tenían escasa representatividad tumoral en el bloque tumoral, y en tres casos la calidad de la tinción fue defectuosa.

Dieciséis pacientes (18,3%) presentaban baja expresión (grupo 1); mientras setenta y un pacientes (81,7%) mostraron una fuerte expresión de LDH 5 (grupo 2): 20 expresión nuclear en >10% de las células sin expresión citoplásmica, 16 fuerte expresión citoplásmica sin expresión nuclear, y 35 sobreexpresión tanto nuclear como citoplasmática.

Las características de los pacientes se resumen en la Tabla 8. La edad media de los pacientes en el grupo 1 fue de 71 años, y 68 años en el grupo 2. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto al sexo, el estado funcional (PS), la presencia de mutaciones de KRAS, el número de sitios metastásicos o la presencia de sangrado rectal en el momento del diagnóstico.

Tabla 8. Características clínicas en función de la expresión de LDH5

	Población global N = 112	GRUPO 1 Baja expresión de LDH5	GRUPO 2. Alta expresión de LDH5	P Valor
Edad mediana	68 años	71 años	68 años	
Sexo (Varón/mujer)	66/46 (58,4 vs 40,7%)	9/7 (56 vs 44%)	44/27 (61,9 vs 38,1%)	0.4
PS 0-1 vs 2	87 vs 22 (77 vs 23%)	11 vs 5 (68,7 vs 31,3%)	58 vs 13 (81,6 vs 18,4%)	
HTA	43 (38%)	4 (70%)	33 (54%)	0.1
Pérdida de peso >10%	21 (22,8%)	4 (30,7%)	12 (21,4%)	0.34
Rectorragia	35 (37,6)	6 (46.1%)	21 (36,8%)	0.37
Síntomas oclusivos	10 (10,8%)	1 (7,6%)	6 (10,7%)	0.6
>1 localización metastásica	52 (46,4%)	7 (43%)	31 (43,6%)	0.86
Niveles elevados de CEA	75 (79,7%)	10 (66,6%)	48 (78,6%)	0.25
Anemia	47 (54,6%)	5 (35,7%)	27 (47,3%)	0.31
Niveles elevados de LDH	34 (52,3%)	3 /33%)	22 (46,8%)	0.35
Tratamiento con Bevacizumab	75 (66,9%)	6 (37,5%)	49 (69%)	0.02*
Mutaciones de RAS	49 (43,7%)	8 (50%)	41 (57,7%)	0.3

3.2 Tratamiento y Tasa de Respuesta

De los 16 pacientes del Grupo1, 6 (37,5%) recibieron quimioterapia en combinación con bevacizumab, mientras que los otros 10 recibieron quimioterapia sola. De los 71 pacientes del grupo 2, 49 (69%) recibieron quimioterapia con bevacizumab, y los otros 22 (31%) recibieron quimioterapia exclusivamente. Un total de 80 pacientes fueron evaluables en términos de respuesta: todos los pacientes del grupo 1 y 64 del grupo 2. Los siete pacientes no evaluables murieron antes de la re-evaluación (5 después del segundo ciclo de quimioterapia y 2 después del primer ciclo). La tasa de respuesta al tratamiento de los pacientes con baja expresión LDH5 fue del 56,2% (9 PR), en comparación con 60,8% en el grupo de pacientes con alta expresión de LDH5 (1 respuesta completa, 37 respuesta parcial). Las diferencias en la tasa de respuestas entre los dos grupos no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,47$). Tabla 9.

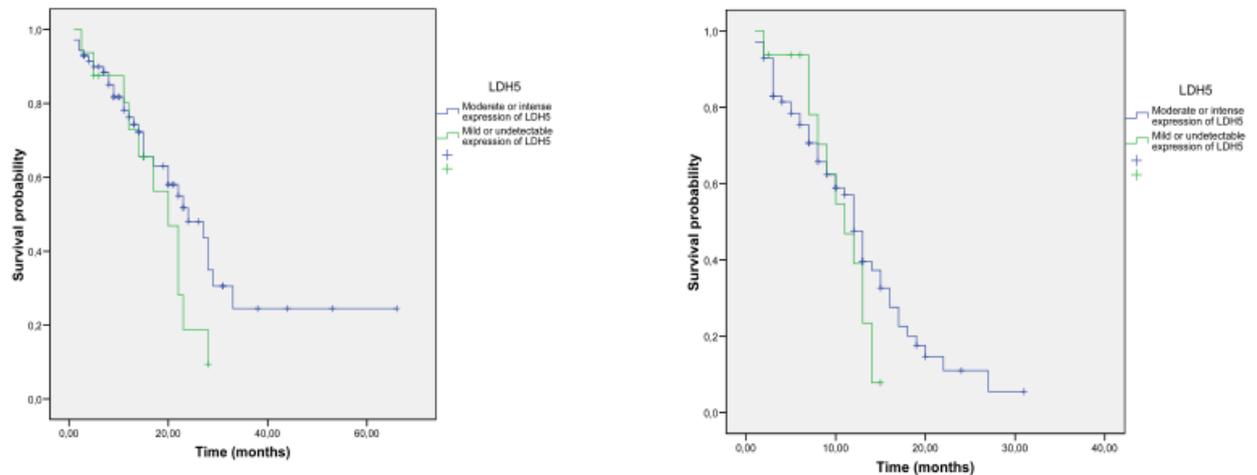
Tabla 9. Tasa de respuesta en función de la expresión de LDH5

RESPUESTA AL TRATAMIENTO	GRUPO 1 Baja expresión de LDH5	GRUPO 2 Alta expresión de LDH5	p Valor
RESPUESTA COMPLETA	0	1 (1,5%)	0.47
RESPUESTA PARCIAL	9 (56,2%)	38 (59,3%)	
ENFERMEDAD ESTABLE	5 (31,2%)	14 (21,8%)	
PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD	2 (12,5%)	7 (10,9 %)	

3.3 Supervivencia global y Supervivencia Libre de Progresión

La mediana de supervivencia en el grupo 1 fue de 20 meses, en comparación con 24 meses en el grupo 2 ($p = 0,17$). Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en SLP, 11 vs 12 meses en los Grupos 1 y 2 respectivamente ($p=0.28$). Figura 8.

Figura 8. Supervivencia global (3.1) y Supervivencia libre de progresión (3.2) en función de la expresión de LDH5.



4. Análisis del estatus mutacional de RAS como factor pronóstico en pacientes con CCR avanzado tratados con Quimioterapia con o sin Bevacizumab.

4.1 Características de los pacientes

Encontramos 93 pacientes con material histológico disponible para el análisis de N-RAS y K-RAS. Cuarenta y nueve pacientes (52,6%) presentaban tumores con mutaciones de RAS, 47 mutaciones de K-RAS y 2 de N-RAS. Las características del paciente de la población en función del estado de RAS se resumen en la Tabla 10.

La edad media de los pacientes fue de 65 años (rango, 39 a 83 años) al momento del diagnóstico, y la razón hombre/mujer fue de 1,5/1,0. Las características de los pacientes fueron globalmente similares entre las poblaciones con tumores con mutaciones de RAS (RASmut) y sin ellas (RASwt). La tasa de pacientes con RASmut que se sometieron a cirugía del tumor primario fue significativamente menor en comparación con aquellos con tumores RASwt ($p = 0,019$), y mostraron una mayor tasa de metástasis pulmonares (34,6 vs 15,9, $p = 0,03$). Por otra parte, los pacientes RASmut recibieron menos bevacizumab en comparación con la población RASwt (29,5 vs 44-8%, $p=0,09$). Tabla 10.

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes en función del estatus mutacional de RAS.

Variable	Total n = 93	RAS wild- type n = 44	RAS-mutation N = 49	P- value
Edad, años (range)	65 (39-83)	68.5 (46-80)	68 (39-83)	
Sexo				0.101
- Varón	56 (60.2%)	30 (68.1%)	26 (53%)	
- Mujer	37 (39.8%)	14 (31.9%)	23 (47%)	
Performance Status				0.402
- 0-1	76 (81.1%)	35 (79.5%)	41 (83.7%)	
- 2	17 (19.9%)	9 (20.1%)	8 (16.3%)	
Síntomas relacionados con tumor				
- Pérdida de peso >10%	17 (18.3%)	10 (22.7%)	7 (17%)	0.143
- Sangrado intestinal	30 (32.3%)	16 (47%)	7 (17%)	0.184
- Síntomas oclusivos	8 (8.6%)	1 (3%)	14 (34.1%)	0.056
Cirugía del tumor primario				0.019*
- si	49 (52.6%)	18 (41%)	16 (32.6%)	
- No	42 (47.4%)	26 (59%)	33 (67.3%)	
Localización de metástasis				
- Hígado	75 (80.6%)	38 (86.3%)	37 (75.5%)	0.145
- Peritoneo	19 (20.4%)	10 (22.7%)	9 (18.3%)	0.396
- Pulmón	24 (25.8%)	7 (15.9%)	17 (34.6%)	0.033*
- Hueso	3 (3.2%)	0 (0%)	3 (6.1%)	0.142
- Ganglios linfáticos	22 (23.7%)	10 (22.7%)	12 (24.4%)	0.519
Número de localizaciones metastásicas				
- 1	52 (55.9%)	25 (56.8%)	27 (20.4%)	0.517
- 2 o más	48 (44.1%)	19 (43.1%)	22 (44.9%)	
Metástasis operables tras quimioterapia				
- Si	17 (19.8%)	10 (25%)	7 (15.2%)	0.194
- No	69 (80%)	30 (75%)	39 (84.7%)	
Marcadores séricos				
- CEA (elevado)	62 (66.7%)	30 (75%)	32 (76.1%)	0.552
- LDH (elevado)	32 (52.5%)	15 (53.5%)	17 (51.5%)	0.539
- Hemoglobine (bajo)	22 (28.6%)	10 (27.7%)	12 (29.2%)	0.544
Grado de diferenciación				0.693
- 1	12 (12.9%)	5 (15.6%)	7 (21.2%)	
- 2	43 (46.2%)	22 (68.7%)	21 (63.6%)	
- 3	9 (9.7%)	5 (15.6%)	4 (12.1%)	
Esquema Quimioterapia				0.095
- FOLFOX/XELOX	58 (62.4%)	13 (29.5%)	22 (44.8%)	
- FOLFOX/XELOX-B	35 (37.6%)	31 (70.5%)	27 (55.1%)	

4.2 Eficacia del Tratamiento

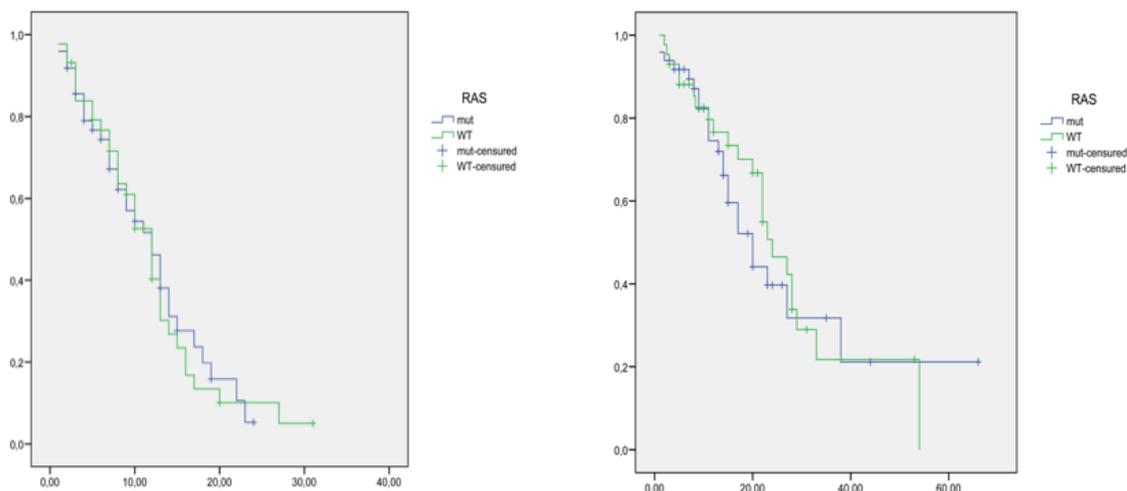
La tasa de respuesta global (TR) para el tratamiento de la quimioterapia de primera línea fue del 53,8%, y la tasa de control de la enfermedad de 81,2%. No hubo diferencias significativas en la TR según el estado de mutacional de RAS (RASmut 48,9% vs RASwt 58,9%, $p = 0,129$). Tabla 11.

Tabla 11. Respuesta al tratamiento en función del estatus mutacional de RAS.

RESPUESTA AL TRATAMIENTO	RASmut	RASwt	p Value
Respuesta Completa	0 (0%)	2 (4,5%)	0,129
Respuesta Parcial	24 (48.9%)	24 (54.4%)	
Enfermedad Estable	12 (24.4%)	7 (15,9%)	
Progresión de Enfermedad	10 (20.4%)	6 (13.6 %)	

La mediana de supervivencia libre de progresión de la población global fue de 12 meses, y no se observó ninguna diferencia significativa entre el grupo RASmut en comparación con los tumores RASwt (12 meses, IC, 8,7 a 15,2 vs 12 meses, IC, 9,67 a 14,32, $p = 0,857$). La mediana de supervivencia global fue de 22 meses, y tampoco hubo diferencias en función del estado mutacional de RAS (RASmut 20 meses; IC del 95%, 14.3-25.6 meses; frente a RASwt 24 meses; IC del 95%, 18.7-29.2 meses, $p = 0,631$). Figura 9

Figura 9. Supervivencia libre de progresión (5.1) y Supervivencia Global (5.2) en función del estatus mutacional de RAS.



5. Tratamiento con Bevacizumab y Resección del Tumor Primario: Análisis de su papel como factores pronósticos de supervivencia y Análisis de Toxicidad y Seguridad

5.1 Tratamiento con Bevacizumab

De los 112 pacientes que componen nuestra base de datos, setenta y cinco pacientes (66,9%) recibieron tratamiento de quimioterapia en combinación con Bevacizumab (grupo 1); los 37 pacientes restantes (33,1%) recibieron tratamiento con quimioterapia exclusivamente (grupo 2).

Las características de los pacientes se resumen en la tabla 12. La mediana de edad de los 112 pacientes fue de 68 años (63,5 grupo 1 vs 65.5 grupo 2). El porcentaje de pacientes mayores de 70 años en el grupo 1 y 2 fue de 49,3 vs 29,7% respectivamente ($p=0.12$). No hubo diferencias entre ambos grupos en el porcentaje de mujeres (37,3% vs 48,7%, $p=0.173$), PS 0-1 (81,3% vs 70,2%, $p=0.35$), pérdida de peso superior al 10% (22,5% vs 23,3%, $p=0.566$), niveles elevados de CEA al diagnóstico (84,1% vs 70,1%, $p=0.112$), ni en ninguna otra variable clínica, patológica o molecular.

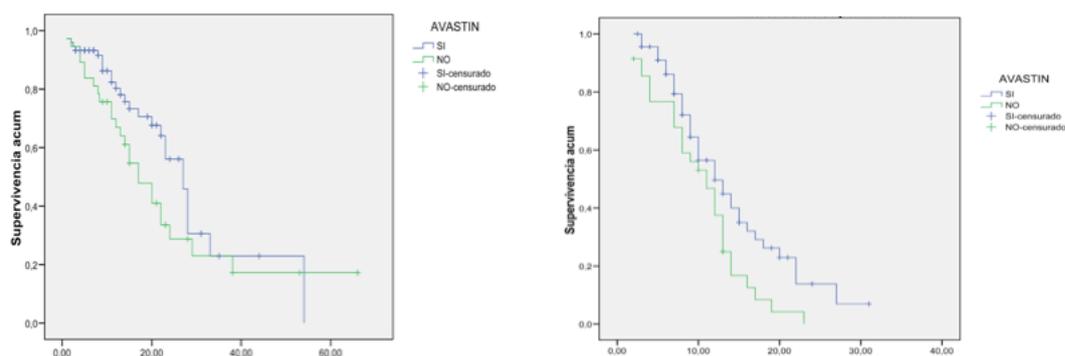
Tabla 12. Características de los pacientes en función de la administración de Bevacizumab asociado a quimioterapia.

	GRUPO 1. Quimioterapia + Bevacizumab n 75	GRUPO2. Quimioterapia n 37	p Valor
Mediana Edad	63,5 años	65,5	
EDAD >70 años	35/75 (49,3%)	11/37 (29,7%)	0,12
SEXO			0,173
- Varón	47 (62,6%)	19 (51,3%)	
- Mujer	28 (37,3%)	18 (48,7%)	
PS 0-1	61 (81,3%)	26 (70,2%)	0,356
HTA al diagnóstico	29/68 (43%)	14/30 (46,6%)	0,44
PERDIDA PESO >10%	14/62 (22,5%)	7/30 (23,3%)	0,566
RECTORRAGIA	34/63 (35,4%)	13/30 (42%)	0,351
SINTOMAS OCLUSIVOS	5/62 (8%)	5/30 (16,6%)	0,186
>1 LOCALIZACIÓN METASTASICA	42/75 (56%)	18/37 (48,6%)	0,297
CEA ELEVADO	53/63 (84,1%)	22/31 (70,1%)	0,112
ANEMIA	7/54 (12,9%)	5/32 (15,6%)	0,483
LDH ELEVADO	26/40 (65%)	11/25 (44%)	0,080
RESECCIÓN TUMOR PRIMARIO	44/75 (58,6%)	18/37 (48,6%)	0,258
MUTACIÓN KRAS	27/60 (45%)	22/33 (66,6%)	0,370

5.1.1 Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Progresión

Los pacientes tratados con bevacizumab mostraron una mediana de SLP de 12 meses frente a 11 meses para los pacientes tratados con quimioterapia sola ($p = 0,055$). No se observaron diferencias significativas en la SG de acuerdo con el uso de bevacizumab en la población en general, aunque hubo una tendencia favorable en los pacientes tratados con la combinación de quimioterapia y bevacizumab (SG 27 meses; IC del 95% 21.9-32 meses, frente a 20 meses, CI 13,8 a 26,1, $p = 0,25$). Figura 10.

Figura 10. Supervivencia global (8.1) y Supervivencia libre de progresión (8.2) de los pacientes en función de si fueron tratados con Bevacizumab.



De los 101 pacientes que fueron evaluables para respuesta, 66 recibieron quimioterapia en combinación con bevacizumab y 35 quimioterapia. Nueve pacientes tratados con Bevacizumab no fueron evaluables por diferentes razones: 4 fallecieron antes de la reevaluación, y en los 5 restantes no había suficiente información en la historia clínica.

Entre los pacientes tratados con quimioterapia, 2 fallecieron antes de ser evaluados. La tasa de respuesta al tratamiento en los pacientes que recibieron Bevacizumab en combinación con quimioterapia fue del 72,7% (3 RC, 45 RP, 13 EE y 5 PE), frente a 40.5% en los pacientes que recibieron quimioterapia (0 RC, 15 RP, 10 EE y 10 PE; $p=0.003$). Tabla 13

Tabla 13. Respuesta en función de tratamiento con Quimioterapia +/- Bevacizumab

RESPUESTA	Quimioterapia + Bevacizumab	Quimioterapia	p Valor
RESPUESTA COMPLETA RESPUESTA PARCIAL	3 (4,5%) 45 (68,1%)	0 (0%) 15 (40,5%)	0,003
ENFERMEDAD ESTABLE	13 (19,6%)	10 (28,5%)	
PROGRESIÓN ENFERMEDAD	5 (7,5%)	10 (28,5%)	

5.1.2 Toxicidad y efectos adversos por quimioterapia

La toxicidad post-quimioterapia se resume en la tabla 14. El 38.4% de los pacientes precisaron retraso de algún ciclo de quimioterapia, y el 32% reducción de dosis por toxicidad. La toxicidad más frecuente fue la neuropatía, desarrollada por el 34.8% de los pacientes (G3-4 8.9%), seguido de la toxicidad gastrointestinal que padecieron el 26.3% (3.6% G3-4). Dos pacientes ingresaron por neutropenia febril (1.8%).

La frecuencia de otras toxicidades G3-4 fue: neutropenia 5,4%, emesis 2,7% y trombopenia 2,7%. No hubo diferencias significativas en la toxicidad de la quimioterapia entre los pacientes que recibieron tratamiento en combinación con bevacizumab frente a los que recibieron tratamiento con quimioterapia exclusiva.

Nueve pacientes suspendieron tratamiento con Bevacizumab por efectos secundarios que se relacionaron con el fármaco: tres desarrollaron trombosis venosa profunda de miembros inferiores, dos tromboembolismo pulmonar, otros dos por hipertensión arterial no controlable con medicación antihipertensiva, uno por rectorragia y otro por reacción adversa durante la infusión del fármaco. La tasa de complicaciones que obligaron a suspender el tratamiento con Bevacizumab fue del 12% (9/75).

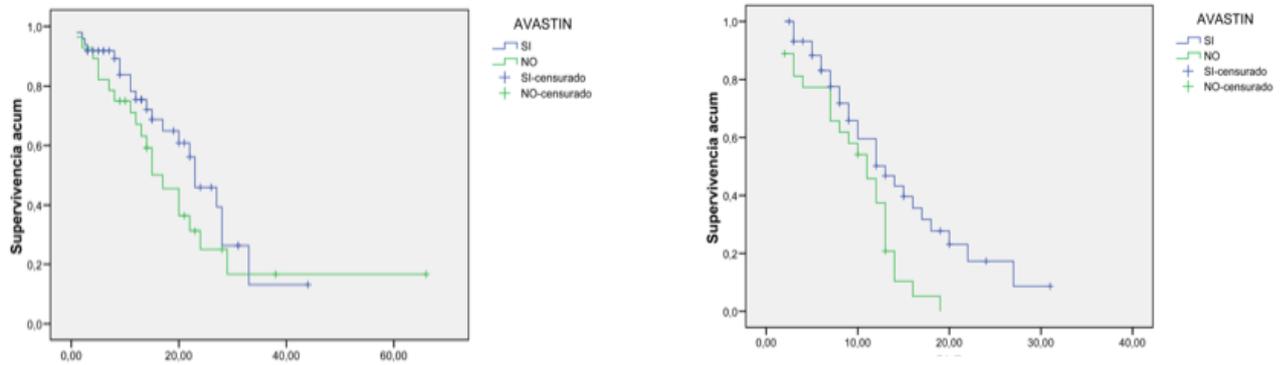
Tabla 14. Toxicidad Post-quimioterapia.

	Global		Tratamiento con Bevacizumab			
			SI		NO	
	G 1-2	G 3-4	G 1-2	G 3-4	G 1-2	G 3-4
Anemia	9%	1%	12%	1.7%	9.6%	0%
Neutropenia	7,2%	5,4%	8.6%	5.1%	9.6%	9.6%
Trombopenia	3,6%	2,7%	1.7%	3.4%	9.6%	3.2%
Neutropenia febril		1,8%		3.4%		0%
Neuropatía	25,9%	8,9%	31.6%	13.3%	32.2%	6.4%
Gastrointestinal	22,7%	3,6%	34.4%	5.1%	19.3%	3.2%
Emesis	6,3%	2,7%	12.2%	3.5%	0%	3.2%
Renal	1,8%	0%	0%	0%	6.4%	0%

5.1.3 Análisis de eficacia de tratamiento con Bevacizumab en función de la expresión de VEGFR2/pKDR

La mediana de supervivencia global en los pacientes de con sobreexpresión de VEGFR2/pKDR que recibieron tratamiento con quimioterapia en combinación con bevacizumab fue de 23 meses, frente a 17 meses en los pacientes tratados únicamente con quimioterapia ($p= 0,27$). La supervivencia libre de progresión fue superior de forma estadísticamente significativa en el grupo de pacientes tratados con bevacizumab (13 vs 11 meses, $p= 0.015$). Figura 11.

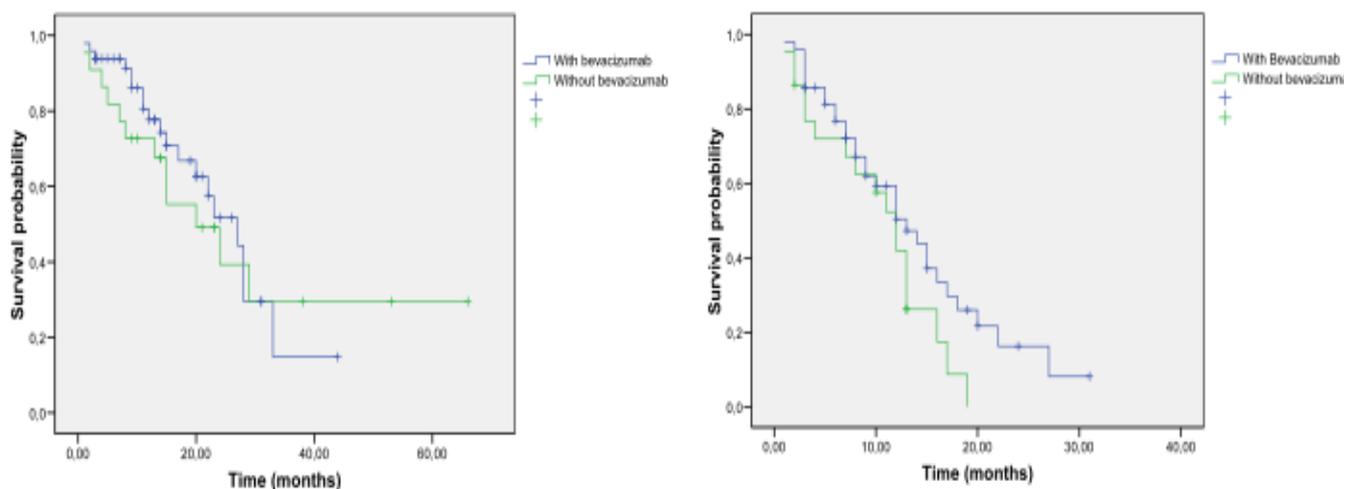
Figura 11. Supervivencia global (2.1) y Supervivencia Libre de Progresión (2.2) en pacientes con sobreexpresión de pKDR en función de la adición de Bevacizumab al tratamiento de quimioterapia



5.1.4 Análisis de eficacia de tratamiento con Bevacizumab en función de la expresión de LDH5

La mediana de SG en los pacientes con alta expresión de LDH5 que recibieron tratamiento de quimioterapia en combinación con bevacizumab fue de 27 meses, en comparación con 20 meses en los pacientes tratados con quimioterapia sola ($p = 0,27$). La SLP fue significativamente superior en el Grupo 2 para los pacientes tratados con bevacizumab (13 frente a 12 meses, $p = 0,039$) (Figura 12).

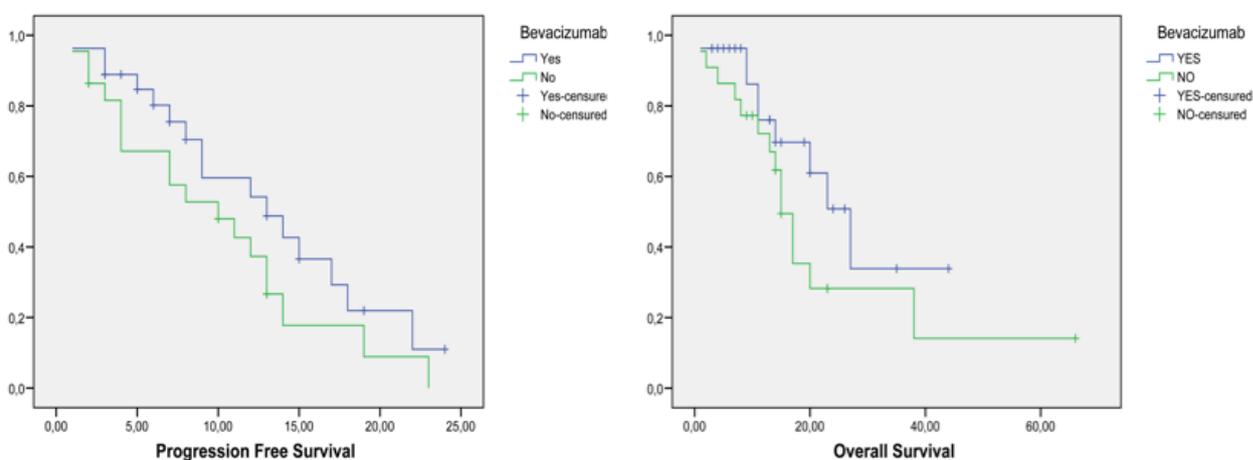
Figura 12. Supervivencia global (4.1) y Supervivencia libre de progresión (4.2) de los pacientes con expresión alta o moderada de LDH5 en función de si recibieron tratamiento con Bevacizumab.



5.1.5 Análisis de eficacia de tratamiento con Bevacizumab en función del estado mutacional de RAS

Los pacientes con mutaciones de RAS tratados con quimioterapia en combinación con Bevacizumab mostraron una tendencia favorable, no significativa, en la supervivencia libre de progresión, 13 vs 10 meses (p-valor= 0,07). La mediana de SG fue numéricamente superior para los pacientes con RASmut que recibieron bevacizumab, pero esta diferencia tampoco alcanzó la significación estadística (27 vs 15 meses; p = 0,22). Figura 13.

Figura 13. Supervivencia libre de progresión(6.1) y Supervivencia Global (6.2) en de pacientes con CCR portadores de mutaciones de RAS en función de si recibieron tratamiento con Bevacizumab.



Por otra parte, la mediana de SG de los pacientes tratados con bevacizumab fue similar entre los pacientes con tumores con mutaciones de RASmut y los pacientes con tumores RASwt (27,0 vs 27,0 meses, p=0,562).

5.2 Resección del Tumor Primario

De los 112 pacientes que componen nuestra base de datos, sesenta y dos pacientes (55,3%) fueron sometidos a resección del tumor primario antes de recibir quimioterapia (grupo 1); los 50 pacientes restantes (44,7%) no fueron intervenidos y recibieron el tratamiento sistémico como primer tratamiento de su enfermedad (grupo 2).

Las características de los pacientes se resumen en la tabla 15. La mediana de edad de los 112 pacientes fue de 68 años (67,5 grupo 1 vs 69.5 grupo 2). El porcentaje de

pacientes mayores de 70 años en el grupo 1 y 2 fue de 33 vs 50% respectivamente ($p=0.063$). También hubo diferencias entre ambos grupos en el porcentaje de mujeres (33% vs 55%, $p=0.025$), pacientes con PS 0-1 (85% vs 72%, $p=0.08$), pérdida de peso superior al 10% (3% vs 34%, $p=0.019$) y niveles elevados de CEA al diagnóstico (71% vs 90%, $p= 0.018$).

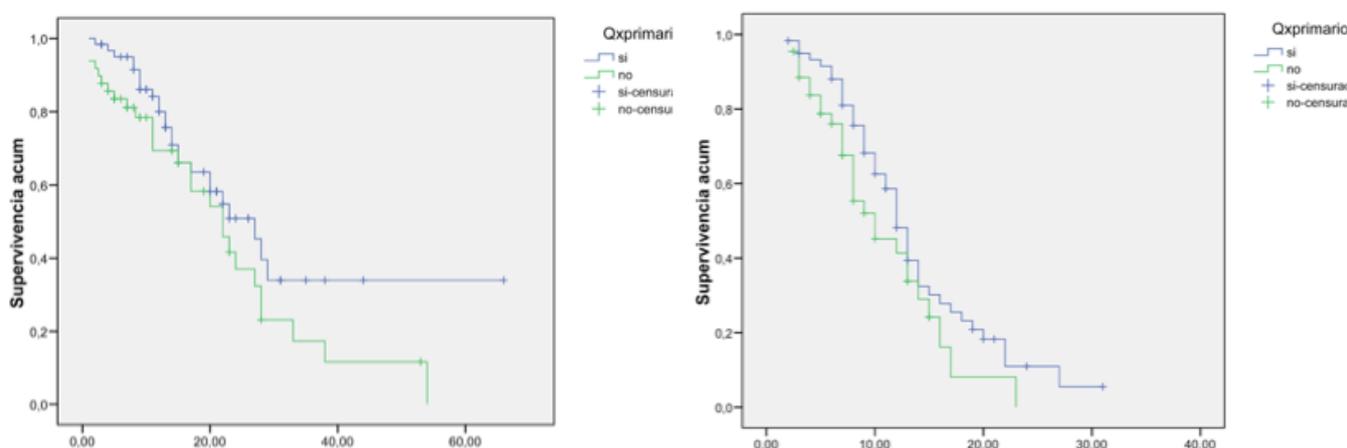
Tabla 15. Características de los pacientes en función de si fueron sometidos a cirugía del tumor primario.

	GRUPO 1. Resección Tumor Primario n 62	GRUPO2. NO resección tumor primario n 50	p Valor
Mediana Edad	67,5 años	69,5	
EDAD >70 años	21/62 (33%)	25/50 (50%)	0,063
SEXO V/M	31/62 (50%) vs 31/62 (50%)	35/50 (70%) vs 15/50 (30%)	0,025*
PS 0-1	52/61 (85,2%)	35/48 (72%)	0,089
HTA al diagnóstico	25/55 (45%)	18/43 (41%)	0,44
PERDIDA PESO >10%	7/51 (13%)	14/41 (34%)	0,019*
RECTORRAGIA	17/51 (33%)	18/42 (42%)	0,23
SINTOMAS OCLUSIVOS	8/51 (15%)	2/41 (4,8%)	0,09
>1 LOCALIZACIÓN METASTASICA	37/62 (59,6%)	23/50 (46%)	0,1
CEA ELEVADO	37/52 (71%)	38/42 (90%)	0,018*
ANEMIA	23/44 (52%)	23/41 (56%)	0,44
LDH ELEVADO	13/34 (38,2%)	19/31 (61%)	0,054
QUIMIOTERAPIA CON AVASTIN	44/62 (70,9%)	31/50 (62%)	0,21
MUTACIÓN KRAS	16/43 (37,2%)	33/50 (66%)	0,18

5.2.1 Supervivencia Global y Supervivencia libre de Progresión

La mediana de supervivencia global de los pacientes sometidos a resección del tumor primario fue de 27 meses, frente a 22 meses en el grupo de pacientes no operados ($p = 0.1$). El tiempo hasta la progresión también fue superior en el grupo de pacientes operados, aunque las diferencias tampoco alcanzan la significación estadística (12 vs 10 meses, $p=0,11$). Figura 14.

Figura 14. Supervivencia global (7.1) y Supervivencia libre de progresión (7.2) en función la resección del tumor primario.



5.2.2 Respuesta al tratamiento

De los 62 pacientes sometidos a resección del tumor primario, 45 (72.5%) recibieron tratamiento de quimioterapia en combinación con Bevacizumab (14 con esquema FOFLOX-B y 33 con esquema XELOX-B), los 17 restantes recibieron quimioterapia (3 esquema FOLFOX y 14 con esquema XELOX). De los 50 pacientes no operados 31 (62%) recibieron tratamiento de quimioterapia con Bevacizumab (13 FOLFOX-B y 18 XELOX-B), los 19 restantes recibieron quimioterapia (7 esquema FOLFOX y 12 esquema XELOX).

Ciento un pacientes fueron evaluables para respuesta, 58 en el grupo de pacientes intervenidos y 43 en el de pacientes no operados. De los once pacientes que no fueron evaluables, 4 pertenecían al grupo pacientes operados: uno falleció tras 2º ciclo de quimioterapia y tres disponían de insuficiente información en historia clínica. En el grupo de pacientes no operados hubo 7 pacientes no evaluables: 5 fallecieron

antes de la reevaluación (4 después del 2º ciclo y 1 tras el 1º ciclo de quimioterapia), otros dos pacientes carecían de información suficiente en la historia clínica.

La tasa de respuesta al tratamiento de los pacientes sometidos a resección del tumor primario fue del 67,4% (2 RC, 37 RP, 3 EE, 6 PE), frente al 48% en el grupo de pacientes no operados (1 RC, 23 RP, 10 EE y 9 PE), diferencias que no son estadísticamente significativas ($p=0,16$). Tabla 16.

Tabla 16. Respuesta en función de Cirugía del Tumor Primario

RESPUESTA	GRUPO1 PACIENTES OPERADOS	GRUPO2 PACIENTES OPERADOS	NO	p Valor
RESPUESTA COMPLETA	2 (3,4%)	1 (2,3%)		0,16
RESPUESTA PARCIAL	37 (63%)	23 (46%)		
ENFERMEDAD ESTABLE	13 (22,4%)	10 (23,2%)		
PROGRESIÓN ENFERMEDAD	6 (10%)	9 (20%)		

5.2.3 Complicaciones derivadas del tumor y postoperatorias

Nueve pacientes presentaron complicaciones mayores derivadas del tumor primario o posquirúrgicas. Ocho de estos pacientes no habían sido sometidos a resección del tumor primario: dos pacientes fallecieron por perforación abdominal, otros dos fallecieron a causa de oclusión intestinal y cuatro pacientes presentaron hemorragias severas que causaron la muerte a tres de ellos. Un paciente que había sido sometido a resección de tumor primario falleció a las 8 semanas por sepsis abdominal, tras recibir un ciclo de quimioterapia. La tasa de complicaciones mayores para el grupo de pacientes no operados fue del 16% (8/50) frente al 1,6% (1/62) en los operados ($p=0.007$). Tabla 17.

Tabla 17. Complicaciones Mayores derivadas del Tumor primario o posquirúrgicas

		Resección de Tumor Primario		Total
		Si	No	
Complicación	Si	1 (1.6%)	8 (16%)*	9
	No	61 (98.4%)	42 (84%)	103
Total		62	50	112

P= 0.007

De los ocho pacientes no operados que presentaron una complicación mayor derivada del tumor primario, seis habían sido tratados con quimioterapia en combinación con Bevacizumab. La tasa de complicaciones mayores en pacientes no operados tratados con Bevacizumab fue del 19,3% (6/31), frente al 0% en pacientes operados (p=0.004). No hubo diferencias en la tasa de complicaciones entre pacientes operados y no operados del tumor primario que no recibieron tratamiento de quimioterapia combinada con Bevacizumab: 5.5 vs 10.5% respectivamente (p=0.521). Tabla 18.

Tabla 18. Complicaciones Mayores derivadas del tumor primario o postquirúrgicas en función del tratamiento con Bevacizumab.

Bvacizumab				Cirugía Tumor Primario		Total
				si	no	
SI	Complicación	si	0	6*	6	
		no	44	25	69	
		Total	44	31	75	
NO	Complicación	si	1	2**	3	
		no	17	17	34	
		Total	18	19	37	

*p=0.004

**p=0.58

Los pacientes no intervenidos del tumor primario presentaron una tasa de neutropenia G3-4 significativamente superior a los operados (10.5 vs 3.9%, $p=0.043$), mientras que los pacientes intervenidos presentaron una mayor tasa de neuropatía G3-4 (15.3 vs 5.1%, $p=0.003$).

6. Análisis de las variables clínico-patológicas y moleculares pronósticos de supervivencia

6.1 Supervivencia Global

Se realizó un análisis univariante para evaluar la influencia de las características clínico-patológicas y moleculares en la Supervivencia Global. Las variables que se asociaron significativamente con peor SG fueron la presencia de Carcinomatosis Peritoneal (HR 1,78, 95% IC 1.6- 2,41, $p = 0,001$) y el número de localizaciones metástasis (2 o más órganos vs 1; HR 2,38, 95% IC 1.21- 3,58, p -valor 0,007).

La ausencia de resección del tumor primario (HR 1,44, IC del 95%: 0,94 a 2,75, p -valor de 0,08), el Performance Status de 2, la pérdida de peso superior al 10% antes del inicio del tratamiento, y no haber recibido bevacizumab junto con quimioterapia mostraron una tendencia no significativa a asociarse con peor pronóstico (p -valor $<0,2$). Tabla 19. Con aquellos factores que presentan asociación alta o dudosa (es decir: PS2, pérdida de peso $>10\%$, Tumor primario no operado, Carcinomatosis Peritoneal, metástasis en 2 o más localizaciones y tratamiento con bevacizumab), se realizó un análisis multivariante de Cox en dos fases (método Enter), la primera introduciendo todas las variables, donde se observó que la presencia de carcinomatosis peritoneal y la afectación metastásica multiorgánica eran las dos únicas variables a incluir en el siguiente análisis. De nuevo se realizó un análisis de regresión de Cox con esos dos factores. De acuerdo con el análisis multivariante de Cox, la presencia de CP (HR 1.764, 95% IC 1,67 a 2,60; $p = 0,017$), y de metástasis multiorgánicas (HR 1,438, IC del 95%: 1,13 a 4,57; $p = 0,02$) se asociaron independientemente con peor supervivencia OS (Tabla 20).

Tabla 19. Análisis Univariante de factores asociados a Supervivencia global.

VARIABLES n = 112	Análisis Univariante HR 95% CI	Log-Rank test p- valor	Significación estadística
Edad <70 > o = 70	1 1.31 (0.37-1.31)	1.269	NS
Sexo Varón Mujer	1 1.41 (0.58-1.73)	0.974	NS
Performance Status 0-1 2	1 1.20 (0.85-2.95)	0.142	Dudoso
Síntoma Pérdida Peso >10% Sangrado Intestinal Oclusión Intestinal	1,77 (0.31-2.87) 1.624 (0.56-1.85) 1.89 (0.47-3.7)	0.188 0.942 0.474	Dudoso NS NS
Cirugía Tumor Primario Si No	1 1.446 (0.94-2.75)	0.08	Dudoso
Localización de Metástasis Hígado Peritoneo Pulmón Ganglios linfáticos	1.20 (0.58-2.33) 1.78 (1.60-2.41) 0.86 (0.35-1.38) 0.83 (0.38-1.28)	0.662 0.002 0.16 0.25	NS Significativo NS NS
Número de órganos con metástasis 1 2 o más	1 2.38 (1.21-3.58)	0.008	Significativo
Mutaciones de Ras No Si	1 1.488 (0.59-2.11)	0.726	NS
Tratamiento con Bevacizumab Si No	1 1.32 (0.83-2.47)	0.189	Dudoso
Marcadores séricos CEA (elevado) LDH (elevado) Hemoglobina (baja)	1.19 (0.44-1.78) 1.50 (0.59-2.11) 1.45 (0.53-2.47)	0.746 0.723 0.991	NS NS NS
Sobreexpresión de pKDR No Si	1 1.43 (0.76-2.34)	0.495	NS
Sobreexpresión de LDH5 No Si	1 1.24 (0.65-2.76)	0.616	NS

Tabla 20. Análisis Multivariante de factores asociados a Supervivencia Global

Variable	Análisis Multivariado Hazard Ratio, 95% CI	p-Valor
Performance Status 2	1.202 (0.44-2.2)	0.98
Pérdida de peso >10%	1.787 (0.285-2.07)	0.2
No resección Tumor Primario	1.438 (0.57-2.234<9	0.73
Carcinomatosis Peritoneal	1.764 (1.67-2.60)	0.017*
No tratamiento con Bevacizumab	1.326 (1.13-4.57)	0.41
Afectación Multiorgánica	1.438 (1.13-4.57)	0.02*

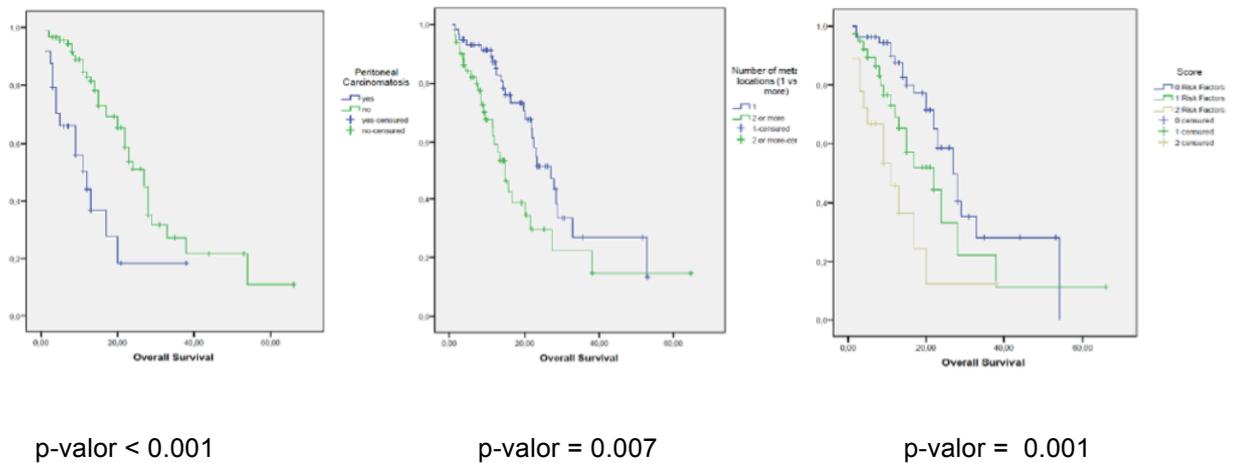
Las características clínico-patológicas de los pacientes en función de la presencia de Carcinomatosis Peritoneal y del número de órganos afectados (1 vs 2 o más) se resumen en la Tabla 21. No se observan diferencias significativas en la edad, el género, Performance Status, el estado mutacional de RAS o el uso de bevacizumab.

Tabla 21. Características clínico-patológicas en función de la presencia de Carcinomatosis peritoneal y del número de localizaciones metastásicas (1 vs 2 o más).

Variable	Carcinomatosis Peritoneal n= 24 (%)	No- Carcinomatosis Peritoneal n = 88 (%)	p-valor	Afectación multiorgánica n=52 (%)	Afectación de un órgano n=60 (%)	p-valor
Edad (años)	62.3 (39-77)	66.5 (47-83)	0.867	67.5 (39-83)	68 (42-81)	0.827
Sexo			0.437			0.327
Varón	15 (62.5%)	51 (57.9%)		33 (63.4%)	33 (55%)	
Mujer	9 (37.5%)	37 (42%)		19 (36.6%)	27 (45%)	
Performance Status			0.067			0.250
0-1	16 (66.6%)	71 (83.5%)		38 (76%)	49 (83%)	
2	8 (33.3%)	14 (16.5%)		12 (24%)	10 (17%)	
Síntomas relacionados con el tumor						
Pérdida de peso >10%	6 (28.5%)	15 (21.1%)	0.329	12 (29.2%)	9 (17.6%)	0.142
Sangrado intestinal	4 (19%)	31 (43%)	0.038*	16 (38%)	19 (37.2)	0.552
Síntomas oclusivos	1 (4.7%)	9 (12.6%)	0.281	2 (4.8 %)	8 (15.6%)	0.091
Cirugía de tumor primario			0.462			0.105
Si	14 (58.3%)	48 (54.5%)		25 (48%)	37 (61.6%)	
No	10 (41.7%)	40 (45.5%)		27 (52%)	23 (38.3%)	
Localización de las metástasis						
Hígado	13 (54.1%)	76 (86.3%)	0.001*	41 (78.8%)	48 (80%)	0.532
Peritoneo				18 (34.6%)	6 (10%)	0.002*
Pulmón	4 (16.6%)	28 (31.8%)	0.112	29 (55.7%)	3 (5%)	0.001*
Hueso	1 (4.1%)	2 (2.2%)	0.519	2 (3.8%)	1 (1.6%)	0.446
Ganglios linfáticos	11 (45.8%)	16 (18.1%)	0.007*	25 (48%)	2 (3.3%)	0.001*
Número de localizaciones metastásicas			0.002*			
1	6 (25%)	54 (61.3%)				
2 o más	18 (75%)	34 (38.6%)				
Marcadores séricos						
CEA elevado	17 (77.2%)	59 (81.9%)	0.417	37 (82.2%)	39 (79.5%)	0.477
LDH elevada	5 (41.6%)	27 (50.9%)	0.398	15 (50%)	17 (48.5%)	0.553
Hemoglobina baja (anemia G2 o más)	9 (45%)	37 (56.9%)	0.248	23 (57.5%)	23 (51.1%)	0.355
Grado de diferenciación			0.560			0.254
G1	5 (25%)	10 (18.1%)		7 (20.5%)	8 (19.5%)	
G2	11 (55%)	38 (69%)		24 (70.5%)	25 (60.9%)	
G3	4 (20%)	6 10.9%)		3 8.8%)	8 (19.5%)	
Estatus Mutacional de RAS			0.539			0.568
Mutado	7 (29.1%)	35 (40.2%)		18 (34.6%)	24 (40.6%)	
Salvaje	9 (37.5%)	31 (35.6%)		18 (34.6%)	22 (37.2%)	
Desconocido	8 (33.3%)	21 (24.1%)		16 (27.1%)	13 (22%)	
Tratamiento			0.344			0.234
FOLFOX/XELOX	15 (62.5%)	61 (69.3%)		19 (36.6%)	17 (28.3%)	
FOLFOX/XELOX + Bevacizumab	9 (37.5%)	27 (30.7%)		33 (63.4%)	42 (71.6%)	

Veinticuatro pacientes tenían CP en el momento del diagnóstico. La mediana de SG fue menor en los pacientes con CP, en comparación con los pacientes sin esta condición (12 vs 27,0 meses, $p < 0,001$) (Figura 1a). Cincuenta y dos pacientes (46,4%) presentaron metástasis en dos o más órganos (metástasis multiorgánicas), y tuvieron una supervivencia significativamente más corta en comparación con aquellos con metástasis de un solo órgano (14,6 vs 27 meses, $p = 0,007$) (Figura 1b). La mediana de SG para los pacientes que no presentan ningún factor pronóstico independiente fue de 27,0 meses (puntuación 0), en comparación con 16,5 meses para los pacientes con uno (puntuación 1), y de 11,4 meses para los pacientes con ambos (puntuación 2) (log-rank $P = 0,001$). Las curvas de Kaplan-Meier para los tres grupos se muestran en la Figura 15.

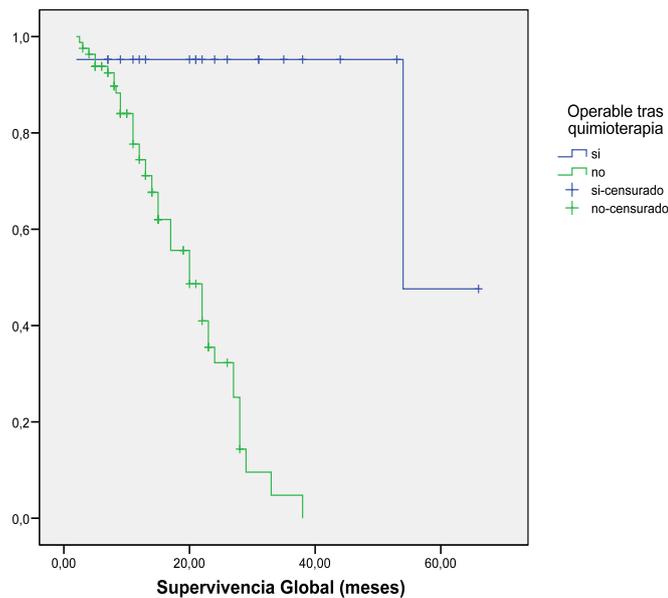
Figura 15. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global en función de la presencia de Carcinomatosis Peritoneal (10.a), el número de órganos afectados (10.b) y el número de factores de riesgo: 0 vs 1 vs 2 (10.c)



Veintiún pacientes (18%) fueron candidatos a metastatectomía quirúrgica después de la quimioterapia de primera línea. La tasa fue significativamente mayor en los pacientes con una única localización metastásica frente a aquellos con metástasis multiorgánicas (29,3 vs 9,7%, $p = 0,009$), menor en los pacientes con CP vs aquellos sin CP (10,5 vs 22,61, $p = 0,19$), y mayor en los pacientes sin ninguno de esos factores, comparado con los pacientes con uno de ellos, y pacientes con ambos (30,1 vs 11,1 vs 7,1%, P

= 0,038). La mediana de SG para los pacientes tratados con metastatectomía no se había alcanzado en el momento de este análisis, después de una mediana de seguimiento de treinta y seis meses frente a 20 meses para el resto de los pacientes ($P < 0,001$). Figura 16.

Figura 16. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global en función de la resecabilidad de las metástasis tras la quimioterapia de primera línea.



$p\text{-valor} < 0.001$

6.2 Supervivencia Libre de Progresión

Se realizó un análisis univariante para evaluar la influencia de las características clínico-patológicas y moleculares en la Supervivencia Libre de Progresión. Las variables que se asociaron significativamente con peor SLP fueron la presencia de Carcinomatosis Peritoneal (HR 1,78, 95% IC 1.6- 2,41, $p = 0,001$), y no haber sido sometido a resección del tumor primario (HR 2,38, 95% IC 1.21- 3,58, $p\text{-valor} 0,007$). La ausencia de tratamiento con Bevacizumab (HR 1,44, IC del 95%: 0,94 a 2,75, $p\text{-valor}$ de 0,08), el Performance Status de 2 o más, y la presencia de niveles elevados de CEA al diagnóstico mostraron una tendencia no significativa a asociarse con peor SLP ($p\text{-valor} < 0,2$)

Con los factores que presentan asociación alta o dudosa (es decir: PS2, Tumor primario no operado, Carcinomatosis Peritoneal, niveles elevados de CEA y ausencia de tratamiento con bevacizumab), se realizó un análisis multivariante de Cox en dos fases (método Enter), la primera introduciendo todas las variables, que la presencia de carcinomatosis peritoneal y la ausencia de resección del tumor primario fueron las dos únicas variables a incluir en el siguiente análisis. De nuevo se realizó un análisis de regresión de Cox con esos dos factores. De acuerdo con el análisis multivariante de Cox, la presencia de carcinomatosis peritoneal (HR 1.764, 95% IC 1,67 a 2,60; $p = 0,017$), y la ausencia de resección del tumor primario (HR 1,438, IC del 95%: 1,13 a 4,57; $p = 0,02$) se asociaron independientemente con peor SLP.

V. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio confirman la elevada tasa de sobreexpresión de VEGFR2/pKDR y LDH5 en pacientes con CCR avanzado, aunque no hemos detectado diferencias significativas en la SLP o la SG basadas en su presencia.

1. VEGFR2/pKDR como biomarcador pronóstico y predictivo en CCR avanzado

La frecuencia de sobreexpresión en pKDR-VEGFR2 detectada en nuestra serie de pacientes con CCR avanzado ha sido del 91,7 %. La elevada expresión de este marcador de angiogénesis está en línea con otras investigaciones publicadas hasta la fecha, aunque la tasa encontrado en nuestra serie es superior a la descrita en estudios previos. Koukourakis et al. analizó una serie de 128 pacientes con cáncer de colon resecado (Estadios IIa-III) encontrando una tasa de sobreexpresión de pKDR en células tumorales del 76,5 % ⁽¹²⁵⁾. Estas diferencias podrían explicarse por el hecho de que nuestros pacientes se encontraban en una etapa avanzada de la enfermedad, donde los procesos angiogénicos están probablemente en una fase diferente de su desarrollo. De hecho, otros autores como Takahashi et al, observaron un aumento en el número de nuevos vasos en pacientes con enfermedad metastásica en comparación con los que presentan los tumores en sus etapas más iniciales, con una mayor proporción de sobreexpresión de pKDR en pacientes con enfermedad avanzada (62,5 vs. 28,6 %) , así como una fuerte relación entre la expresión de pKDR con la densidad vascular y la expresión de VEGF-A ⁽¹²⁴⁾. Sin embargo, la naturaleza retrospectiva de todos estos estudios, llevados a cabo con muestras pequeñas de pacientes y medidos con diferentes anticuerpos anti-KDR y diferentes sistemas de clasificación para

la definición de alta o baja expresión del marcador, hace que sea muy difícil comparar los resultados.

La mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha sobre el valor pronóstico de la expresión de VEGFR-2/KDR indican que la sobreexpresión de este marcador se asocia con un pronóstico desfavorable para los pacientes. Esta observación se ha encontrado tanto en los pacientes que presentan la enfermedad en etapas iniciales y que han sido sometidos a cirugía, como en pacientes con enfermedad metastásica. Así mismo, el pronóstico desfavorable de la expresión de VEGFR/pKDR se ha observado midiendo su expresión tanto por técnicas de inmunohistoquímica ⁽¹²⁵⁾, como cuando se analiza mediante técnicas de expresión génica ⁽¹⁴⁰⁾. En nuestro estudio se observó una tendencia desfavorable para los pacientes con sobreexpresión VEGFR/pKDR tanto en términos de SLP como de SG, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El pequeño tamaño muestral limita nuestra capacidad para encontrar estas diferencias, especialmente teniendo en cuenta el pequeño número de pacientes con baja expresión de VEGFR-2/pKDR. Cabe señalar que los pacientes con baja expresión de VEGFR/pKDR presentaban características clínicas más favorables, con menores niveles de CEA y LDH, así como menor tasa de pacientes con pérdida de peso superior al 10% en el momento del diagnóstico. Como se mencionaba anteriormente, la unión de VEGF a VEGFR-2/KDR conduce a la fosforilación y la activación de una vía de señalización intracelular que finalmente activa procesos tales como la proliferación celular, la migración, la inhibición de la apoptosis y la maduración de estructuras vasculares de células endoteliales ^(141,142). Se piensa que la baja expresión de VEGFR/pKDR podría estar asociada con un comportamiento del tumor menos agresivo, con una tasa más baja de proliferación celular y menor capacidad de invasión y metastatización. Tal comportamiento biológico diferenciado podría explicar la diferencias clínicas encontradas entre las dos poblaciones de pacientes.

Por otra parte, todos los pacientes con baja expresión de VEGFR/pKDR alcanzaron una respuesta radiológica tras la tratamiento de quimioterapia (tasa de respuesta del 100% frente a 46%, $p = 0,05$), lo que sugiere que los

pacientes con tumores con baja expresión pKDR podrían ser una subpoblación que no sólo presenta un mejor perfil clínico, sino también una mayor sensibilidad tumoral a la quimioterapia. En este sentido, Clavani et al, describieron que la estimulación autocrina de la supervivencia generada por el funcionamiento de VEGFR/KDR en líneas celulares ofrecía a estas poblaciones de células un mecanismo de resistencia a la apoptosis inducida por quimioterapia en situaciones de estrés e hipoxia inducida, con la consiguiente reducción en la eficacia de tratamientos citostáticos ⁽¹⁴³⁾.

El análisis del subgrupo de pacientes con sobreexpresión VEGFR/pKDR en función del tratamiento con terapia antiangiogénica, confirma que los pacientes tratados con bevacizumab presentaron una SLP superior, así como una tendencia favorable en SG en comparación con los tratadas exclusivamente con quimioterapia. El número limitado de pacientes con baja expresión VEGFR/pKDR identificados en nuestro estudio no nos permite analizar el beneficio que Bevacizumab podría añadir en este subgrupo de pacientes, y también nos impidió evaluar el hipotético papel pronóstico de este marcador en este contexto.

Estudios previos han asociado el estado mutacional de p53 con la respuesta a bevacizumab en pacientes con CCR avanzado, aunque los resultados son controvertidos. Algunos autores no han encontrado una asociación entre el estado de p53 y la eficacia de la droga ⁽¹⁴⁴⁾, mientras otros han informado de un aumento en la SG en pacientes con tumores que expresan p53 en comparación con aquellos que no lo hacen ⁽¹⁴⁵⁾. Más recientemente, Zhang et al. Han publicado una firma genética que incluye el análisis de la expresión de tres genes: VEGF-A, FLT1 y KDR, que parece diferenciar dos poblaciones con diferente pronóstico para pacientes con mutaciones de p53 tratados con bevacizumab y, mientras que no lo hace en pacientes con p53 tipo salvaje ⁽¹⁴⁰⁾.

2. LDH5 como biomarcador pronóstico y predictivo en CCR avanzado

La tasa de sobreexpresión de LDH5 en células tumorales de cáncer colorrectal avanzado detectada en nuestra serie de pacientes fue del

87,7%. Esta elevada tasa de expresión de este marcador de la angiogénesis está en línea con otras investigaciones publicadas hasta la fecha. Kourkourakis et al, detectó en una serie de 128 pacientes con cáncer de colon resecaos en estadios iniciales una tasa de expresión de LDH5 del 77,3%⁽¹²⁹⁾, y los mismos autores comunicaron en otra serie con 75 pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal avanzado, una tasa de expresión de LDH5 del 68 %⁽¹³⁹⁾. Nuestros resultados confirman que esta proteína es altamente expresado en tumores colorrectales.

LDH5 es una de las cinco isoenzimas de LDH y, al parecer, el más importante para la promoción de la glucólisis anaeróbica. LDH5 está regulado transcripcionalmente por los factores inducibles por hipoxia (HIF) 1a y 2a, y su sobreexpresión se ha relacionado con la ganancia por parte de las células tumorales de ventajas para su proliferación, como un aumento en la capacidad infiltración ganglionar y diseminación metastásica a distancia⁽¹³⁹⁾. De hecho, su presencia se ha asociado con un peor pronóstico en pacientes con cáncer operable en estadio I-III, con una peor supervivencia en comparación con aquellos con expresión negativa de LDH5 (HR 15,1, $p = 0,0003$)⁽¹²⁵⁾. Resultados similares han sido comunicados en pacientes con diagnóstico de carcinoma de células no pequeñas de pulmón (NSCLC)⁽¹⁴⁶⁾, que también tuvieron una supervivencia significativamente más pobre que la observada en el grupo de pacientes con baja reactividad inmunohistoquímica a LDH5, tanto cuando se mide en el citoplasma como en el núcleo celular. Además, Scartozzi et al, observaron resultados similares en pacientes con niveles séricos de LDH elevados⁽¹⁴⁷⁾. Estos pacientes presentaron peores resultados tanto en SLP (4,2 frente a 8 meses, $p = 0,003$), como en SG (19,6 vs 34,9 meses, $p = 0,0014$), en comparación con los pacientes con bajos niveles de LDH en suero. A pesar de todos estos datos, en nuestra serie la alta expresión de LDH5 no se asoció con factores clínicos clásicos asociados con peor pronóstico, tales como la pérdida de peso, el mal Performance Status o la presencia de más de una localización metastásica. Cabe señalar que los pacientes con tumores con baja expresión LDH5 presentaban características clínicas similares a los que tenían tumores con alta

expresión, por ejemplo, no se observaron diferencias en los niveles séricos de CEA o LDH, o en la presencia de sangrados rectales o síntomas oclusivos.

No hemos encontrado diferencias en tasa de respuesta, SLP ni SG en nuestro análisis. Es importante mencionar que existe una diferencia significativa en la tasa de pacientes tratados con bevacizumab entre los pacientes con baja y alta expresión de LDH5 (37,5 vs 69%, $p = 0,02$), lo que significa que los pacientes con las característica molecular de hipotéticamente peor pronóstico, habrían sido tratados con un protocolo de tratamiento más activo. Este importante desequilibrio podría explicar en parte la tendencia, no significativa pero numéricamente superior, hacia una mejor supervivencia global entre los pacientes con sobreexpresión LDH5.

El análisis de los pacientes con sobreexpresión LDH5 en función del tratamiento con terapia antiangiogénica, confirma que los pacientes tratados con bevacizumab presentaron un mayor SLP, y mostraron una tendencia favorable en términos de SG en comparación con los pacientes tratados exclusivamente con quimioterapia. El número limitado de pacientes con baja expresión LDH5 identificados en nuestro estudio no nos permite analizar el beneficio que Bevacizumab podría añadir a la quimioterapia en pacientes con baja expresión de este marcador de la angiogénesis, y también nos ha impedido evaluar el hipotético papel pronóstico del marcador en este contexto.

En estudios previos si se asoció una mejor evolución de los pacientes con sobreexpresión de proteínas proangiogénicos cuando eran tratados con Bevacizumab. Tanto pacientes con altos niveles de VEGFR/pKDR medidos mediante técnicas de inmunohistoquímica, como en pacientes con alto nivel sérico de LDH se encontraron beneficios en términos de tasa de respuesta, SLP y la SG, en comparación con los pacientes con alta expresión de estos marcadores tratados exclusivamente con quimioterapia ^(147,148).

Todas estas experiencias muestran que la adición de bevacizumab a la quimioterapia permite mejorar el resultado clínico en un subgrupo de pacientes que por lo general se presentan con una historia natural adversa.

En este contexto, bevacizumab parece ser capaz de revertir el mal pronóstico condicionado por la biología del tumor. El hallazgo de una mayor tasa de respuesta y aumento en la mediana de SLP en los pacientes con altos niveles de expresión LDH5 que reciben Bevacizumab frente a los que no recibieron el fármaco, podría representar una corroboración de esta observación.

3. Análisis del estado mutacional de RAS como biomarcador pronóstico y predictivo en CCR avanzado

El valor predictivo y pronóstico de las mutaciones del gen KRAS en pacientes con CCR avanzado tratados en primera línea con quimioterapia y fármacos anti-EGFR ha sido confirmado por los análisis retrospectivos de los ensayos fase III con Cetuximab y Panitumumab ^(65,149). Amado et al, publicaron los datos de un ensayo aleatorio que comparaba la monoterapia con Panitumumab con el mejor tratamiento de soporte (BSC) en pacientes diagnosticados de CCR avanzado y refractarios a quimioterapia. Encontraron mutaciones de KRAS en el 43% de los pacientes, y observaron que la eficacia de Panitumumab fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con tumores KRAS wild type en términos de SLP (12,3 vs 7,3 semanas, $p < 0,001$), tasa de respuesta (17% vs 0%) y SG (CRI 0,67; IC 95%, 0,55-0,82) ⁽⁶⁵⁾. Del mismo modo, Karapetis et al, comunicaron los resultados del estudio retrospectivo de las muestras de 394 pacientes incluidos en un ensayo de fase III que comparaba Cetuximab vs mejor tratamiento de soporte en pacientes con CRC avanzado refractarios a quimioterapia. Encontraron mutaciones de KRAS en el 42,3% de los pacientes, y la presencia de esta aberración molecular estaba relacionada con falta de beneficio de Cetuximab, en términos de SG (4,8 vs 9,5 meses, HR 0,55; IC del 95%, 0,41-0,74; $p < 0,001$) y supervivencia libre de progresión (1,9 vs 3,78 meses, HR 0,40; IC del 95%, 0,30-0,54; $p < 0,001$) ⁽¹⁴⁹⁾. El estado mutacional del gen KRAS no tuvo influencia en la supervivencia entre los pacientes tratados con el mejor tratamiento de soporte. Más recientemente, se han descrito las mutaciones de NRAS, otro miembro de la familia del oncogén RAS, que aparecen en el 2-5% de los

pacientes con CRC avanzado, y que también son predictores de ausencia de respuesta al tratamiento anti-EGFR. Doudillard et al, analizaron retrospectivamente la eficacia y seguridad de Panitumumab asociado a FOLFOX en función de la presencia de mutaciones de RAS (KRAS y NRAS). Observaron que mutaciones de NRAS en un 3,4% de los pacientes, y su presencia se asoció a una menor SLP (10,1 vs 7,9 meses, CRI 0,72; IC del 95%, 0,58-0,90; $p = 0,004$) y menor SG (26,0 vs 20,2 meses, HR 0,78; 95 % CI, 0,62 a 0,99; $P = 0,04$) ⁽¹⁵⁰⁾. Por lo tanto, la presencia de mutaciones RAS se considera un factor predictivo negativo de la respuesta a las terapias anti-EGFR. Sin embargo, su papel como factor pronóstico de SG en pacientes tratados con quimioterapia sola o en combinación con bevacizumab sigue siendo dudoso. Algunos autores han relacionado la presencia de mutaciones de RAS con una menor supervivencia de los pacientes con CCR avanzado ⁽¹⁵¹⁾, pero su papel como factor pronóstico sigue siendo controvertido.

Los datos de nuestro estudio sugieren que el estado mutacional de RAS no tiene un valor pronóstico para la SLP o SG en pacientes con CCR avanzado tratados con quimioterapia estándar de primera línea. Nuestro estudio, al igual que otros estudios publicados hasta la fecha para explorar esta cuestión, tiene un carácter retrospectivo y proporciona resultados cuestionables. Nuestros resultados están de acuerdo con datos de otros pequeños estudios retrospectivos, que no encontraron relación entre el estado de RAS y la supervivencia de los pacientes ^(152, 153, 154). Seung et al ⁽¹⁵³⁾, analizaron 103 pacientes evaluables para el estado mutacional de KRAS tratados con quimioterapia sin tratamiento asociado frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico, y no observaron diferencias en la tasa de respuesta, la supervivencia libre de progresión ni la supervivencia global en función del estado de RAS. Dos grandes estudios de colaboración del Kristen-RAS Colorectal Collaborative Group Cáncer (RASCAL) mostraron resultados contradictorios ^(154,155). Mientras que el primer estudio RASCAL encontró un aumento del riesgo de recurrencia y muerte relacionado con la mutación KRAS, el segundo estudio matiza esta observación, restringiendo el valor pronóstico negativo para la SLP sólo a los pacientes portadores de

la mutación G12V en pacientes con estadio C de Dukes. Es difícil comparar los resultados de todos estos estudios retrospectivos, ya que hay muchos factores de confusión que pueden afectar a estos hallazgos. La mayor parte de estas series se basan en pequeñas muestras de pacientes, y ninguno de los publicados hasta la fecha incorporaba en su análisis la presencia de mutaciones de NRAS, pero es notable que la mayoría de ellos coinciden en concluir que no existe una relación entre el estado de la mutación RAS y el pronóstico de los pacientes.

Por otra parte, no hemos encontrado ninguna relación entre la presencia de mutaciones de RAS y la eficacia de Bevacizumab. Hemos observado que los pacientes con mutaciones RAS presentan una mediana de SLP y SG numéricamente superior (aunque las diferencias no son estadísticamente significativas), si son tratados con Bevacizumab. Por otra parte, no hemos observado ninguna diferencia en la SLP o SG en los pacientes tratados con bevacizumab de acuerdo con el estado mutacional de RAS. Nuestros hallazgos sugieren que las mutaciones de RAS no tiene un valor predictivo de la eficacia de Bevacizumab en pacientes con CCR avanzado. Nuestros resultados son consistentes con estudios retrospectivos anteriores. Hurwits et al, tampoco observó ninguna interacción aparente entre el estado mutacional de RAS y la SLP en pacientes tratados con bevacizumab y quimioterapia con Irinotecan y Fluoropirimidinas ⁽¹⁵⁵⁾. Más recientemente, el estudio MAX confirmó que el estado mutacional de KRAS no era un factor pronóstico de SG ni predictivo de respuesta a Bevacizumab en pacientes con CCR avanzado ⁽¹⁵⁶⁾. Estos dos estudios analizaron el papel de las mutaciones del gen KRAS en pacientes tratados con quimioterapia con irinotecán o mitomicina asociada a bevacizumab. Estos esquemas no son los regimenes de quimioterapia de primera línea más comúnmente utilizados actualmente. Seung et al ⁽¹⁵³⁾ comunicaron los datos de un estudio retrospectivo de 32 pacientes con CCR avanzado tratados con bevacizumab y quimioterapia citotóxica basada en Oxaliplatino. Observaron que el estado de KRAS no era ni predictivo de respuesta para Bevacizumab, ni un factor pronóstico de SG para estos pacientes. Todos nuestros pacientes recibieron tratamiento citotóxico estándar con

Oxaliplatino asociado a Fluoropirimidinas con o sin bevacizumab, y se analizaron las mutaciones KRAS y NRAS y, lo que apoya de forma consistente la ausencia de influencia del estado mutacional de RAS en la eficacia del tratamiento con Bevacizumab.

4. Análisis del impacto pronóstico de la resección del tumor primario en pacientes con CCR avanzado

Los datos de nuestro estudio, al igual que los de los estudios publicados hasta la fecha que exploran el potencial beneficio de la cirugía del tumor primario en CCR avanzado, tiene una naturaleza retrospectiva y proporciona resultados controvertidos. Cook et al, publicaron los datos retrospectivos de más de 26.000 pacientes con CCR avanzado tratados entre 1988 y 2000, de los que el 66% habían sido tratados mediante resección del tumor primario. Los pacientes que se sometieron a cirugía eran más jóvenes (mediana, 67 vs. 70,3 años), presentaban una menor tasa de carcinomatosis peritoneal y de carcinomas rectales. Estos pacientes alcanzaron una mediana de SG y una tasa de supervivientes al año superior a los pacientes no operados (46 vs. 11%). Sin embargo, este estudio no proporciona información sobre los síntomas existentes antes de la cirugía, del tipo de tratamiento de quimioterapia administrado, ni del número de localizaciones metastásicas que presentaban los pacientes, todos ellos factores pronósticos importantes cuyo desbalance entre los grupos podría explicar las diferencias observadas ⁽¹⁵⁷⁾. Del mismo modo, Karoui et al. publicaron un estudio multicéntrico que involucraba a 208 pacientes asintomáticos con CCR avanzado tratados en Francia entre 1998 y 2007. Ochenta y cinco pacientes fueron tratados con cirugía del tumor primario, y presentaron una mediana de SG superior a la del grupo de pacientes no operados (31 vs. 22 meses) ⁽¹⁵⁸⁾. Más recientemente, Venderbosch et al. han comunicado los resultados de un análisis retrospectivo de 847 pacientes incluidos en los estudios fase III CAIRO y CAIRO2, en los que 547 pacientes fueron sometidos a resección del tumor primario. Los autores encontraron un aumento tanto de SLP y SG en el grupo de pacientes que fueron sometidos a cirugía ⁽¹⁵⁹⁾. Finalmente, en el

Congreso de la Asociación Americana de Oncología Médica (ASCO) de 2012, Faron et al. presentaron los resultados de una serie de 810 pacientes (478 con la cirugía y 332 sin cirugía), y los resultados preliminares fueron consistentes con estudios previos que observaron mayores tasas de supervivencia en pacientes con cirugía del tumor primario ⁽¹⁶⁰⁾.

Como era de esperar, en nuestra serie los pacientes sometidos a resección tumoral presentaban características de mejor pronóstico, con una menor edad, mayor tasa de pacientes con buen estado funcional, menor tasa de pérdida de peso, menor proporción de pacientes con niveles séricos elevados de CEA, y una mayor tasa de exposición a Bevacizumab. Observamos una tendencia favorable en los pacientes sometidos a la resección del tumor primario en las tres variables de eficacia (tasas de respuesta 67,4 vs. 55,8%; SLP 12 vs 10 meses; y SG 27 vs 22 meses). Estas diferencias sugieren la existencia de diferentes perfiles de pacientes que pueden influir en la indicación de la cirugía del tumor primario. En este sentido, cabe destacar el trabajo publicado por Poultsides et al, que analizaron su experiencia con 233 pacientes diagnosticados de CRC avanzado y asintomáticos entre 2000 y 2006. Los pacientes fueron tratados con un régimen de quimioterapia de 5-FU, combinado con irinotecan u Oxaliplatino, asociado o no a Bevacizumab. Ninguno de estos pacientes fue sometido a resección del tumor primario previo al inicio del tratamiento. Observaron que tan sólo el 7% de los pacientes necesitó cirugía de emergencia para complicaciones relacionadas con el tumor primario, otro 4% requirió una intervención local (radiación o colocación de prótesis rectal), mientras que el 89% restante no necesitó ningún tipo de intervención. Los autores concluyeron que los pacientes CRC avanzado y la cirugía del tumor primario podría evitarse si son tratados con regímenes modernos de quimioterapia ⁽¹⁶¹⁾. Del mismo modo, McCachill et al. publicaron los resultados de un ensayo clínico prospectivo fase II que analizaba el uso combinado de FOFLOX-bevacizumab en pacientes diagnosticados de CRC avanzado no sometidos a la resección del tumor primario. Encontraron que la mediana de supervivencia para los 86 pacientes incluidos en el ensayo fue de 19,9 meses, con una tasa de

complicaciones mayores relacionadas con el tumor primario que precisaron cirugía del 14%, y con una tasa de mortalidad del 2,3% ⁽¹⁶²⁾. Por último, una revisión Cochrane que incluye un análisis combinado de 7 estudios aleatorizados con un total de 1086 pacientes, concluye que la resección del tumor primario no está asociada consistentemente con una mejoría de la SG, ni reduce significativamente el riesgo de complicaciones como obstrucciones intestinales, perforaciones intestinales o sangrados gastrointestinales ⁽¹⁶³⁾. Ya que en ninguno de estos estudios se evaluaron los potenciales efectos de la quimioterapia en la evolución de la enfermedad, ni se controlaban todas las posibles variables de confusión, debemos esperar a los resultados de futuros ensayos clínicos aleatorizados para obtener una mejor comprensión de los beneficios reales que resección del tumor primario ofrece a este tipo de pacientes.

En nuestra serie hemos encontrado una tasa de complicaciones relacionadas con el tumor primario del 16%. Es de destacar que la incidencia de complicaciones entre los pacientes tratados con bevacizumab, fue significativamente mayor entre los pacientes no sometidos a resección del tumor primario (19,3% vs 0%). Por el contrario, entre los pacientes tratados sólo con quimioterapia (sin Bevacizumab), no se observaron diferencias en la tasa de complicaciones locales entre los pacientes tratados con y sin cirugía, lo sugiere que bevacizumab podría ser un factor de riesgo para los pacientes sin resección previa del tumor primario. La tasa de complicaciones en nuestro estudio es comparable a los publicados anteriormente: Scheer et al. reportado una tasa de oclusión intestinal del 13,9% y una tasa de sangrado de 3% en pacientes no sometidos a cirugía del tumor primario ⁽¹⁶⁴⁾; Scoogins et al. comunicaron una tasa de obstrucción intestinal del 9% ⁽¹⁶⁵⁾; Pultsides et al. comunicaron en su serie un 11% de obstrucción o perforación intestinal que requirieron algún tipo de tratamiento local ⁽¹⁶¹⁾; y, finalmente, en el estudio de McCachill et al, que incluía a pacientes con cirugía de tumor primario tratados con régimen de quimioterapia con bevacizumab, la tasa de complicaciones relacionadas con la tumor primario era muy similar, el 14% ⁽¹⁶²⁾, aunque la tasa de mortalidad fue del 2,3%, mucho menor que en nuestra estudio.

Las diferencias en las características clínicas (pacientes más jóvenes, con una mejor PS y menores tasas de comorbilidades) y el hecho de que los pacientes participaban en un ensayo clínico que probablemente condicionó más intervenciones quirúrgicas de rescate y un abordaje más agresivo podrían explicar las diferencias entre los resultados. Además, el riesgo de complicaciones postoperatorias asociadas a los fármacos antiangiogénicos como bevacizumab es conocido y han sido descritas ampliamente, cuando los pacientes reciben el fármaco antes de una intervención quirúrgica ⁽¹⁶⁶⁾. Sólo un paciente de nuestra serie, sometido a resección del tumor primario sufrió una importante complicación secundaria a la cirugía (sepsis abdominal después del primer ciclo de la quimioterapia) que representa el 1,6% de la población de pacientes. Estos datos están por debajo de las tasas previamente publicadas de morbilidad y mortalidad, que varía entre el 20-30% y 1-6%, respectivamente ^(163,166). Sin embargo, es difícil evaluar la tasa real de morbi-mortalidad de la cirugía en nuestro estudio, ya que nuestros criterios de elegibilidad se centran estrictamente en el análisis de pacientes que habían recibido quimioterapia, y es posible que otros pacientes que inicialmente se sometieron a cirugía del tumor primario presentasen complicaciones quirúrgicas que les impidiesen recibir un régimen de quimioterapia y, por lo tanto, no han sido identificados ni incluidos en nuestro análisis.

La combinación de Bevacizumab con la quimioterapia se asoció significativamente con una mayor tasa de respuesta y un aumento en la SLP, y también se observó una tendencia favorable en SG, aunque las diferencias no alcanzaron la significación. El beneficio de la adición de bevacizumab fue homogéneo en todos los grupos, lo que es consistente con los datos publicados hasta la fecha ^(162,166). Igualmente los resultados de toxicidad de nuestro estudio fueron concordantes con los observados en los de estudios previos.

5. Análisis de las características clínico-patológicas y moleculares con implicación pronóstica en CCR avanzado

Nuestros resultados indican que presencia de carcinomatosis peritoneal (CP) y de afectación metastásica multiorgánica, son predictores independientes de peor SG. Nuestro estudio, al igual que otros estudios publicados hasta la fecha que exploran factores predictivos de supervivencia en esta población, es retrospectivo y presenta los sesgos propios de este tipo de análisis que hay que tener en cuenta a la hora de interpretar sus resultados. Yun et al, publicaron el resultado de un análisis retrospectivo con 503 pacientes con diferentes estadios de CRC que fueron sometidos a cirugía, 376 de los cuales fueron tratados con intención paliativa. Encontraron que los posibles predictores de supervivencia para el grupo sometido a tratamiento paliativo eran los niveles séricos de CEA, el grado de diferenciación del tumor, la resección del tumor primario y el tratamiento con quimioterapia; pero para los 131 pacientes con enfermedad incurable asintomática, sólo el haber recibido tratamiento con quimioterapia se relacionaba de forma independiente con la SG ⁽⁴⁸⁾. Estos datos son difícilmente comparables con nuestros resultados, ya que en dicho estudio se incluye una población más heterogénea, con pacientes operados con diferentes intenciones (cirugía curativa y cirugía paliativa), en el que no todos los pacientes fueron tratados con quimioterapia; que resultó ser el único factor pronóstico independiente relacionado con la supervivencia global para los pacientes con enfermedad avanzada. Más recientemente, Miyamoto et al ⁽⁴⁹⁾, han comunicado los datos de 161 pacientes con CCR avanzado tratados en su institución con quimioterapia sistémica de primera línea. Observaron que la mediana de SG fue de mayor para los pacientes con metástasis en un sólo órgano en comparación con aquellos con metástasis multiorgánicas (dos o más ubicaciones), mientras que no encontraron diferencias significativas entre los pacientes con metástasis en dos frente a tres o más órganos. De acuerdo a sus análisis multivariante, los tumores localizados en el colon izquierdo y la resección R0 de las lesiones metastásicas se asocian de forma independiente con un mejor

pronóstico para estos pacientes. Los pacientes de este estudio podían haber recibido quimioterapia con Fluoropirimidinas con o sin Oxaliplatino o irinotecan, con o sin bevacizumab o fármacos anti-EGFR. Es importante destacar que el 34% de los pacientes pudieron ser rescatados mediante metastatectomía tras completar el tratamiento de quimioterapia. En su cohorte de pacientes el 18% tenían metástasis peritoneales (31% en el grupo de metástasis multiorgánicas frente al 6% en la subpoblación de metástasis en un solo órgano), pero este factor no se asoció con la SG en el análisis univariante y no se incluyó en el análisis multivariante. Cabe resaltar que el 50% de los pacientes no recibió terapias dirigidas combinadas con quimioterapia como tratamiento de primera línea, lo que es una tasa menor a la de nuestra población (76%); y que no se comunican datos de otros posibles factores pronósticos, tales como los niveles séricos de CEA o las mutaciones de RAS, que también podría desempeñar un papel importante en este contexto. De nuevo, toda esta heterogeneidad en las características clínicas y patológicas de las series hacen muy difícil la comparación de los resultados.

Nuestro estudio se centra en una cohorte de pacientes más homogénea, todos ellos con enfermedad metastásica inoperable al diagnóstico, y todos ellos tratados con regímenes óptimos de quimioterapia de primera línea. Los resultados de nuestro estudio deben ser, por tanto, sólo considerados para los pacientes en esta situación concreta. En nuestro análisis la presencia de enfermedad metastásica en más de un órgano es factor pronóstico independiente asociado a peor SG. La diferencia (14 vs 27 meses) es menor que la comunicada por Miyamoto et al, que fue de 19,2 frente a 42 meses ⁽⁴⁹⁾. Esta diferencia probablemente se debe al hecho de que en dicha cohorte, el 55% de los pacientes con una única localización metastásica fueron candidatos a metastatectomía R0 vs el 18% en nuestro estudio. La importancia de la resección quirúrgica de las metástasis en pacientes con CCR avanzado ha sido ampliamente estudiada, y hoy en día es considerado el manejo estándar para los pacientes susceptibles de ser sometidos a una resección completa de todas las metástasis. Chua et al. analizó una serie de 1142 pacientes con CCR y metástasis hepáticas

sometidos a cirugía radical tanto de la enfermedad hepática como extrahepática ⁽¹⁶⁷⁾, y observó una mediana de SG de 30 meses, una mediana de SLP de 12 meses, y una tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con hepatectomía R0 del 25%, lo que confirma que este procedimiento, cuando es factible, es el mejor tratamiento para los pacientes, siendo capaz de ofrecer las tasas de supervivencia más prolongadas en pacientes con CCR avanzado. Todos nuestros pacientes se consideraron inoperables en el momento del diagnóstico, y se les propuso quimioterapia sistémica de primera línea con intención paliativa. El objetivo de este estudio era evaluar los posibles factores para predecir la supervivencia de los pacientes con CCR avanzado e irresecable, y decidimos no incluir en el análisis las intervenciones realizadas a lo largo de la evolución del paciente, como la cirugía de metastatectomía o los tratamientos de segunda línea administrados. Es importante señalar que, incluso en pacientes considerados por sus médicos como inoperable, un porcentaje considerable (18%) pudieron beneficiarse de un tratamiento radical después de la quimioterapia sistémica. Los pacientes que pudieron ser operados fueron fundamentalmente aquellos sin CP y con metástasis de un solo órgano, lo que sin duda ha influido en nuestros resultados, ya que este factor parece ser el predictor más fuerte de supervivencia de los pacientes después del tratamiento.

La presencia de CP ha sido históricamente asociada con peores resultados en términos de SG, SLP y eficacia de los tratamientos ⁽¹⁶⁸⁾. Además, estos pacientes tienen más riesgo de sufrir síntomas relacionados con el tumor, tales como dolor abdominal, la oclusión intestinal, náuseas y vómitos ⁽¹⁶⁸⁾. Nuestros resultados sugieren que esto sigue siendo cierto en la era de las terapias modernas, y que a pesar de los nuevos regímenes de quimioterapia y la adición de terapias dirigidas como bevacizumab, este factor sigue siendo importante y predice una peor evolución de los pacientes con CCR avanzado. Durante los últimos años una importante cantidad de evidencia clínica ha aparecido avalando el papel de la cirugía citorreductora peritoneal con perfusión de quimioterapia hipertérmica intraperitoneal para mejorar la supervivencia de estos pacientes ⁽¹⁶⁹⁾.

Verwaal et Al, publicaron los datos de un estudio aleatorizado prospectivo donde 105 pacientes fueron randomizados a recibir un tratamiento de quimioterapia sistémica con o sin cirugía de citorreducción peritoneal; se observó una diferencia significativa en la SG a favor del grupo de cirugía (21,6 vs 12,6 meses) ⁽¹⁶⁹⁾. Si bien es cierto que este estudio fue realizado con un régimen de quimioterapia subóptima, y antes de la incorporación de anticuerpos monoclonales antiangiogénicos o anti-EGFR, los resultados de este estudio confirman que la cirugía citorreductora peritoneal debe ser considerada como una opción para mejorar los resultados en los pacientes con PC, y debe ser integrada en la gestión de la enfermedad, como procedimiento complementario a los tratamientos sistémicos.

VI. Conclusiones Finales

1. La sobreexpresión de VEGFR2/pKDR se observa en 91,7% de los pacientes con CCR avanzado. La baja expresión de VEGFR/pKDR se asocia con un perfil de características clínicas de mejor pronóstico, y con una mayor tasa de respuesta (100% vs 46,3%, $p= 0,019$), así como con una tendencia favorable pero no significativa en términos de SG (28 vs 22 meses, $p= 0.09$) y SLP (15 vs 12 meses, $p=0,4$), en pacientes tratados con quimioterapia con o sin bevacizumab.
2. La sobreexpresión LDH5 se observa 81,7% de pacientes con CCR avanzado. La baja expresión de LDH5 no se asocia con características clínicas de mejor pronóstico, y tampoco se asocia con una mayor tasa de respuesta (56,2 vs 60,8%, $p= 0.47$), ni con una mejor SG (20 vs 24 meses, $p= 0.17$) ni SLP (11 vs 12 meses, $p= 0.28$). Los pacientes con alta expresión de LDH5 tratados con Bevacizumab obtuvieron una SLP significativamente superior y una tendencia favorable en SG frente a los tratados exclusivamente con quimioterapia.
3. El estado mutacional de RAS no es un factor pronóstico de SG en pacientes con CCR avanzado (RASmut 20 meses vs RASwt 24 meses, $p= 0,63$), y tampoco es predictivo de la respuesta al tratamiento (TR RASmut 48,9% vs RASwt 59,9%, $p= 0.12$).
4. La resección del tumor primario no aumenta significativamente la supervivencia de los pacientes con CCR avanzado con metástasis inoperables (27 vs 22 meses, $p=0.1$). El beneficio del tratamiento con Bevacizumab es similar independientemente de la resección del tumor primario, aunque la tasa de complicaciones aumenta significativamente

en los pacientes sin resección del tumor primario tratados con Bevacizumab (19,3 vs 0%, $p= 0,007$).

5. La Carcinomatosis Peritoneal y la afectación multiorgánica al diagnóstico de pacientes con CCR avanzado son factores pronósticos que se relacionan independientemente con peor SG y peor SLP. La presencia de Carcinomatosis peritoneal y de afectación multiorgánica se asocia significativamente con menor probabilidad de metastatectomía tras tratamiento sistémico (30,1 vs 11,1%, $p= 0,038$).

ANEXOS

1. Dictámenes: Comisión de Investigación y Comité Ético de Investigación Clínica.

 **GENERALITAT VALENCIANA**
CONSELLERIA DE SANITAT

 **AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT**
Departament de Salut de València
Arnau de Vilanova - Llíria

INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

Reunidos los miembros del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Arnau de Vilanova, en su sesión del día 26 de Enero de 2012, y una vez estudiada la documentación presentada por **el Dr. Javier Garde Noguera** del Servicio de Oncología Médica, tiene a bien informar que el proyecto de investigación titulado **"Análisis de la expresión inmuno-histoquímica de ERCC1, Timidilato Sintetasa, Idh5 Y Corp. Como marcadores pronósticos y predictivos de respuesta en pacientes con carcinoma colorrectal (CCR) avanzado tratados con FOLFOX/XELOX-Bevacizumab"**. Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado: versión 14 de abril de 2008, se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

Y para que conste, lo firma en Valencia con fecha veintiséis de enero de dos mil doce.


Fdo. Mercedes Francés Sempere
Presidenta del CEIC

813006

Hospital Arnau de Vilanova · Sant Climent, 12 · 46015 València · Teléfono 96 386 85 00 · Fax 96 386 81 97

2. Certificado de concesión de beca de investigación de la Consejería de Sanidad al proyecto de tesis doctoral.

Num. 6607 / 13.09.2011



31976

Quart

Que es notifique esta resolució a tots els interessats, advertint que posa fi a la via administrativa, i que s'hi pot interposar davant del conseller de Sanitat un recurs potestatiu de reposició en el termini d'un mes, a partir de l'endemà de la notificació o, directament, recurs contenciós administratiu davant de la Sala Contenciosa Administrativa del Tribunal Superior de Justícia de la Comunitat Valenciana, en el termini de dos mesos comptats des de l'endemà de la notificació de la present resolució, segons que disposen l'article 109 de la Llei 30/1992, de Règim Jurídic de les Administracions Públiques i del Procediment Administratiu Comú, i els articles 10, 25.1 i 46 de la Llei 29/1998, de 13 de juliol, Reguladora de la Jurisdicció Contenciós Administrativa.

València, 30 d'agost de 2011.– El conseller de Sanitat: Luis Eduardo Rosado Bretón.

ANNEX

Lista d'ajudes concedides

Expedient: GE-002/11.
Centre beneficiari: Fundació Oftalmològica de la Mediterrània de la Comunitat Valenciana.
Investigador principal: Emma Maria Arnal Vicente.
Títol del projecte: Complicaciones oculares de la diabetes: corio-neovascularización retiniana. Mecanismos implicados II.
Ajuda concedida: 8.000 €.

Expedient: GE-006/11.
Centre beneficiari: Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana
Investigador principal: Mireia Gil Raga
Títol del projecte: Detección de células tumorales circulantes (CTC) en cáncer colorrectal en estadios II-III mediante un panel de genes seleccionados: utilidad como factor pronóstico.
Ajuda concedida: 7.000 €.

Expedient: GE-007/11.
Centre beneficiari: Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana
Investigador principal: Javier Garde Noguera.
Títol del projecte: Análisis de expresión inmunohistoquímica de ERCC1, TS, LDH5, pKDR como marcadores pronósticos y predictivos de respuesta en pacientes con carcinoma colorrectal (CCR) avanzado.
Ajuda concedida: 6.000 €.

Expedient: GE-009/11.
Centre beneficiari: Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana.
Investigador principal: Gemma Tamarit Bordes.
Títol del projecte: Daño neurológico en fetos de ratas expuestos a ultrasonidos.
Ajuda concedida: 3.000 €

Expedient: GE-016/11.
Centre beneficiari: Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana.
Investigador principal: Irene Velasco Ruiz.
Títol del projecte: Inmunosupresión celular en endometriosis.
Ajuda concedida: 5.000 €.

Expedient: GE-018/11.
Centre beneficiari: Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana.
Investigador principal: Oscar José Juan Vidal.
Títol del projecte: Análisis de marcas epigenéticas de histonas circulantes como biomarcador en pacientes de cáncer de pulmón de célula no pequeña.
Ajuda concedida: 6.000 €.

Cuarto

Notifíquese la presente resolución a todos los interesados, advirtiéndole que pone fin a la vía administrativa, y que contra la misma podrá interponerse ante el conseller de Sanidad recurso potestativo de reposición en el plazo de un mes, a partir del día siguiente al de su notificación o, directamente, recurso contencioso-administrativo ante la Sala de lo Contencioso-Administrativo del Tribunal Superior de Justicia de la Comunidad Valenciana, en el plazo de dos meses contados desde el día siguiente al de la notificación de la presente resolución, de conformidad con lo dispuesto en el artículo 109 de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, así como en los artículos 10, 25.1 y 46 de la Ley 29/1998, de 13 de julio, Reguladora de la Jurisdicción Contencioso Administrativa.

Valencia, 30 de agosto de 2011.– El conseller de Sanidad: Luis Eduardo Rosado Bretón.

ANEXO

Relación de ayudas concedidas

Expediente nº: GE-002/11.
Centro beneficiario: Fundación Oftalmológica del Mediterráneo de la Comunidad Valenciana.
Investigador principal: Emma Maria Arnal Vicente.
Título del proyecto: Complicaciones oculares de la diabetes: corio-neovascularización retiniana. Mecanismos implicados II.
Ayuda concedida: 8.000 €.

Expediente nº: GE-006/11.
Centro beneficiario: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana.
Investigador principal: Mireia Gil Raga.
Título del proyecto: Detección de células tumorales circulantes (CTC) en cáncer colorrectal en estadios II-III mediante un panel de genes seleccionados: utilidad como factor pronóstico.
Ayuda concedida: 7.000 €.

Expediente nº: GE-007/11.
Centro beneficiario: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana.
Investigador principal: Javier Garde Noguera.
Título del proyecto: Análisis de expresión inmunohistoquímica de ERCC1, TS, LDH5, pKDR como marcadores pronósticos y predictivos de respuesta en pacientes con carcinoma colorrectal (CCR) avanzado.
Ayuda concedida: 6.000 €.

Expediente nº: GE-009/11.
Centro beneficiario: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana.
Investigador principal: Gemma Tamarit Bordes.
Título del proyecto: Daño neurológico en fetos de ratas expuestos a ultrasonidos.
Ayuda concedida: 3.000 €.

Expediente nº: GE-016/11.
Centro beneficiario: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana.
Investigador principal: Irene Velasco Ruiz.
Título del proyecto: Inmunosupresión celular en endometriosis.
Ayuda concedida: 5.000 €.

Expediente nº: GE-018/11.
Centro beneficiario: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana
Investigador principal: Oscar José Juan Vidal
Título del proyecto: Análisis de marcas epigenéticas de histonas circulantes como biomarcador en pacientes de cáncer de pulmón de célula no pequeña.
Ayuda concedida: 6.000 €.

3. Publicaciones derivadas de la tesis doctoral.

- 3.1 Garde-Noguera J, Gil-Raga M, Evgenyeva E, Garcia JA, Llombart-Cussac A and Campos-Herrero C. High pKDR immunohistochemical expression is an unfavorable prognostic biomarker in patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy plus bevacizumab. *Clin Transl Oncol*, 2016;18:405-412

- 3.2 Garde-Noguera J, Gil-Raga M, Evgenyeva E, Bernet L, Llombart-Cussac A and Camps-Herrero C. Lactate Dehydrogenase-5 (Ldh-5) Immunohistochemical Expression as Predictor of Efficacy of First-Line Therapy in Patients with Advanced Colorectal Cancer Treated with Chemotherapy and Bevacizumab. *J Clin Exp Pathol*, 2016;6:293.

- 3.3 Garde-Noguera J, Jantus-Lewitntre E, Gil-Raga M, Evgenyeva E, Macia-Esalante S, Llombart-Cussac A and Camps-Herrero C. Role of RAS mutation status as a prognostic factor for patients with advanced colorectal cancer treated with first-line chemotherapy based on fluoropyrimidines and oxaliplatin, with or without bevacizumab: A retrospective analysis. *Mol Clin Oncol*, 2017;6:403-408.

- 3.4 Garde-Noguera J, Gil-Raga M, Juarez-Marroqui A, Camps-Herrero C, Llombart-Cussac A and Macia-Escalante S. Peritoneal Carcinomatosis and Multi-Organ Metastases are Prognostic Factors in Colorectal Cancer: A Retrospective Analysis. *J Anal Oncol*, 2016;5:5-13

- 3.5 Javier Garde Noguera, Elena Evgenyeva, Mireia Gil Raga, Asunción Juárez Marroquí, Juan Manuel Gasent Blesa, Juan Laforga, Laia Bernet, Mónica Clemente Císcar, Carlos Camps Herrero, Antonio Llombart Cussac. Role of Primary Tumor Resection and Addition of Bevacizumab to Chemotherapy in the Management of Advanced

Colorectal Cancer with Inoperable Metastasis: A Retrospective Analysis.
Journal of Analytical Oncology, 2013;2:209-217.

High pKDR immunohistochemical expression is an unfavourable prognostic biomarker in patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy plus bevacizumab

J. Garde-Noguera¹ · M. Gil-Raga² · E. Evgenyeva³ · J. A. García⁴ ·
A. Lombart-Cussac¹ · C. Camps-Herrero^{3,6}

Received: 21 July 2015 / Accepted: 5 August 2015
© Federación de Sociedades Españolas de Oncología (FESEO) 2015

Abstract

Purpose To analyse the prognostic role of the immunohistochemical expression of pKDR in patients with advanced colorectal cancer treated with oxaliplatin and fluoropyrimidines combination chemotherapy with or without bevacizumab.

Methods Retrospective multicentre study, carried out at four hospitals in the Valencian Community (Spain). Patients evolution was compared based on the immunohistochemical expression of pKDR, classified using 4 categories: 0 (undetectable), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (high intensity). Patients were divided into two groups for the analysis: group 1 with low expression (0–1) vs. group 2 with high expression (2–3).

Results Histological samples for the pKDR analysis were available for 84 of the 112 patients selected. Seven (8.3 %) had undetectable or mild expression of pKDR (Group 1) and 77 (91.7 %) showed moderate or high expression of pKDR (Group 2). Response rate in Group 1 was 100 % compared to

54.2 % in Group 2 ($p = 0.019$). Progression-free survival (PFS) (15 vs. 12 months, $p = 0.4$) and overall survival (OS) (28 vs. 22 months, $p = 0.09$) were numerically but not significantly higher in patients from Group 1 vs. Group 2. Patients from Group 2 who received bevacizumab presented a significantly higher PFS (13 vs. 11, $p = 0.015$) and a numerically higher OS (23 vs. 17 months, $p = 0.27$) than those treated exclusively with chemotherapy.

Conclusions Our results suggest that the absence or low expression of pKDR is associated with a better prognostic profile in patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy and bevacizumab. Patients with a high pKDR expression benefit from the combination of chemotherapy with bevacizumab.

Keywords Colorectal cancer · Bevacizumab · Biomarkers · pKDR

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common neoplasms, and is responsible for approximately 10 % of cancer deaths in both sexes [1].

For more than 40 years, the treatment for patients with advanced CRC was chemotherapy with 5-fluorouracil (5 FU), which produced response rates of 10–20 % as a single agent [2]. The introduction of oxaliplatin in chemotherapy regimens for these patients was an important advance in the treatment of the disease, as it increased both response rates (RR) and overall survival (OS) [3]. Another big advance in the field was the inclusion in the therapeutic arsenal of bevacizumab (Avastin®), a humanised monoclonal antibody that inhibits vascular endothelial growth factor, a key mediator of angiogenesis [4–6].

✉ J. Garde-Noguera
javiernoguera1@gmail.com

¹ Medical Oncology Department, Hospital Arnau de Vilanova (Arnau de Vilanova Hospital), c/San Clemente no. 12, 46015 Valencia, Spain

² Medical Oncology Department, Hospital de Sagunto, Valencia, Spain

³ Anatomic Pathology Department, Hospital MarinaSalud de Denia, Alicante, Spain

⁴ Anatomic Pathology, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

⁵ Medical Oncology Department, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

⁶ Valencia University, Valencia, Spain

Various randomised clinical trials in patients with advanced CRC have demonstrated the benefit of the addition of bevacizumab to the various standard chemotherapy regimens: 5-fluorouracil/leucovorin (5-FU/LV) [7], 5-FU/LV plus irinotecan (IFL) [8], 5-FU/LV plus oxaliplatin (FOLFOX) [9] and 5-FU/LV plus capecitabine (XELOX) [10], in terms of response rates (RR), OS and progression-free survival (PFS). The combination XELOX/bevacizumab offers a PFS of 9.4 months and an OS of 21.3 months [10] and is currently one of the most widely used first-line treatment regimens in patients with advanced CRC. Various hypotheses have been suggested to explain the increase in therapeutic efficacy obtained with the combination of chemotherapy and anti-VEGF, including the inhibition of the formation of new vessels or the normalisation of abnormal tumour vasculature [11, 12].

In recent years, the search for molecular markers capable of predicting patients' prognosis and the response to cytostatic and antiangiogenic treatments has increased, with the aim to select the patients who would benefit the most from each of the drugs available. Attempts have been made without success to relate several molecular markers with tumour response to the treatment with bevacizumab; therefore, currently it is not possible to predict in advance which patients will benefit from this treatment [13].

VEGFR-2/KDR is the main receptor of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and is frequently over-expressed in CRC. Several authors have linked this over-expression with a significant increase in tumour vasculature and an increase in the metastatic capacity of the tumours [14]. The binding of VEGF to VEGFR-2/KDR leads to the phosphorylation and activation of a signalling pathway that stimulates the proliferation, migration and inhibition of apoptosis and maturing of endothelial cell vascular structures [15, 16]. It is still not known if anti-VEGF strategies have a direct effect on the tumour cell or if, in contrast, its activity is focussed on the endothelial cells of the blood and/or lymphatic vasculature that support the tumour, where the largest overexpression of the VEGFR-2/KDR and VEGFR-3 receptors has been observed [17, 18].

The overexpression of the activated form of VEGFR-2, or pKDR, measured using immunohistochemistry, as well as the overexpression of the protein LDH-5 involved in the regulation of the pyruvate to lactate transformation in anaerobic conditions for the generation of energy and therefore an indirect marker of cell hypoxia have been associated with a worse prognosis in patients with CRC who have undergone surgery [19] and have been suggested as markers of the angiogenesis process.

The objective of our study was to retrospectively evaluate the prognostic role of pKDR expression in patients with advanced CRC with non-resectable metastasis who

have received treatment with oxaliplatin and fluoropyrimidine-based chemotherapy, with and without bevacizumab. In addition, we analysed the clinical variables associated with the expression of pKDR as well as its influence on the effectiveness of the antiangiogenic treatment.

Materials and methods

Retrospective study of patients diagnosed with advanced CRC and treated with oxaliplatin and fluoropyrimidines combination chemotherapy, with or without bevacizumab, in four hospitals in the Valencian Community over 3 years.

Patients' characteristics

A systematic review of the medical records of treatment-naive patients diagnosed with advanced CRC with anatomical-pathological confirmation of colorectal adenocarcinoma and treated with first-line chemotherapy with FOLFOX or XELOX, either in combination or not with bevacizumab between January 2010 and December 2013 was performed. The evaluation included a review of medical records and baseline radiologic measurements of the tumour prior to the start of the treatment.

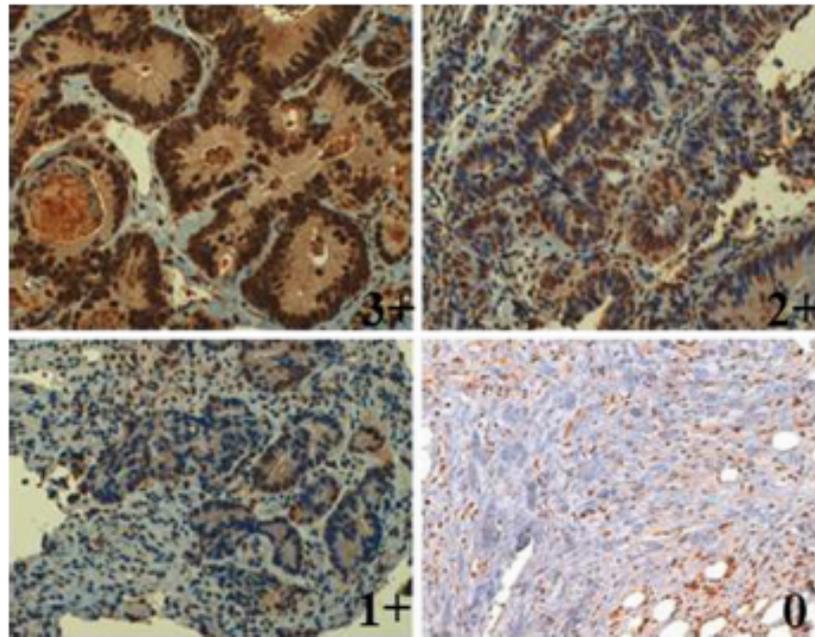
The extent of the disease at diagnosis and the evaluation of the response to treatment have been carried out by CT scans. Data from blood laboratory tests prior to each cycle of chemotherapy were collected to assess blood counts and kidney and liver function. Tumour response was evaluated according to RECIST criteria [20]. OS was calculated as the period from the start of treatment until the date of death.

Immunohistochemistry

After an initial review of all the samples of haematoxylin- and eosin-stained tumour biopsies, a paraffin block representative of each of the study subjects was selected. The blocks selected had to include viable tissue and were used to create a tissue microarray (TMA), with two tumour cylinders for each patient. Once the TMAs had been put together, consecutive sections of 4 µm were created. One of the sections from each sample was stained with haematoxylin and eosin, and the subsequent sections were immunofixed with anti-pKDR antibodies.

The immunofixation was performed using the immunoperoxidase technique followed by predigestion and trypsinization. The antibody used was 34a (Oxford University) with dilution of 1:2 for pKDR [21]. The expression of pKDR was quantified using a grading system that classified the samples into 4 groups: from 0 (undetectable) to 3 (high intensity), based on previous studies

Fig. 1 Immunohistochemical staining gradation of colorectal tumours specimens with anti-KDR antibody. Strong staining 3+, B moderate 2+, C Mild 1+ and D undetectable 0



[14]. Patients were divided into two groups for the analysis: group 1 with low expression (0-1) vs. group 2 with high expression (2-3) (Fig. 1).

Statistical methods

All the statistical analyses and the results were processed using the statistical software SPSS 19.0. A descriptive statistical analysis was carried out, including central tendency and dispersion parameters for the quantitative variables, and absolute and relative frequencies for categorical variables. The Chi-squared test was used to compare two or more independent subject groups for categorical variables. The survival curve was estimated using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.

Results

Patient characteristics

In our database, we found 112 patients diagnosed with advanced CRC treated with oxaliplatin and fluoropyrimidines combination chemotherapy (XELOX or FOLFOX) with or without bevacizumab. For 84 of them, there was enough histological material to carry out the pKDR immunohistochemical analysis. Seven patients (8.3 %) had a mild or undetectable expression (Group 1); while the

other 77 patients (91.7 %) had moderate or intense expression (Group 2).

Patients' characteristics are summarised in Table 1. The median age of patients in Group 1 was 71 years, and in group 2 was 68 years. No significant differences were observed between the groups in terms of sex, performance status (PS), presence of *KRAS* mutations, use of bevacizumab, number of metastatic sites or the presence of rectal bleeding at the time of diagnosis. The percentage of patients with weight loss of more than 10 % and with an elevated CEA at the time of diagnosis was statistically higher in Group 2, and this group also showed a non-significant tendency towards an increase in the frequency of occlusive symptoms and serum LDH elevation.

Treatment and response rate

Of the 7 patients in Group 1, 3 (42.8 %) received chemotherapy in combination with bevacizumab, while the other 4 received only chemotherapy. Of the 77 patients in Group 2, 49 (63.6 %) received chemotherapy with bevacizumab, and the other 28 (36.4 %) received chemotherapy. A total of 77 patients were evaluable in terms of response; all the patients in Group 1 and 70 from Group 2. The seven non-evaluable patients died before the re-evaluation (5 after the second cycle of chemotherapy and 2 after the first cycle).

Table 1 Patients' characteristics

	Group 1 Low expression of pKDR <i>n</i> = 7	Group 2 High expression of pKDR <i>n</i> = 77	<i>p</i> value
Median age	71 years (46–80)	68 years (39–83)	
Sex, men/female	5/2 (71 vs. 29 %)	45/84 (53.5 vs. 46.5 %)	0.4
PS 0–1 vs. 2	6 vs. 1 (85.7 vs. 14.3 %)	60 vs. 17 (71.4 vs. 28.6 %)	
High blood pressure at time of diagnosis	25/55 (45 %)	18/43 (41 %)	0.44
Weight loss >10 %	7/51 (13 %)	14/41 (34 %)	0.019*
Rectal bleeding	17/51 (33 %)	18/42 (42 %)	0.23
Occlusive symptoms	8/51 (15 %)	2/41 (4.8 %)	0.09
>1 Metastatic site	37/62 (59.6 %)	23/50 (46 %)	0.1
Elevated CEA	37/52 (71 %)	38/42 (90 %)	0.018*
Anaemia	23/44 (52 %)	23/41 (56 %)	0.44
Elevated LDH	13/34 (38.2 %)	19/31 (61 %)	0.054
Chemotherapy with bevacizumab	44/62 (70.9 %)	31/50 (62 %)	0.21
KRAS mutations	24/36 (66 %)	11/20 (55 %)	0.3

* Statistically significant ($p < 0.05$)

Table 2 Response to treatment

Response	Group 1 Low pKDR	Group 2 High pKDR	<i>p</i> value
Complete response	0	1 (2.3 %)	0.019
Partial response	7 (100 %)	37 (44 %)	
Stable disease	0	19 (24.6 %)	
Progressive disease	0	13 (16.8 %)	

The treatment RR in the patients with low pKDR expression was 100 % (7 PR), compared to 54.2 % in the group of patients with high pKDR expression (1 complete response, 37 partial responses, 19 stable disease and 13 progressive disease); differences in the RR between the two groups were statistically significant ($p = 0.019$) (Table 2).

Overall survival and progression-free survival

The median survival in Group 1 was 28 months, compared to 22 months in Group 2 ($p = 0.09$). PFS was also higher in Group 1, although the differences were not statistically significant in this case either (15 vs. 12 months, $p = 0.4$) (Fig. 2).

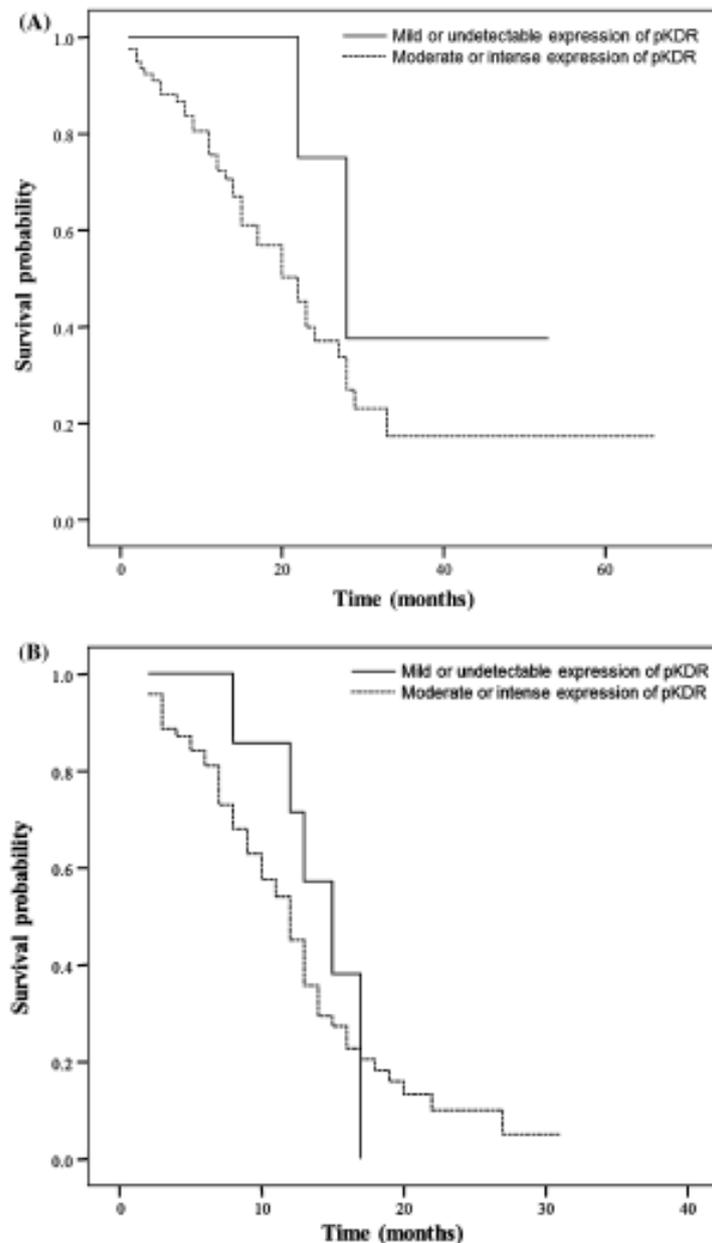
The median OS in those patients in Group 2 who received treatment with chemotherapy in combination with bevacizumab was 23 months, compared to 17 months in the patients treated with chemotherapy alone ($p = 0.27$). PFS was statistically significantly higher in the group of patients treated with bevacizumab (13 vs. 11 months, $p = 0.015$) (Fig. 3).

Discussion

This retrospective study was designed to analyse the prognostic role of the overexpression of VEGFR-2/pKDR in patients diagnosed with advanced colorectal adenocarcinoma treated with chemotherapy with oxaliplatin and fluoropyrimidines with and without bevacizumab. Our study confirms the high rate of overexpression of VEGFR-2/pKDR in these tumours, although we did not detect significant differences in PFS or OS based on its presence.

The frequency of pKDR overexpression in advanced colorectal cancer tumour cells detected in our series of patients was 91.7 %. The elevated rate of expression of this angiogenesis marker is in line with other research published, although the rate found in our series is higher than that described in previous studies. Koukourakis et al. reported a series of 128 patients with resected colon cancer (stages IIa–III) in which the rate of pKDR overexpression in the tumour cells was 76.5 % [19]. These differences could be explained by the fact that our patients were in an advanced stage of the disease, where the angiogenic processes are probably in a different phase of their development. In fact, other authors, such as Takahashi et al. observed an increase in the number of neovessels in patients with metastatic disease compared to those with tumours in their initial stages, with a higher proportion of KDR overexpression in patients with advanced disease (62.5 vs. 28.6 %), as well as a strong relationship between the expression of KDR with vascular density and the expression of VEGF-A [14]. However, the retrospective nature of all these studies carried out based on small samples of patients, with different anti-KDR antibodies and analysed with different grading systems for defining

Fig. 2 Overall survival (a) and progression-free survival (b) according to the expression of pKDR

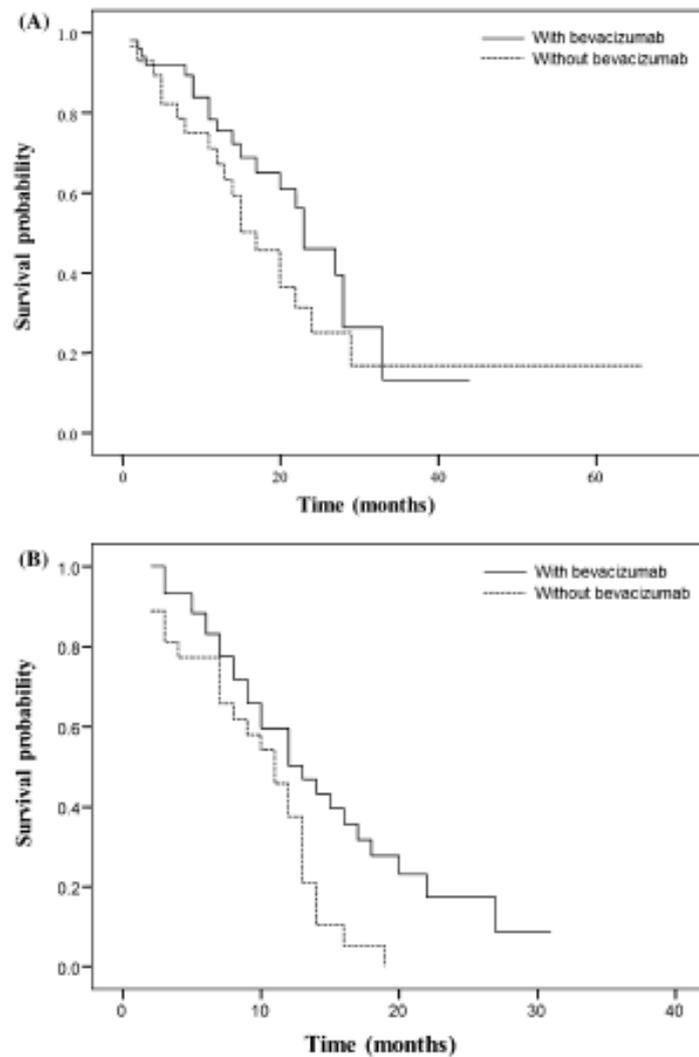


immunohistochemical positivity/negativity, makes it very difficult to compare the results of different series.

The majority of works published to date on the prognostic value of VEGFR-2/KDR expression indicates the unfavourable impact of its overexpression on patients' progression. This observation has been found in patients in the initial stages who have undergone surgery and in

patients with metastatic disease and also when the expression of KDR is analysed using immunohistochemical techniques [19] and when it is analysed using gene expression analysis [22]. In our study, an unfavourable tendency was observed for patients with pKDR overexpression both in terms of PFS and OS, although the differences were not statistically significant. The small sample

Fig. 3 Overall survival (a) and progression-free survival (b) in patients with overexpression of pKDR according to the addition of bevacizumab to the chemotherapy treatment



size limits our ability to find these differences, especially taking into account the small number of patients with low VEGFR-2/pKDR expression.

It should be pointed out that patients with low pKDR expression presented more favourable clinical characteristics, with lower levels of CEA and LDH, as well as a lower rate of patients with weight loss of more than 10 % at time of diagnosis. As previously mentioned, the binding of VEGF to VEGFR-2/KDR leads to phosphorylation and the activation of an intracellular signal pathway which ultimately potentiates processes such as cell proliferation, migration, apoptosis inhibition and maturation of endothelial cell vascular structures [15, 16]. It is thought

that the low expression of pKDR could be associated with less aggressive tumour behaviour, with a lower rate of cell proliferation and less invasiveness and metastatic capacity. Such different biological behaviour could explain the clinical differences found between the two populations of patients considered.

Furthermore, all patients with low expression of pKDR achieved a radiological response following the chemotherapy treatment (response rate 100 vs. 46 %, $p < 0.05$), which suggests that patients with tumours with low pKDR expression could be a sub-population not just with a better clinical profile, but also with tumours that are more sensitive to chemotherapy. In this regard, Clavani

et al. reported data that suggest that the presence of the autocrine stimulation of survival generated in the functioning KDR-carrying cell lines provides these cell populations with a mechanism of resistance to chemotherapy-induced apoptosis in hypoxia-induced stress situations, with the subsequent reduction in the effectiveness of cytostatic treatments [23].

The analysis of patients with pKDR overexpression according to treatment with antiangiogenics confirms that the patients treated with bevacizumab presented a longer PFS and showed a favourable trend in terms of OS compared to those treated exclusively with chemotherapy. The limited number of patients with low pKDR expression identified in our study prevented us to analyse the benefit that bevacizumab could add to chemotherapy in patients with low expression of this angiogenesis marker, and also prevented us to assess the hypothetical prognostic role of that marker in this context.

Previous studies have associated the mutational status of p53 with the response to bevacizumab in patients with advanced CRC, although the results are controversial. Some authors have not found an association between the status of p53 and the effectiveness of the drug [24], while others have reported an increase in OS in patients with tumours that express p53 compared to those that do not [25]. More recently, Zhang et al. published a three-gene signature that includes the expression of VEGF-A, FLT1 and KDR, which appears to differentiate two populations with different prognosis for patients with p53 mutations treated with bevacizumab and not in those with wild-type p53 [26]. At the moment, we still do not have response-predicting markers for antiangiogenics such as bevacizumab in advanced CRC, and their identification continues to be a challenge for which in-depth knowledge of the biological processes involved in angiogenesis is essential.

In conclusion, the results of our study suggest that pKDR overexpression is observed in the majority of patients with advanced CRC. The low expression of pKDR seems to be related to a patient profile with better prognostic clinical characteristics, and in our series it was associated with a favourable but not significant tendency, in terms of OS and PFS, as well as a better RR to first-line treatment with chemotherapy with or without bevacizumab.

Acknowledgments The study was funded by a grant for projects of emerging groups in care centres for the promotion of health research in Valencia (Spain) in 2011.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed consent Due to the characteristics of the study, the ethics committee approved the conduction of the study without obtaining the informed consent from the participating patients since a previous consent for a prior analysis of biomarkers in tumour samples had been obtained and most of the patients had died at the moment of the current analysis.

Research involving human participants and/or animals Ethical standards: the study was approved by an Ethics Committee of Clinical Research and was conducted according to the 1964 Declaration of Helsinki for studies in humans and its later amendments. This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

References

- Gaefinkel L, Moolinski M. US cancer incidence, mortality and survival 1973–1996. *Stat Bull Metrop Insur Co.* 1999;80:23–32.
- Bleiherg H. Role of chemotherapy for advanced colorectal cancer. *New opportunities.* *Semin Oncol.* 1996;23:42–50.
- De Gramont A, Vignaud J, Tournigand C, Lasserre C, André T, Vanille C, et al. Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-h continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1997;33:214–9.
- Fernes N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C1358–66.
- Fernes N, Gerber HP, Lawler J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669–76.
- Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med.* 2001;7:987–9.
- Kabbinavar FF, Hamilton J, Moss RD, Hurwitz HI, Berglund E, Saekow S. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:3706–12.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Hain W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350:2335–42.
- Giantonio BI, Catalano JJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol.* 2007;25:1539–44.
- Salz L, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 2008;26:2013–9.
- Korbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:727–39.
- Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in anti-angiogenic therapy. *Science.* 2005;307:58–62.
- Gerber HP, Fernes N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* 2005;65:671–80.
- Takahashi Y, Kitachi Y, Bucana CD, Clancy KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* 1995;55:3964–8.
- Takahashi T, Shibuya M. The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene.* 1997;14:2079–89.
- Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Fernes N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:7533–7.
- Smith NR, Baker D, James NH, Ratcliffe K, Jenkins M, Ashton SE, et al. Vascular endothelial growth receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 are localized primarily to the vasculature in human primary solid cancers. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3548–61.
- Kaukkanen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene.* 2000;19:5598–605.
- Koukourakis MI, Giannousaki A, Siveridis E, Gatter KC, Harris AL. Tumor Angiogenesis Research Group. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway. A report of the tumor angiogenesis research Group. *J Clin Oncol.* 2006;24:4301–8.

20. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45:228–47.
21. Stewart M, Turley H, Crook N, Pezzullo F, Pilki G, Ogilvie D, et al. The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumours and relocates intracellularly on phosphorylation: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 2003;43:33–9.
22. Zhang SD, McCracken CM, Lin Y, Kwok HF. The significance of combining VEGFA, FLT1 and KDR expressions in colon cancer patient prognosis and predicting response to bevacizumab. *Oncotargets Ther*. 2015;8:335–43.
23. Calvani M, Triccioglio D, Bergamachi C, Shoemaker RH, Melillo G. Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68:1.
24. Yang SX, Steinberg SM, Nguyen D, Swain SM. p53, HER2 and tumor cell apoptosis correlate with clinical outcome after neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy in breast cancer. *Int J Oncol*. 2011;38:1445–52.
25. Said R, Hing DS, Wamsley CL, Lee JJ, Wheeler D, Janka F, et al. P53 mutations in advanced colorectal clinical characteristics, outcomes, and correlation between progression-free survival and bevacizumab-containing therapy. *Oncotarget*. 2013;4:705–14.
26. Zhang SD, McCracken CM, Meng C, Lin Y, Kwok HF. The significance of combining VEGFA, FLT1, and KDR expressions in colon cancer patient prognosis and predicting response to bevacizumab. *Oncotargets Ther*. 2015;8:335–43.



Lactate Dehydrogenase-5 (Ldh-5) Immunohistochemical Expression as Predictor of Efficacy of First-Line Therapy in Patients with Advanced Colorectal Cancer Treated with Chemotherapy and Bevacizumab

Garde-Noguera J^{1*}, Gil-Raga M², Evgenyeva E³, Bernet L⁴, Lombardi-Cussao A¹ and Camps-Herrer C⁵

¹Medical Oncology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain

²Medical Oncology Department, Hospital de Sagunto, Valencia, Spain

³Anatomic Pathology Department, Hospital Marina Salud, Denia, Spain

⁴Anatomic Pathology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain

⁵Valencia University, Valencia, Spain

*Corresponding author: Javier Garde-Noguera, Medical Oncology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain, Tel: 34699307265; E-mail: javiergarde@icloud.com

Received date: August 19, 2016; Accepted date: September 13, 2016; Published date: September 15, 2016

Copyright: © 2016 Garde-Noguera J, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Purpose: The aim of this study is to analyse the prognostic role of LDH5 expression measured by immunohistochemistry in patients with advanced colorectal cancer treated with standard chemotherapy with or without bevacizumab.

Methods: Retrospective multicentre study, carried out at four hospitals in the Valencian Community (Spain). We investigated the immunohistochemical expression of LDH-5 in a series of 112 patients with advanced colorectal adenocarcinomas treated with oxaliplatin-based chemotherapy with or without bevacizumab.

Results: Histological samples for the LDH5 analysis were available for 87 of the 112 patients selected. Sixteen (18.3%) had undetectable or mild expression of LDH5 (Group 1) and 71 (87.7%) showed moderate or high expression of LDH5 (Group 2). Response rate in Group 1 was 56.2% compared to 60.8% in Group 2 ($p=0.47$). Progression-free survival (PFS) 11 vs. 12 months ($p=0.28$), and overall survival (OS) 20 vs. 24 months, ($p=0.17$), were numerically but not significantly higher in patients from Group 2 vs. Group 1. Patients from Group 2 who received bevacizumab presented a significantly higher PFS (13 vs. 12, $p=0.039$) and a numerically higher OS (27 vs. 20 months, $p=0.27$) than those treated exclusively with chemotherapy.

Conclusions: Our results suggest that the absence or low expression of LDH5 is not associated with a better prognostic profile in patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy and bevacizumab. Patients with high expression of LDH5, benefit from the combination of chemotherapy with bevacizumab.

Keywords: Advanced colorectal cancer; LDH5 expression; Angiogenesis

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third the most common malignancy, and is responsible for approximately 10% of cancer deaths in both sexes [1]. Over more than 40 years, the only treatment for patients with advanced CRC was chemotherapy. At first, with 5-fluorouracil (5FU), achieved a response rate of 10-20% as a single agent [2]. The addition of oxaliplatin to chemotherapy regimens became a step forward for these patients, as it added efficacy in terms of increased both response rates (RR) and overall survival (OS) [3]. Next big advance in the field was the arrival to the therapeutic arsenal of bevacizumab (Avastin), a humanised monoclonal antibody capable to inhibit vascular endothelial growth factor, a key mediator of angiogenesis [4-6]. Several randomised clinical trials have demonstrated the benefit of the addition of bevacizumab to the various standard chemotherapy regimens in patients with advanced CRC: 5-fluorouracil/leucovorin (5-

FU/LV) [7], 5-FU/LV plus irinotecan (IFL) [8], 5-FU/LV plus oxaliplatin (FOLFOX) [9] and 5-FU/LV plus capecitabine (XELOX) [10]. With increases in response rates (RR), OS and progression free survival (PFS). The combination XELOX/bevacizumab offers a PFS of 9.4 months and an OS of 21.3 months [10] and is currently one of the most widely used first-line treatment regimens in patients with advanced CRC. The efficacy obtained by the addition of an anti-angiogenic drug to chemotherapy seems to be due to the inhibition of the formation of new vessels, and the normalisation of abnormal tumour vasculature [11,12]. Since Bevacizumab was approved and incorporated into first line treatment protocols, an intense effort in the search of biomarkers has been done. Identification of molecular markers capable of predicting patients' prognosis and the response to cytostatic and anti-angiogenic treatments is a challenging task, since these potential markers would allow selecting the patients who would benefit the most from each of the drugs available. Unfortunately, despite the different attempts carried out, there has been no success to relate several molecular markers with tumour response to the treatment with bevacizumab; therefore, currently there is no way to

predict in advance which patients will benefit from this treatment [13]. It is still unknown the place where anti-VWGF therapies produce its main effect, they might have a direct effect on the tumour cell, but it could also base its activity on the endothelial cells of the blood vasculature and/or the lymphatic vessels supporting the tumour, where it has been detected a overexpression of VEGFR-2 (KDR) and VEGFR-3 (13) receptors. VEGFR-2 is involved in the initiation of molecular pathways that induce proliferation and survival of endothelial cells [14]. Overexpression of the activated form of VEGFR-2 or pKDR measured by immunohistochemistry as well as of lactate dehydrogenase 5 (LDH5), protein involved in the regulation of the transformation of pyruvate to lactate in anaerobic conditions for acquisition of energy, and therefore an indirect marker cellular hypoxia, have been associated with worse prognosis in patients with colon cancer, and are postulated as markers of angiogenesis process [15]. Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) is one of the five LDH isoenzymes and, apparently, the most important for promoting anaerobic glycolysis. LDH5 is transcriptionally regulated by the hypoxia inducible factors (HIF) 1-alpha and 2-alpha. LDH5 up-regulation has been related with HIF1a and HIF2a accumulation, what leads to a VEGF activation, increased vascular density and also with extramural invasion, followed by nodal and distant metastases [16]. These observations suggest that a high LDH5 content in tumour cells is directly related to an up-regulated HIF pathway and is linked with an aggressive phenotype in colorectal cancer in fact, LDH-5 has been associated with a worse prognosis in patients with CRC who have undergone surgery [17]. The objective of our study was to retrospectively evaluate the prognostic role of LDH5 expression in patients with advanced CRC with non-resectable metastasis who have received treatment with oxaliplatin and fluoropyrimidine-based chemotherapy, with and without bevacizumab. In addition, we analysed the clinical variables associated with the expression of LDH5 as well as its influence on the effectiveness of the anti-angiogenic treatment.

Materials and Methods

This is a retrospective multicentre study of patients diagnosed with stage IV colorectal cancer treated in four hospitals of Valencian Community over three years with oxaliplatin and fluoropyrimidine combination chemotherapy, with or without bevacizumab.

Patients' characteristics

We performed a systematic review of patients diagnosed with stage IV colorectal cancer with histological confirmation of colorectal adenocarcinoma and treated between January 2011 and December 2014 with first-line standard chemotherapy regimen based on Oxaliplatin and Fluoropyrimidines (POLFOX or XELOX), either in combination or not with bevacizumab. The evaluation method consisted in a review of medical records and baseline tumour radiologic measurements before the start of the treatment. Baseline disease extension and tumour response evaluation was carried out by CT scans. Blood laboratory data were collected from each test prior to each cycle of chemotherapy to assess blood counts and kidney and liver function. Tumour response was evaluated according to RECIST criteria. OS was calculated as the period from the start of treatment until the date of death.

Immunohistochemistry

After an initial review of all the samples of haematoxylin and eosin-stained tumour biopsies, a paraffin block representative of each of the study subjects was selected. The blocks selected had to include viable tissue and were used to create a tissue microarray (TMA), with two tumour cylinders for each patient. Once the TMAs had been put together, consecutive sections of 4 μ m were created. One of the sections from each sample was stained with haematoxylin and eosin, and the subsequent sections were immunofixed with anti-LDH5 antibodies. The immunofixation was performed using the immunoperoxidase technique followed by predigestion and trypsinization. The antibody used was sheep polyclonal antibody 9002 (Abcam, Cambridge, UK) raised against human LDH5, purified from human placenta was used for immunohistochemistry [17]. The percentage of cancer cells with strong cytoplasmic and nuclear LDH5 expression was assessed separately, following inspection of the entire embedded tissue. In each optical field, the percentage was recorded and the final score for each case was the mean value obtained. Values lower than 10% were scored as 0%. The expression of LDH5 was quantified using a grading system that classified the samples into 2 groups: high/mild vs low/negative expressing tumours based on previous studies (Figure 1) [14].

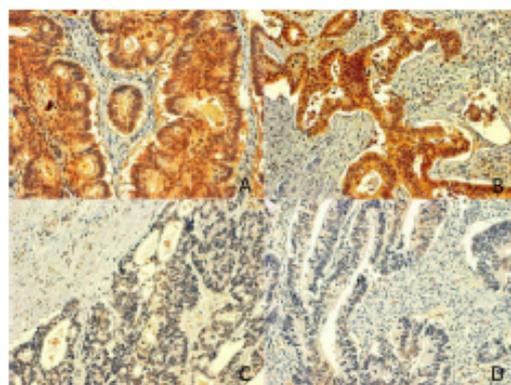


Figure 1: Immunohistochemical staining gradation of colorectal tumours specimens with anti-LDH5 antibody: High Expression A and B. Low Expression C and D.

Statistical methods

All the statistical analyses and the results were processed using the statistical software SPSS 19.0. A descriptive statistical analysis was carried out, including central tendency and dispersion parameters for the quantitative variables, and absolute and relative frequencies for categorical variables. The Chi-squared test was used to compare two or more independent subject groups for categorical variables. The survival curve was estimated using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.

Results

Patient characteristics

In our database, we found 112 patients diagnosed with advanced CRC treated with oxaliplatin and fluoropyrimidines combination chemotherapy (XELOX or FOLFOX) with or without bevacizumab. Eighty-seven of them had sufficient material for histological analysis of LDH5 immunohistochemistry. Sixteen patients (18.3%) had low expression (group 1); while seventy-one patients (81.7%) showed strong expression of LDH 5 (group 2): 20 nuclear expression in >10% of cells with no cytoplasmic expression, 16 strong cytoplasmic expression without nuclear expression, and 35 over-expression both nuclear and cytoplasmic. Patients' characteristics are summarised (Table 1). The median age of patients in Group 1 was 71 years, and 68 years in Group 2. No significant differences were observed between the groups in terms of sex, performance status (PS), and presence of KRAS mutations, number of metastatic sites or the presence of rectal bleeding at the time of diagnosis. The percentage of patients who received treatment with Bevacizumab was lower in Group 1 (37.5 vs 69%, $p=0.02$), and this group also showed a non-significant tendency towards an inferior rate of serum LDH elevation [18,19].

	Global population N=112	GRUPO 1. Low LDH5 expression N=16	GRUPO 2 High LDH5 expression N=71	p Value
Median Age	68 years	71 years	68 years	
Sex Male/Female	66/46 (58.4 vs. 40.7%)	9/7 (56 vs. 44%)	44/27 (61.9 vs. 38.1%)	0.4
PS 0-1 vs. 2	87 vs. 22 (77 vs. 23%)	11 vs. 5 (68.7 vs. 31.3%)	58 vs. 13 (81.6 vs. 18.4%)	
High blood pressure at time of diagnosis	43 (38%)	4 (70%)	33 (54%)	0.1
Weight loss >10%	21 (22.8%)	4 (30.7%)	12 (21.4%)	0.34
Rectal bleeding	35 (37.6)	6 (46.1%)	21 (36.8%)	0.37
Obstructive Symptoms	10 (10.8%)	1 (7.6%)	6 (10.7%)	0.6
>1 metastatic site	52 (46.4%)	7 (43%)	31 (43.6%)	0.86
High serum CEA	75 (79.7%)	10 (66.6%)	48 (78.6%)	0.25
Anaemia	47 (54.6%)	5 (35.7%)	27 (47.3%)	0.31
High serum LDH	34 (52.3%)	3 (33%)	22 (46.8%)	0.35
Chemotherapy with Bevacizumab	75 (66.9%)	6 (37.5%)	49 (69%)	0.02*
KRAS mutations	42 (51%)	4 (40%)	28 (52%)	0.3

Table 1: Patient's characteristics.

Treatment and response rate

Of the 16 patients in Group 1, 6 (37.5%) received chemotherapy in combination with bevacizumab, while the other 10 received only

chemotherapy. Of the 71 patients in Group 2, 49 (69%) received chemotherapy with bevacizumab, and the other 22 (31%) received chemotherapy (Figure 2). A total of 80 patients were evaluable in terms of response; all the patients in Group 1 and 64 from Group 2. The seven non-evaluable patients died before the re-evaluation (5 after the second cycle of chemotherapy and 2 after the first cycle) (Table 2).

Response	GROUP 1 Low LDH5	GROUP 2 High LDH5	p Value
Complete Response	0	1 (1.5%)	0.47
Partial Response	9 (56.2%)	38 (59.3%)	
Stable Disease	5 (31.2%)	14 (21.8%)	
Progression Disease	2 (12.5%)	7 (10.9%)	

Table 2: Response to treatment.

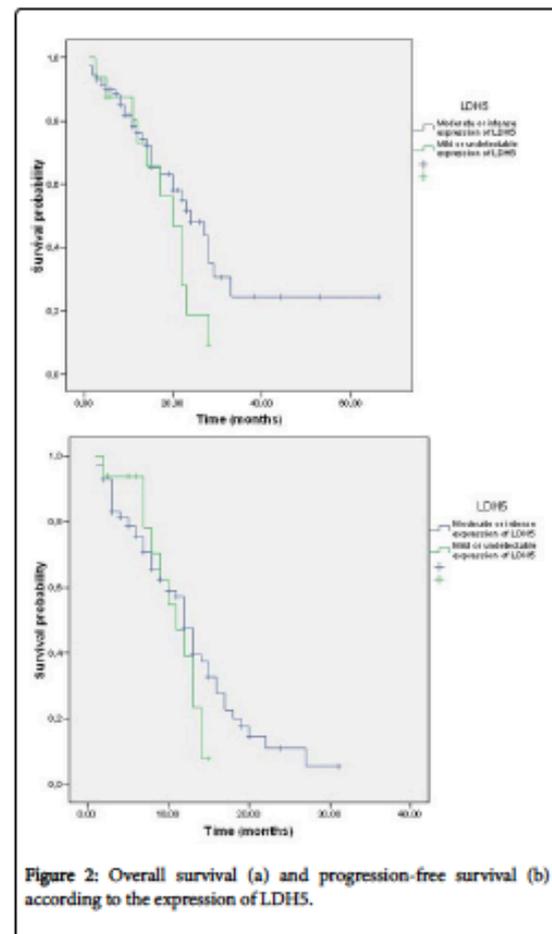


Figure 2: Overall survival (a) and progression-free survival (b) according to the expression of LDH5.

The treatment RR in the patients with low LDH5 expression was 56.2% (9 PR), compared to 60.8% in the group of patients with high

LDH5 expression (1 complete response, 37 partial responses, 19 stable disease and 13 progressive disease); differences in the RR between the two groups were not statistically significant ($p=0.47$). There were no significant differences in the efficacy of chemotherapy and bevacizumab in Group 2 according to the location of LDH5 expression: cytoplasmic vs. nuclear vs. both (87.5% vs. 55% vs. 51.6%, $p=0.09$).

Overall survival and progression-free survival

The median survival in Group 1 was 20 months, compared to 24 months in Group 2 ($p=0.17$). There was neither difference in PFS, 11 months vs. 12 months in Group 1 and 2 respectively ($p=0.28$). The median OS in those patients in Group 2 who received treatment with chemotherapy in combination with bevacizumab was 27 months, compared to 20 months in the patients treated with chemotherapy alone ($p=0.27$). PFS was significantly higher in Group 2 for patients treated with bevacizumab (13 vs. 12 months, $p=0.039$) (Figure 3).

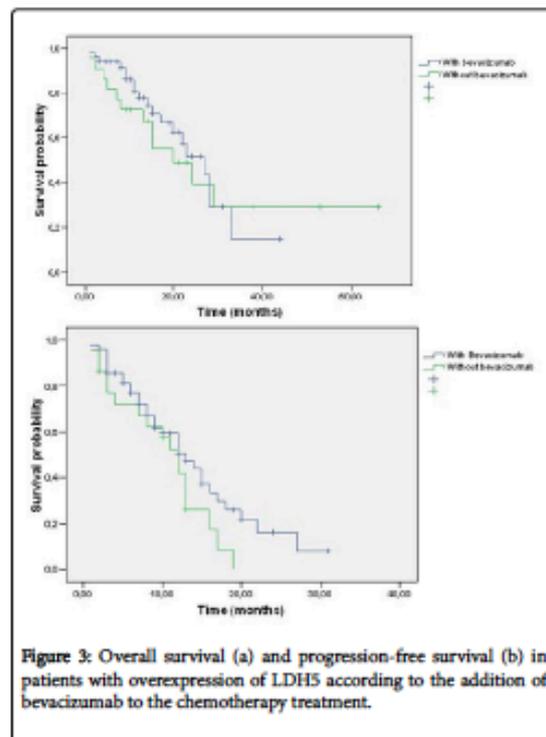


Figure 3: Overall survival (a) and progression-free survival (b) in patients with overexpression of LDH5 according to the addition of bevacizumab to the chemotherapy treatment.

Discussion

This retrospective study was designed to analyse the prognostic role of the overexpression of lactate dehydrogenase 5 (LDH5) in patients diagnosed with advanced colorectal adenocarcinoma treated with chemotherapy with oxaliplatin and fluoropyrimidines with and without bevacizumab. Our study did not find any relationship between the overexpression of LDH5 with an increased Response Rate, neither with significant differences in PFS or OS based on its presence.

The frequency of LDH5 overexpression in advanced colorectal cancer tumour cells detected in our series of patients was 87.7%. The elevated rate of expression of this angiogenesis marker is in line with other research published to date. Kourkourakis et al. reported a series of 128 patients with resected colon cancer (stages IIA-III) in which the rate of LDH5 overexpression was 77.3% [17], and same authors communicated in another series with 75 patients diagnosed with advanced colorectal cancer, a LDH5 overexpression rate of 68% [16]. Our findings confirm that this protein is highly expressed in colorectal tumours.

LDH5 is one of the five LDH isoenzymes and, apparently, the most important for promoting anaerobic glycolysis. LDH5 is transcriptionally regulated by the hypoxia inducible factors (HIF) 1a and 2a, and its overexpression has been related with aggressive advantages that colorectal tumours may gain from a high LDH5 content, for instance the increase capability for lymph node involvement and distant metastases spread [16]. In fact, its presence has been associated with worse outcome in patients with stage I-III operable colorectal cancer, who presented a poorer survival when compared with those with negative expression of LDH5 (HR 15.1, $p=0.0003$) [17]. Similar results have been communicated in patients diagnosed of advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) [20], where a significantly poorer survival was noted in the group of patients with high LDH5 immunohistochemical reactivity, both when measured at cytoplasm and at nucleus. In addition, Scartozzi et al. observed similar findings in patients with high LDH serum levels [21], who presented a significant shorter PFS (4.2 vs. 8 months, $p=0.003$) and OS (19.6 vs. 34.9 months, $p=0.0014$), when compared with patients with low LDH levels in serum. Despite all this data, in our series the high expression of LDH5 was not associated with classical clinical factors associated with worse prognostic features, such as loss of weight, bad performance status or more than one metastatic site. It should be pointed out that those patients with low LDH5 expression presented similar clinical characteristics to those with high expression, for instance we observed no differences neither in levels of serum CEA or serum LDH, or rectal bleeding or occlusive symptoms. This contrast with what our group observed in the prognostic role of other angiogenesis marker, VEGFR-2/pKDR in a previous report [22], where patients with an overexpression of this protein showed a worse clinical profile. VEGFR-2/KDR is the main receptor of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and is frequently overexpressed in CRC. The binding of VEGF to VEGFR-2/KDR leads to phosphorylation, and the activation of an intracellular signal pathway, which ultimately potentiates processes such as cell proliferation, migration, apoptosis inhibition, and maturation of endothelial cell vascular structures [23,24]. An association between LDH-5 and pKDR expression in cancer cells and in tumour-associated vasculature was recorded in 128 colorectal carcinomas examined. In fact, 75% and 60% of tumours with high LDH-5 expression had high pKDR expression in cancer cells and in vessels, respectively. These percentages were clearly lower (30% and 23%, respectively), in tumours with low LDH-5 expression [17].

As said, we have not found any differences in response rate or progression-free and overall survival in our analysis. It is important to mention that there was significant difference in the rate of patients treated with bevacizumab between patients with low and high LDH5 expression (37.5 vs. 69%, $p=0.02$), which means, that patients with the hypothetical worse molecular feature had been treated with a more active treatment schedule. This important imbalance could explain the non-statistically significant but numerically better outcome of patients with LDH5 overexpression. Furthermore, the retrospective nature of

this study carried out based on small sample of patients, with different stage of the disease from previous series, makes it very difficult to do any comparison.

The analysis of patients with LDH5 overexpression according to treatment with anti-angiogenics confirms that patients treated with bevacizumab presented a longer PFS, and showed a favourable trend in terms of OS compared to those treated exclusively with chemotherapy. The limited number of patients with low LDH5 expression identified in our study prevented us to analyse the benefit that bevacizumab could add to chemotherapy in patients with low expression of this angiogenesis marker, and also prevented us to assess the hypothetical prognostic role of that marker in this context. Previous reports found similar results regarding to the better outcome of patients with overexpression of pro-angiogenic proteins when treated with Bevacizumab. Both patients with high levels of pKDR measured by immunohistochemistry, and patients with high serum level of LDH presented a benefit in RR, PFS and OS, when compared with patients with high expression of these markers and treated with chemotherapy alone [21,22]. All these experiences show that the addition of bevacizumab to chemotherapy permits to improve clinical outcome in a subgroup of patients who usually present with an adverse natural history. In this context, bevacizumab appears to be capable to reverse the poor prognosis conditioned by tumour biology. The finding of an improved response rate and median PFS for patients with high LDH5 expression levels receiving bevacizumab over patients with the same LDH5 overexpression not receiving bevacizumab could represent corroboration to this observation. At the moment, we still do not have response predicting markers for anti-angiogenics such as bevacizumab in advanced CRC, and their identification continues to be a challenge for which in-depth knowledge of the biological processes involved in angiogenesis is essential.

In conclusion, the results of our study suggest that LDH5 overexpression is observed in the majority of patients with advanced CRC. The low expression of LDH5 does not seem to be related to a patient profile with better prognostic clinical characteristics, and in our series it was not associated with favourable Response Rate, OS or PFS. Patients with high expression of LDH5 showed a significant improvement of PFS and numerically higher OS when treated with bevacizumab.

Compliance with Ethical Standards

Due to the characteristics of the study, the ethics committee approved the conduction of the study without obtaining the informed consent from the participating patients since a previous consent for a prior analysis of biomarkers in tumour samples had been obtained and most of the patients had died at the moment of the current analysis.

Research involving human participants and/or animals Ethical standards: the study was approved by an Ethics Committee of Clinical Research and was conducted according to the 1964 Declaration of Helsinki for studies in humans and its later amendments. This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Acknowledgment

The study was funded by a grant for projects of emerging groups in care centres for the promotion of health research in Valencia (Spain) in 2011.

References

1. Garfinkel L, Mushinski M (1999) U.S. cancer incidence, mortality and survival: 1973-1996. *Stat Bull Metrop Insur Co* 80: 23-32.
2. Bleiberg H (1996) Role of chemotherapy for advanced colorectal cancer: new opportunities. *Semin Oncol* 23: 42-50.
3. de Gramont A, Vignoud J, Tournigand C, Louvet C, André T, et al. (1997) Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 33: 214-219.
4. Ferrara N (2001) Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1358-1366.
5. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676.
6. Jain RK (2001) Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 7: 987-989.
7. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E, et al. (2005) Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23: 3706-3712.
8. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, et al. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-2342.
9. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, et al. (2007) Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 25: 153-1544.
10. Saltz L, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, et al. (2008) Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 26: 2013-2019.
11. Kerbel R, Folkman J (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2: 727-739.
12. Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307: 58-62.
13. Smith NR, Baker D, James NH, Ratcliffe K, Jenkins M, et al. (2010) Vascular endothelial growth receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 are localized primarily to the vasculature in human primary solid cancers. *Clin Cancer Res* 16: 3548-3561.
14. Karkkainen MJ, Petrova TV (2000) Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 19: 5598-5605.
15. Gerber HP, Ferrara N (2005) Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 65: 671-680.
16. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C, Polycronidis A, Sivridis E (2005) Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metast* 22: 25-30.
17. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL (2006) Tumour Angiogenesis Research Group. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway. A report of the tumour angiogenesis research Group. *J Clin Oncol* 24: 4301-4308.
18. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, et al. (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45: 228-247.
19. Zaman K, Ryu H, Hall D, O'Donovan K, Lin KI, et al. (1999) Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J Neurosci* 19: 9821-9830.
20. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didiis, et al. (2003) Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-

Citation: Garde-Noguera J, Gil-Raga M, Evgenyeva E, Bernet L, Lombart-Cussac A, et al. (2016) Lactate Dehydrogenase-5 (Ldh-5) Immunohistochemical Expression as Predictor of Efficacy of First-Line Therapy in Patients with Advanced Colorectal Cancer Treated with Chemotherapy and Bevacizumab. *J Clin Exp Pathol* 6: 293. doi:10.4172/2161-0681.1000293

Page 6 of 6

-
- small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 89: 877-885.
21. Scartozzi M, Giampieri R, Maccaroni E, Del Prete M, Faloppi L, et al. (2012) Pre-treatment lactate dehydrogenase levels as predictor of efficacy of first-line bevacizumab-based therapy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 106: 799-804.
 22. Garde-Noguera J, Gil-Raga M, Evgenyeva E, Garcia JA, Lombart-Cussac A, et al. (2016) High pKDR immunohistochemical expression is an unfavourable prognostic biomarker in patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy plus bevacizumab. *Clin Trans Oncol* 18: 405.
 23. Takahashi T, Shibuya M (1997) The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 14: 2079-2089.
 24. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7533-7577.

Role of RAS mutation status as a prognostic factor for patients with advanced colorectal cancer treated with first-line chemotherapy based on fluoropyrimidines and oxaliplatin, with or without bevacizumab: A retrospective analysis

JAVIER GARDE NOGUERA¹, ELOISA JANTUS-LEWINTRE², MIREIA GIL-RAGA³, ELENA EVGENYEVA⁴, SONIA MACIÁ ESCALANTE⁵, ANTONIO LLOMBART-CUSSAC¹ and CARLOS CAMPS HERRERO⁶

¹Medical Oncology Department, Hospital Arnau de Vilanova of Valencia, 46015 Valencia; ²Molecular Oncology Laboratory, University General Hospital of Valencia, Research Foundation, 46014 Valencia; ³Medical Oncology Department, Hospital de Sagunto, 46520 Valencia; ⁴Pathology Department, Hospital Marina-Salud de Denia, 03700 Dénia; ⁵Medical Oncology Department, Hospital General de Elda, 03600 Elda; ⁶Medical Oncology and Molecular Laboratory Department, University General Hospital of Valencia, University of Valencia, 46014 Valencia, Spain

Received January 29, 2016; Accepted December 2, 2016

DOI: 10.3892/mco.2017.1149

Abstract. The role of Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) and neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (NRAS) mutations as negative predictors for anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapies in metastatic colorectal cancer (CRC) has been firmly established. However, whether the RAS mutation status plays a role as a biomarker for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) treatment remains controversial. Data from 93 CRC patients who received first-line cytotoxic chemotherapy with fluoropyrimidines and oxaliplatin, with or without bevacizumab, were analyzed. We investigated the association between the RAS mutation status and clinical outcomes in terms of response rate, progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). Mutations in RAS genes were observed in 47 (52.6%) patients (45 KRAS and 2 NRAS mutations). Patients with tumours harbouring RAS mutations were less suitable for primary tumour resection, were more likely to develop lung metastases, and received bevacizumab treatment for a shorter time period compared with those with wild-type tumours. The response rate to chemotherapy did not differ according to the RAS mutation status, and there were no significant differences in PFS [RAS mutation: 12 months, 95% confidence interval (CI): 8.7-15.2 vs. RAS wild-type: 12 months, 95% CI: 9.67-14.32; $P=0.857$] or OS (RAS

mutation: 20 months, 95% CI: 14.3-25.6 vs. RAS wild-type: 24 months, 95% CI: 18.7-29.2; $P=0.631$). Patients with RAS mutation vs. those with RAS wild-type exhibited a favourable trend in PFS when treated with bevacizumab (13 months, 95% CI: 6.5-19.4 vs. 10 months, 95% CI: 4.2-15.7, respectively; $P=0.07$) and OS (27 months, 95% CI: 18.5-35.4 vs. 15 months, 95% CI: 12.4-17.5, respectively; $P=0.22$). In conclusion, RAS mutations are not a prognostic marker for PFS and OS in CRC patients receiving fluoropyrimidine-oxaliplatin treatment, with or without bevacizumab. RAS mutations are not predictive of the lack of efficacy of bevacizumab, and these patients appear to benefit from anti-angiogenic treatment.

Introduction

In Western countries, ~20% of patients with colorectal cancer (CRC) present with advanced disease stage at diagnosis (1-3). For >40 years, the standard treatment approach for advanced CRC with inoperable metastasis has been systemic chemotherapy. With the advances in systemic chemotherapy for metastatic CRC, survival has increased from 12 months with 5-fluorouracil monotherapy to ~2 years with the addition of oxaliplatin, irinotecan and targeted or biological agents (4-6). There is a need for identifying biomarkers for these biological agents that lead to a personalized approach to cancer treatment, ensuring maximum efficacy while simultaneously minimizing toxicity and treatment-related side effects.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and epithelial growth factor receptor (EGFR) are involved in molecular pathways related to the growth, survival, proliferation and metastasis of tumour cells. Targeted agents that are able to inhibit signal transduction through these proteins have been incorporated into the standard first-line treatment of advanced CRC (7,8). Anti-EGFR therapies with the monoclonal antibodies cetuximab and panitumumab improve chemotherapeutic efficacy, but this effect is restricted to patients with wild-type Kirsten

Correspondence to: Dr Javier Garde Noguera, Medical Oncology Department, Hospital Arnau de Vilanova of Valencia, 12 San Clemente Street, 46015 Valencia, Spain
E-mail: javiergardenoguera@gmail.com

Key words: RAS mutation, prognostic factor, bevacizumab, colorectal cancer

rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) and neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (NRAS) mutations (9,10). Thus, assessing the RAS status is currently a routine procedure worldwide to identify patients that would not benefit from such treatment in order to avoid unnecessary toxicity. However, bevacizumab, a monoclonal antibody against VEGF, was the first inhibitor of angiogenesis approved for the treatment of advanced CRC in combination with chemotherapy, based on the survival benefit observed in clinical trials. However, no biomarker able to identify patients who may benefit from this therapy has been established to date (7).

KRAS is a proto-oncogene encoding a small 21-kD guanosine triphosphate/guanosine diphosphate-binding protein involved in the regulation of cellular response to several extracellular stimuli (11). Mutations within KRAS abrogating GTPase activity and resulting in activation of RAS/RAF signaling are found in 35–42% of CRCs and are considered to occur early during CRC carcinogenesis. Activating mutations in other members of the RAS oncogene family (HRAS and NRAS) have also been described, although they are significantly less frequent. NRAS appears in ~2% of patients with advanced CRC (12). The presence of NRAS mutations has also recently been associated with a lack of benefit from anti-EGFR therapies (13), and has been incorporated in clinical practice as a predictive biomarker to select first-line treatment for patients with advanced CRC.

VEGF is an important regulator of physiological as well as pathological angiogenesis, and it is overexpressed in a number of different tumour types. It has been demonstrated that RAS pathway signaling increases VEGF expression and represses negative regulators of angiogenesis, suggesting that RAS aberrations may modulate the tumour response to anti-angiogenic therapies (14–16). It remains controversial whether KRAS mutation, independently of the use of anti-EGFR therapies, has a prognostic role in CRC (17,18). Different studies published to date have not been conclusive, even several large studies (19,20), and the role of KRAS and NRAS mutation status as a predictor of outcome of oxaliplatin-based chemotherapy and bevacizumab remains uncertain.

The aim of this study was to evaluate the role of RAS mutation status as a predictive and prognostic factor in patients with advanced CRC treated with first-line standard chemotherapy with fluoropyrimidines and oxaliplatin, with or without bevacizumab.

Patients and methods

Study design and ethics. This was a multicenter and retrospective study of patients presenting with advanced CRC at diagnosis who were treated with fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens, with or without bevacizumab, at four different hospitals in Valencia, Spain.

The study was performed following approval by the Independent Ethics Committees of the participating institutions and in accordance with the Declaration of Helsinki, the Good Clinical Practices and local ethical and legal requirements (Spanish laws). Prior to study entry, all the patients (or their relatives) provided written informed consent according to the local ethics committee regulations. This study complied with all applicable regulations for human participant studies.

Patient characteristics. The medical records of patients diagnosed with advanced CRC were reviewed. The patients had pathologically confirmed advanced colorectal adenocarcinoma available for evaluation of KRAS and NRAS mutations, and had been treated between January, 2009 and December, 2012 with a first-line chemotherapy regimen involving FOLFOX or XELOX, with or without bevacizumab.

Treatment and follow-up. All enrolled patients were treated with fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens, with or without bevacizumab. A complete review of the medical history and baseline measures of the tumour prior to treatment initiation were performed to evaluate the patients. The diagnosis and treatment evaluation were performed with computed axial tomography.

The following data were collected from inpatient and outpatient records: Relevant clinical data, such as age, gender, presence of symptoms related to the tumour (weight loss, haemorrhage or bowel occlusion), comorbidities and Eastern Cooperative Oncology Group performance status and tumour-specific data, such as location of primary metastases, number of organs with metastatic involvement and resection of primary tumour. Finally, data on therapy (chemotherapeutic regimen, overall response); time-to-disease progression and overall survival were collected.

Treatment toxicity was assessed according to the criteria published by the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, version 2.0 (https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcmanual_v4_10-4-99.pdf). Tumour response was evaluated according to Response Evaluation Criteria In Solid Tumours, version 1.1 (21). OS was calculated as the time from diagnosis to the date of death, and PFS as the time from treatment initiation to the documented date of disease progression.

RAS mutation analysis. The analysis of RAS mutations was performed using the TheraScreen® KRAS Pyro kit (for KRAS codons 12, 13 and 61), and the TheraScreen® RAS Extension Pyro kit (for KRAS codons 59, 117 and 146, and NRAS codons 12, 13, 59, 61, 117 and 146) (Qiagen, Madrid, Spain), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 5 µl of template DNA (10 ng of genomic DNA) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using, 12.5 µl of PyroMark® PCR Master Mix 2x, 2.5 µl of Coral Load Concentrate 10x, 4 µl of nuclease-free water, and 1 µl of the corresponding set of PCR primers (Qiagen). The reactions took place in a MasterCycler® thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) under the following cycling conditions: 94°C for 15 min; 42 cycles of denaturation at 95°C for 20 sec; annealing at 53°C for 30 sec, followed by extension at 72°C for 20 sec.

The amplicons were immobilised on Streptavidin Sepharose® High Performance beads (Qiagen) to prepare the single-stranded DNA and the sequencing primers were annealed to it using a PyroMark Q24 plate and a vacuum workstation (Qiagen). PyroMark Gold Q24 reagents (enzyme mixture, substrate mixture and nucleotideall from Qiagen) were then prepared and loaded into a cartridge so they could be dispensed during the sequencing process. Finally, the plate and the cartridge were loaded into the PyroMark Q24 System and the sequencing process was initiated. The sequences were

analysed using software provided by the manufacturer (Qiagen). In each run, two controls were included: Unmethylated control DNA, which worked as a positive control for PCR and sequencing reactions, and a negative control (without template DNA).

Statistical analysis. All statistical analyses were performed using the SPSS statistical package, version 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). A descriptive statistics analysis, including measures of central tendencies and dispersions of quantitative variables, as well as absolute and relative frequencies for categorical variables, was also performed; t-test was used to compare two independent samples of continuous variables.

The Chi-square test was used to compare two or more independent groups of subjects with respect to a given categorical variable. PFS and OS according to KRAS status were analyzed using the Kaplan-Meier method to estimate the probability of survival and survival difference with the use of the log-rank test. All reported P-values were the result of two-sided tests, with $P < 0.05$ considered statistically significant.

Results

Patient characteristics. A total of 93 patients with advanced CRC and available samples for NRAS and KRAS analysis, who were treated with fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens (XELOX or FOLFOX), with or without bevacizumab, were identified. A total of 49 patients (52.6%) had tumours with RAS mutations, namely 47 KRAS and 2 NRAS mutations. The patient characteristics (of the global population and by RAS status) are summarized in Table I. The median age of the patients was 65 years (range, 39-83 years) at diagnosis, and the male/female ratio was 1.5/1.0. The characteristics of the patients were generally similar between the RAS mutation and wild-type groups. The proportion of patients with RAS mutations who underwent surgery for the primary tumour was significantly lower compared with that of patients with RAS wild-type tumours ($P=0.019$), and they exhibited a higher rate of lung metastases (34.6 vs. 15.9%, respectively; $P=0.03$). Furthermore, patients with RAS mutations were less likely to receive bevacizumab in the first-line treatment setting compared with the wild-type population (29.5 vs. 44.8%, respectively; $P=0.09$).

Treatment efficacy. The overall response rate (ORR) with first-line chemotherapy treatment was 53.8%, and the disease control rate (DCR) was 81.2%. There were no significant differences in ORR according to the RAS mutation status (mutation vs. wild-type, 48.9 vs. 58.9%, respectively; $P=0.129$), as shown in Table II.

The median PFS for the global population was 12 months, without significant differences between groups [RAS mutation: 12 months, 95% confidence interval (CI): 8.7-15.2 vs. RAS wild-type: 12 months, 95% CI: 9.67-14.32; $P=0.857$]. The median OS was 22 months, without a significant difference according to the RAS status (RAS mutation: 20 months, 95% CI: 14.3-25.6 vs. RAS wild-type: 24 months, 95% CI: 18.7-29.2; $P=0.631$), as shown in Fig. 1.

Patients treated with bevacizumab exhibited a median PFS of 12 vs. 11 months for those treated with chemotherapy alone ($P=0.055$). Significant differences in OS according to the use of bevacizumab in the overall population were not observed, although there was a favourable trend for patients treated with the combination of chemotherapy and bevacizumab (patients receiving bevacizumab reached an OS of 27 months (95% CI: 21.9-32), whereas patients without bevacizumab reached an OS of 20 months (95% CI: 13.8-26.1; $P=0.25$). Patients with RAS mutations also exhibited a non-significant favourable trend in PFS when treated with bevacizumab (13 months, 95% CI: 6.5-19.4) compared with those treated with chemotherapy alone (10 months, 95% CI: 4.2-15.7; $P=0.07$). The median OS was longer in patients with RAS mutations who received bevacizumab, but this difference did not reach statistical significance (27 months, 95% CI: 18.5-35.4 vs. 15 months, 95% CI: 12.4-17.5, respectively; $P=0.22$) as shown in Fig. 2. Furthermore, the median OS of patients treated with bevacizumab was similar between the RAS mutation and wild-type groups (27.0 vs. 27.0 months, respectively; $P=0.562$).

Discussion

This retrospective study was designed to analyze the prognostic role of RAS mutations in patients with advanced CRC treated with fluoropyrimidine and oxaliplatin chemotherapy, with or without bevacizumab. We also assessed whether patients with RAS mutations obtain any benefit from bevacizumab treatment.

The predictive and prognostic value of KRAS mutations in patients with advanced CRC treated with first-line chemotherapy and anti-EGFR therapy has been confirmed by retrospective analysis of phase III trials with cetuximab and panitumumab (9,10). Amado *et al* (9) published data from a randomized trial comparing panitumumab monotherapy with best supportive care (BSC) in patients with chemotherapy-refractory advanced CRC they detected KRAS mutations in 43% of the patients, and observed that the efficacy of panitumumab was significantly higher in the wild-type group in terms of PFS (12.3 vs. 7.3 weeks, respectively; $P < 0.001$), response rate (17 vs. 0%, respectively) and OS [hazard ratio (HR)=0.67; 95% CI: 0.55-0.82]. Similarly, Karapetis *et al* (10) reported results from 394 patients included in a phase III trial that compared cetuximab with BSC in chemotherapy-refractory advanced CRC they detected KRAS mutations in 42.3% of the patients, and the presence of this molecular aberration was associated with a lack of benefit from cetuximab treatment in terms of OS (4.8 vs. 9.5 months, respectively; HR=0.55; 95% CI: 0.41-0.74; $P < 0.001$) and PFS (1.9 vs. 3.78 months, HR=0.40; 95% CI: 0.30-0.54; $P < 0.001$). They also observed that the mutation status of the KRAS gene did not affect survival among patients treated with BSC alone. More recently, mutations in NRAS, another member of the RAS oncogene family, that appear in 2-5% of patients with advanced CRC, have also been found to predict lack of response to anti-EGFR treatment (22). Doudillard *et al* retrospectively analyzed the efficacy and safety of panitumumab plus FOLFOX chemotherapy according to the RAS (KRAS and NRAS) mutation status (22); they detected NRAS mutations in 3.4% of the patients, and their association with

Table I. Clinicopathological factors.

Variables	Total (n=93)	RAS wild-type (n=44)	RAS mutation (n=49)	P-value
Age, years (range)	65 (39-83)	68.5 (46-80)	68 (39-83)	
Gender				0.101
Male	56 (60.2)	30 (68.1)	26 (53.0)	
Female	37 (39.8)	14 (31.9)	23 (47.0)	
Performance status, n (%)				0.402
0-1	76 (81.1)	35 (79.5)	41 (83.7)	
2	17 (19.9)	9 (20.1)	8 (16.3)	
Tumour-related symptoms, n (%)				
Weight loss >10%	17 (18.3)	10 (22.7)	7 (17.0)	0.143
Bleeding	30 (32.3)	16 (47.0)	7 (17.0)	0.184
Occlusion	8 (8.6)	1 (3.0)	14 (34.1)	0.056
Surgery of primary tumour, n (%)				0.019*
Yes	49 (52.6)	18 (41.0)	16 (32.6)	
No	42 (47.4)	26 (59.0)	33 (67.3)	
Location of metastases, n (%)				
Liver	75 (80.6)	38 (86.3)	37 (75.5)	0.145
Peritoneum	19 (20.4)	10 (22.7)	9 (18.3)	0.396
Lung	24 (25.8)	7 (15.9)	17 (34.6)	0.033*
Bone	3 (3.2)	0 (0.0)	3 (6.1)	0.142
Lymph node	22 (23.7)	10 (22.7)	12 (24.4)	0.519
Number of metastatic locations, n (%)				0.517
1	52 (55.9)	25 (56.8)	27 (20.4)	
≥2	48 (44.1)	19 (43.1)	22 (44.9)	
Operable metastases after chemotherapy, n (%)				0.194
Yes	17 (19.8)	10 (25.0)	7 (15.2)	
No	69 (80.0)	30 (75.0)	39 (84.7)	
Serum levels, n (%)				
CEA (high)	62 (66.7)	30 (75.0)	32 (76.1)	0.552
LDH (high)	32 (52.5)	15 (53.5)	17 (51.5)	0.539
Haemoglobin (low)	22 (28.6)	10 (27.7)	12 (29.2)	0.544
Grade of differentiation, n (%)				0.693
1	12 (12.9)	5 (15.6)	7 (21.2)	
2	43 (46.2)	22 (68.7)	21 (63.6)	
3	9 (9.7)	5 (15.6)	4 (12.1)	
Chemotherapy scheme, n (%)				0.095
FOLFOX/XELOX	58 (62.4)	13 (29.5)	22 (44.8)	
FOLFOX/XELOX-B	35 (37.6)	31 (70.5)	27 (55.1)	

*Statistically significant differences. CEA, carcinoembryonic antigen; LDH, lactate dehydrogenase.

a shorter PFS (10.1 vs. 7.9 months, respectively; HR=0.72; 95% CI: 0.58-0.90; P=0.004) and OS (26.0 vs. 20.2 months, respectively; HR=0.78; 95% CI: 0.62-0.99; P=0.04). Thus, the presence of RAS mutations is considered to be a negative predictive factor of response to anti-EGFR therapies. However, its role as a prognostic factor for OS in patients treated with chemotherapy alone, or in combination with bevacizumab, remains unclear.

The data reported by our study suggest that RAS status does not have a prognostic value for PFS or OS in patients with advanced CRC treated with optimal first-line chemotherapy. Our study, similar to other studies published to date investigating this issue, has a retrospective nature and may yield conflicting results. Our findings are in accordance with data from other small retrospective studies that did not identify an association between RAS mutation status and patient

Table II. Response to treatment, n (%).

Response	RAS mutation	RAS wild-type	P-value
Complete response	0 (0.0)	2 (4.5)	0.129
Partial response	24 (48.9)	24 (54.4)	
Stable disease	12 (24.4)	7 (15.9)	
Progressive disease	10 (20.4)	6 (13.6)	

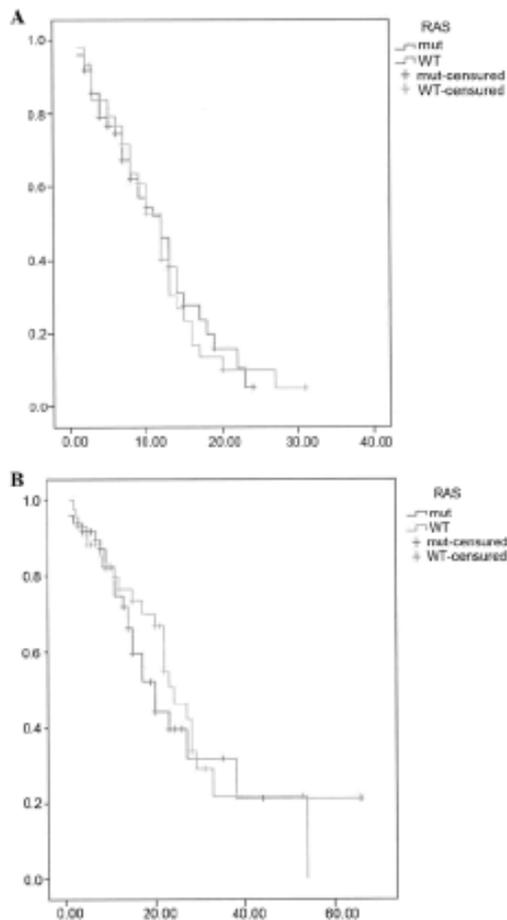


Figure 1. (A) Progression-free survival (PFS) and (B) overall survival (OS) by RAS status. WT, wild-type; mut, mutation.

outcome (23-25). Kim *et al* analyzed 103 patients evaluable for KRAS mutation status treated with chemotherapy without anti-EGFR therapy, and they did not observe differences in response rate, PFS or OS according to RAS status (25). Two large collaborative studies of the KRAS by the Colorectal Cancer Collaborative Group (RASCAL) reported conflicting results (26,27). While the first RASCAL study reported an increased risk of recurrence and mortality associated with KRAS mutations, the second study refined this observation

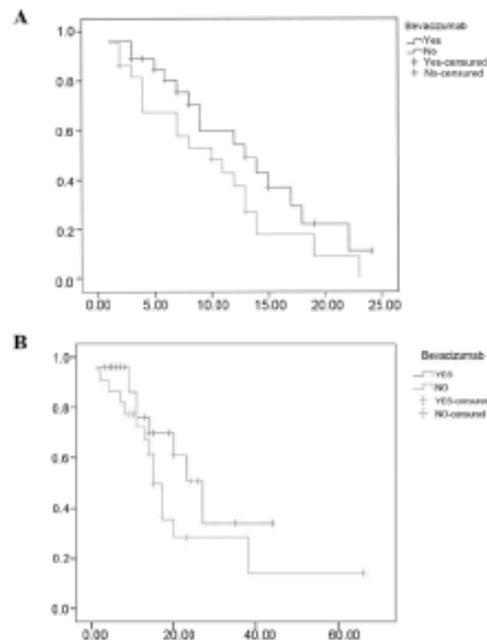


Figure 2. (A) Progression-free survival (PFS) and (B) overall survival (OS) of patients with tumours harbouring RAS mutations according to treatment with bevacizumab.

to report a significant prognostic value in failure-free survival only with the G12V mutation in Duke's C patients. It is difficult to compare the results of all these retrospective studies, since there are several confounding factors that may affect the findings. The majority of these series are based on small patient samples, and none of the previously published studies incorporated in their analysis the presence of NRAS mutation-however, it is remarkable that most conclude that there is no association between RAS mutation status and patient outcome.

Regarding our second objective, we observed no association between RAS mutation status and the efficacy of bevacizumab. We observed that patients with RAS mutation presented with a longer median PFS and OS when treated with bevacizumab; however, the difference was not statistically significant. Furthermore, we observed no difference in PFS or OS in patients treated with bevacizumab according to the RAS status. Our findings suggest that RAS mutational status has no predictive value for bevacizumab outcome in patients with advanced CRC. Our findings are consistent with previous retrospective studies. Hurwitz *et al* observed no apparent association between the improved PFS and KRAS status for patients treated with bevacizumab and irinotecan and fluoropyrimidine chemotherapy (28). More recently, the MAX study confirmed that KRAS mutation status was neither prognostic for OS nor predictive for bevacizumab outcome in patients with advanced CRC (29). These two studies analyzed the role of KRAS mutations in patients treated with irinotecan-or mytomicin-based chemotherapy plus bevacizumab, which are not the most commonly used chemotherapeutic regimens worldwide in the first-line setting. Kim *et al* (30) published a

retrospective study of 32 patients with advanced CRC treated with bevacizumab and cytotoxic chemotherapy based on oxaliplatin; they observed that the KRAS mutation status was neither predictive for bevacizumab nor a prognostic factor for OS in these patients. All our patients received standard cytotoxic oxaliplatin and fluoropyrimidine treatment, with or without bevacizumab, and were analyzed for NRAS and KRAS mutations, adding significant evidence on the lack of effect of RAS mutation status on the outcome of bevacizumab.

In summary, these findings suggest that RAS mutation status is not a prognostic factor for OS in patients with advanced CRC, and is also not predictive of the response to bevacizumab in combination with an optimal chemotherapy regimen based on oxaliplatin and fluoropyrimidines.

References

- National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology and End Results Program. www.seer.cancer.gov. Accessed May, 2013.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL and Trotti A (Eds): AJCC cancer staging manual. 7th edition. Springer, New York, NY, p143, 2010.
- Siegel R, Naishadham D and Jemal A: Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62: 10-29, 2012.
- Bleiberg H: Role of chemotherapy for advanced colorectal cancer. *New opportunities. Semin Oncol* 23 (Suppl 3): 42-50, 1996.
- de Gramont A, Louvet C, André T, Tournigand C and Krulik M: A review of GERCOD trials of bimonthly leucovorin plus 5-fluorouracil 48-h continuous infusion in advanced colorectal cancer: Evolution of a regimen. *Groupe d'Etude et de Recherche sur les Cancers de l'Ovaire et Digestifs (GERCOD). Eur J Cancer* 34: 619-626, 1998.
- Capdevila J, Elez E, Peralta S, Macarulla T, Ramos FJ and Tabernero J: Oxaliplatin-based chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 8: 1223-1236, 2008.
- McCormack PL and Keam SJ: Bevacizumab: A review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs* 68: 487-506, 2008.
- Blick SK and Scott LJ: Cetuximab: A review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer. *Drugs* 67: 2585-2607, 2007.
- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, *et al*: Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 1626-1634, 2008.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, *et al*: K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359: 1757-1765, 2008.
- Schubbert S, Shannon K and Bollag G: Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 295-308, 2007.
- Irahara N, Baba Y, Nishio K, Shima K, Yan L, Dias-Santagata D, Infrate AJ, Fuchs CS, Haisig KM and Ogino S: NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagn Mol Pathol* 19: 157-163, 2010.
- De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, Kalogeris KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, *et al*: Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3Ca mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 11: 753-762, 2010.
- Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, *et al*: Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400: 468-472, 1999.
- Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T and Kerbel RS: Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: Implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 55: 4575-4580, 1995.
- Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA and Weinberg RA: Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 3: 219-231, 2003.
- Klump B, Nehls O, Olkch T, Hsieh CJ, Gaco V, Gittinger FS, Sarbia M, Borchard F, Greschniok A, Gruenagel HH, *et al*: Molecular lesions in colorectal cancer: Impact on prognosis? Original data and review of the literature. *Int J Colorectal Dis* 19: 23-42, 2004.
- Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, Dietrich D, Biesmans B, Bodoky G, Barone C, *et al*: Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 28: 466-474, 2010.
- Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M and Slattery ML: Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: A population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1193-1197, 2000.
- Ince WL, Jubb AM, Holden SN, Holmgren EB, Tobin P, Sridhar M, Hurwitz H, Kabbinavar F, Novotny WF, Hillan KJ and Koeppen H: Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *J Natl Cancer Inst* 97: 981-989, 2005.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, *et al*: New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45: 228-247, 2009.
- Doudillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jasssem J, *et al*: Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 369: 1023-1034, 2013.
- González-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM and Fernández-Peralta AM: Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 27: 39-45, 2004.
- Westra JL, Schaapveld M, Hollema H, de Boer JP, Kraak MM, de Jong D, ter Elst A, Mulder NH, Buys CH, Hofstra RM and Plukker JT: Determination of TP53 mutation is more relevant than microsatellite instability status for the prediction of disease-free survival in adjuvant-treated stage III colon cancer patients. *J Clin Oncol* 23: 5635-5643, 2005.
- Kim ST, Park KH, Kim JS, Shin SW and Kim YH: Impact of KRAS mutation status on outcome in metastatic colon cancer patients without anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Cancer Res Treat* 45: 55-62, 2013.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR and Clarke PA: Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: The multicenter 'RASCAL' study. *J Natl Cancer Inst* 90: 675-684, 1998.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, *et al*: Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: The 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85: 692-696, 2001.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, *et al*: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-2342, 2004.
- Price TJ, Hardingham JE, Lee CK, Weickhardt A, Townsend AR, Wrin JW, Chua A, Shivasami A, Cummins MM, Murome C and Tebbutt NC: Impact of KRAS and BRAF gene mutation status on outcomes from the Phase III AGITG MAX Trial of capecitabine alone or in combination with bevacizumab and mitomycin in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 29: 2675-2682, 2011.
- Kim ST, Park KH, Shin SW and Kim YH: Does KRAS mutation status affect on the effect of VEGF therapy in metastatic colon cancer patients? *Cancer Res Treat* 46: 48-54, 2014.

Peritoneal Carcinomatosis and Multi-Organ Metastases are Prognostic Factors in Colorectal Cancer: A Retrospective Analysis

Javier Garde-Noguera^{1,*}, Mireia Gil-Raga², Asunción Juárez-Marroquí³,
Sonia Macia-Escalante³, Manuel Terradez-Gurrea⁴,
Carlos Camps-Herrero⁵, Antonio Llombart-Cussac¹

¹Medical Oncology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, c/San Clemente nº12, 46015, Valencia, Spain

²Medical Oncology Department, Hospital de Sagunto, Valencia, Avenida Ramón y Cajal, S/N, 46520 Sagunt, Valencia, Spain

³Medical Oncology Department, Hospital de Elda, Alicante, Carretera Elda-Sax sn, 03600, Spain

⁴Politecnia University of Valencia, Spain

⁵Medical Oncology Department, Hospital General de Valencia, Av. de les Tres Creus, 2, 46014 València, Spain

Abstract: Background: Peritoneal carcinomatosis and multi-organ metastases might be prognostic factors in patients with advanced colorectal cancer and inoperable metastases at diagnosis.

Methods: A retrospective study was performed to examine the relationship between patient clinical characteristics and prognosis in patients with colorectal cancer and indication for first-line systemic chemotherapy.

Results: One hundred and twelve patients were accrued. According to univariate analysis, peritoneal carcinomatosis, lack of primary tumour resection and multi-organ metastases were associated with poor overall survival. According to multivariate analysis, patients with peritoneal carcinomatosis and patients with multi-organ metastases had a shorter overall survival (12 vs 27.0 months, $p < 0.001$ and 14,6 vs 27 months, $p = 0.007$, respectively).

Conclusions: Our results indicate that presence of peritoneal carcinomatosis and multi-organ metastases are independent predictors of poor outcome for patients with colorectal cancer undergoing first line treatment with standard chemotherapy.

Keywords: Colorectal cancer, prognostic factors, peritoneal carcinomatosis, first line chemotherapy, multi-organ metastases.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequently observed forms of cancer and one of the principal causes of cancer-related death in Western countries. Approximately 20% of patients present advanced disease the time of diagnosis and 50% of the patients diagnosed at an early stage develop metastasis and die from the disease [1-3]. The standard approach for advanced CRC with inoperable metastasis has been systemic treatment with chemotherapy for over 40 years. First approved agent was 5-fluorouracil (5-FU), which provided response rates (RR) between 10-20% as a single agent [4], followed by combinations with oxaliplatin, that increased both RR and overall survival (OS) [5], and finally with the addition of bevacizumab (Avastin®) a humanized monoclonal antibody that blocks tumour

angiogenesis by binding to vascular endothelial growth factor [6-8]. Data from several studies in CRC suggest that the addition of targeted agents, such as bevacizumab, may be even more effective than irinotecan- or oxaliplatin-based chemotherapy alone. Bevacizumab has shown in several randomized clinical trials a clear benefit when it is used in combination with various standard chemotherapy regimens [9-12]. The combined use of XELOX plus bevacizumab provides a median progression free survival (PFS) of 9.4 months and a median OS of 21.3 months [12], and this combination is currently the most commonly used first-line treatment in patients with advanced CRC.

Despite these improvements in modern chemotherapeutic and targeted agents for treating CRC, long-term survival in patients with stage IV CRC is still limited, with most of these patients having a poor 5-year survival rate (<15 %) [13]. Surgery remains an important treatment option for advanced CRC, especially since it offers a curative option for select groups: patients with metastatic disease confined to a

*Address correspondence to this author at the Medical Oncology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, c/San Clemente nº12, 46015, Valencia, Spain; E-mail: javiergardenoguera1@gmail.com

single organ, patients with a local recurrence only, or patients with limited intra-abdominal disease. In such cases, an aggressive and multimodal management integrating both surgical resection and systemic chemotherapy treatment allows achieving long-term surviving rates of 50% [14]. Different factors may influence the initial resectability status of metastases, such as the size and number of metastases, synchronous/metachronous presentation, tumour marker levels, poor/clear location, and presence/absence of extrahepatic disease. Unfortunately, in most cases of CRC, treatment is palliative rather than curative, and the main objectives are to increase OS and maintain quality of life for as long as possible.

Surgical approach has been widely studied for liver metastases, but there are less solid data for other locations. From 10 to 25% of the patients who present liver metastasis are eligible for complete primary surgical resection, with a cure rate of about 30%, a 5-year survival of 40-60% and acceptable perioperative morbidity and mortality rates.

From 75 to 90% of patients with metastatic CRC are not candidates for initial complete resection, and in those cases the selected treatment is palliative chemotherapy [15].

Different clinical and pathological characteristics have been proposed as prognostic factors for patients with non resectable CRC undergoing first line systemic chemotherapy, such as the presence of peritoneal carcinomatosis [16], number of metastatic locations, elevated tumoural markers, the presence of KRAS mutations [17] and site of primary tumour [18]. However, to date there is no reliable strategy for predicting the survival of individual patients undergoing chemotherapy. This has led to an increased interest in identifying prognostic factors that could permit more accurate patient stratification. Such prognostic factors would help oncologists and their patients to making treatment decisions, and could be key for better designed and focused clinical trials.

The aim of this study was to identify predicting factors of short-term survival in patients with stage IV CRC treated with first line chemotherapy based in fluoropyrimidine and oxaliplatin chemotherapy with or without bevacizumab.

MATERIAL AND METHODS

This was a multicenter and retrospective study of patients with advanced CRC at time of diagnosis, who

had been treated with fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens (with or without bevacizumab), at four different hospitals in Valencia (Spain). The chemotherapy regimen used, as well as the number of cycles, varied depending on response and patients' profile.

The study was approved by the institution's independent ethics committee and performed in accordance with the Helsinki Declaration of Good Clinical Practices, as well as local ethical and legal requirements. All patients (or relatives) provided written informed consent according to local ethical committee regulations.

Patient Characteristics

The medical records of patients diagnosed with advanced CRC were reviewed. Patients presented histologically confirmed CRC and were treated between January 2010 and December 2013 with a first-line chemotherapy regimen involving FOLFOX or XELOX with or without bevacizumab.

Treatment and Follow-Up

All enrolled patients were treated with fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens (with or without bevacizumab). A complete review of the medical history was performed, including age, sex, primary tumour location, synchronous or metachronous diagnosis of metastases, presence of symptoms related to the tumour (weight loss, tumour bleeding, or bowel occlusion), comorbidity, Eastern Cooperative Oncology Group performance status, number of organs with metastatic involvement and resection of primary tumour, primary tumor resection, presence of extrahepatic disease and baseline measures of the tumour at baseline. Diagnosis and treatment evaluation were carried out with computed axial tomography, according to RECIST 1.1 criteria. Analytical data was also collected at baseline, including hematologic cell counts, lactate dehydrogenase (LDH) and carcinoembryonic antigen (CEA) levels. Therapy data was also collected (chemotherapy regimen, OR); time to progression disease (PD) and OS.

Treatment toxicity was assessed according to National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) version 2.0. OS was calculated as the time elapsed from diagnosis to the date of death; PFS as considered as the time elapsed from the start of treatment to the date of PD.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using the SPSS statistical package version 16. A descriptive statistics analysis, including measures of central tendencies and dispersions of quantitative variables, as well as absolute and relative frequencies for categorical variables, was also carried out. T-test was used to compare two independent samples of continuous variables.

The chi-square test was used to compare two or more independent groups of subjects with respect to a given categorical variable. Univariate Cox proportional-hazards models were used for all potential baseline predictors to compute hazard ratios (HR) and their 95 % confidence intervals (CI), and a multivariate Cox proportional-hazards model to identify independent prognostic factors by multivariate analysis. A P-value of <0.1 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Between January 2010 and December 2013, 112 patients with advanced CRC at time of diagnosis were treated with fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens (XELOX or FOLFOX) with or without bevacizumab. Patient's characteristics are summarized in Table 1. Median age was 65 years, most patients had a good ECOG-PS 0-1 (79,8%), had been treated with primary tumour resection (55,4%), presented one site of metastases (53,6 %), and received combination treatment with chemotherapy plus bevacizumab (67,6%). Median OS was 23 months and median PFS 12.2 months. Three patients achieved complete response (CR) (2,7%), and 60 patients partial response (PR) (53,6%), with an overall response rate (ORR) of 56,3%. Sixteen patients presented stable disease (SD) and 14 progressed during first line treatment.

An univariate analysis was performed to evaluate the influence of clinical characteristics on OS (Table 2). Variables that were significantly associated with shorter OS were the presence of PC (HR 1.78, 95% IC 1.6-2.41, p-value 0.001), number of metastases locations (2 or more organs vs 1 organ; HR 2.38, 95% IC 1.21-3.58, p-value 0.007), and absence of primary tumour resection (HR 1.44, 95% IC 0.94-2.75, p-value 0.08). Performance-Status 2 or more, weight-loss over 10%, and lack of bevacizumab showed a not-significant trend to worse prognosis (p-value <0.2). When those patients that had received bevacizumab were analyzed

Table 1: Clinicopathological Factors

Variable	Total n = 112
Age, years (range)	65 (39-83)
>70 years	46 (40.7%)
<70 years	66 (58.3%)
Sex	
Male	66 (58.9%)
Female	46 (41.1%)
Performance Status	
0-1	87 (79.8%)
2	22 (20.2%)
Tumour related symptoms	
Weight loss >10%	21 (18.6%)
Bleeding	35 (37.8%)
Occlusion	10 (10.9%)
Surgery of Primary Tumour	
Yes	62 (55.4%)
No	50 (44.6%)
Location of Metastases	
Liver	89 (79.5%)
Peritoneum	24 (21.4%)
Lung	32 (28.6%)
Bone	3 (2.7%)
Lymph node	27 (24.1%)
Number of Metastatic Locations	
1	60 (53.6%)
2 or more	52 (46.4%)
Serum Levels	
CEA (high)	76 (80.9%)
LDH (high)	32 (49.2%)
Hemoglobine (low)	46 (54.1%)
Grade of differentiation	
1	15 (20%)
2	49 (65.3%)
3	10 (13.3%)
KRAS	
Mutated	42 (37.8%)
Wild-Type	40 (36%)
Unknown	29 (26.1%)
Chemotherapy scheme	
FOLFOX/XELOX	36 (32.3%)
FOLFOX/XELOX-B	76 (67.6%)

separately it was found that, for patients receiving bevacizumab, high CEA level was also a shorter survival predictor, while PC is the only prognostic factor that achieved statistical significance in our model for patients treated exclusively with chemotherapy. With those factors that presented high or medium significance (ie: Performance Status 2, Weight

Table 2: Univariate Analysis of Factors Associated with Overall Survival in Patients with Stage IV Colorectal Cancer

Variable n= 112	Univariate analysis Hazard Ratio 95% CI	Log-Rank test p-value	Significance
Age, years <70 > or = 70	1 1.31 (0.37-1.319)	0,269	NS
Sex male Female	1 1,41 (0.58-1.73)	0,974	NS
Performance Status 0-1 2	1 1.202 (0.85-2.95)	0,142	Doubtful
Tumour related symptoms Weight loss >10% Bleeding Occlusion	1,77 (0.31-2.87) 1.624 (0.56-1.85) 1.891 (0.474-3.7)	0,188 0,942 0,474	Doubtful NS NS
Surgery of Primary Tumour Yes No	1 1.446 (0.942-2.754)	0,081	Significant
Location of Metastases Liver Peritoneum Lung Lymph node	1.205 (0.58-2.33) 1.786 (1.60-2.41) 0.86 (0.35-1.38) 0.83 (0.38-1.28)	0,662 0,002 0,160 0,250	NS Significant NS NS
Number of organs with metastases 1 2 or more	1 2.38 (1.21-3.58)	0,008	Significant
Serum Levels CEA (high) LDH (high) Hemoglobine (low)	1.19 (0.44-1.78) 1.50 (0.45-1.74) 1.45 (0.53-1.84)	0,746 0,723 0,991	NS NS NS
KRAS Mutated	1.488 (0.59-2.11)	0,726	NS
Bevacizumab treatment Yes No	1 1.321 (0.83-2.47)	0,189	Doubtful

This table provides the P-value of the statistician log-rank, for all predictive variables tested, and a qualitative evaluation of the result:

1. Significant, if p-value inferior to 0,1.

2. Doubtful if the p-value is superior to 0,1 but lower than 0,2.

3. Not-significant (NS), if p-value > 0,2.

In this study we will use 0,1 as a significance threshold. Although it is more common to use 0,05 instead, this is a convention, and we shouldn't forget that the final purpose is to develop a multivariate model, where some factors can play an important role although they are not strongly significant on their own.

loss>10%, Primary Tumour not operated, Peritoneal Carcinomatosis, 2 or more organs with metastases and Not bevacizumab treatment), we conducted a multivariate Cox analysis, with Enter method (every variable is introduced). The results of this first approach suggest that Peritoneal Carcinomatosis and 2 or more organs with metastases should be the two only variables on the next analysis, which was a new Cox regression with Enter method but with just those two factors. According to multivariate Cox analysis, PC (HR

1.764, 95% CI 1.67-2.60, $P= 0.017$), and multi-organ metastases (HR 1.438, 95% CI 1.13-4.57, $P = 0.02$) were independently associated with short-term OS (Table 3).

Clinicopathological characteristics of patients by presence of PC and single vs multi-organ metastases are summarized in Table 4. There were not reached significant differences in age, gender, Performance Status, histology, KRAS mutation status or use of

Table 3: Multivariate Analysis of Factors Associated with Overall Survival in Patients with Stage IV CCR

Variable	Multivariate analysis Hazard Ratio, 95% CI	p-value
Performance Status 2	1.202 (0.44-2.2)	0,982
Weight loss >10%	1,787 (0.285-2.07)	0,2
Primary Tumour not operated	1.438 (0.570-2.234)	0,730
Peritoneal Carcinomatosis	1.764 (1.67-2.60)	0,017*
2 or more organs with metastases	1.438 (1.13-4.57)	0,02*
Not bevacizumab treatment	1.326 (0.68-2.49)	0,418

Table 4: Clinico-Pathological Factors by Presence of Peritoneal Carcinomatosis (PC) and Multi vs Single-Organ Metastases

Variable	Peritoneal Carcinomatosis n=24 (%)	Non Peritoneal Carcinomatosis n=88 (%)	P value	Multi-organ metastases n 52 (%)	Single-organ Metastases n = 60 (%)	P value
Age, years (range)	62.3 (39-77)	66.5 (47-83)	0.867	67.5 (39-83)	68 (42-81)	0.827
Sex			0.437			0.327
Male	15 (62.5%)	51 (57.9%)		33 (63.4%)	33 (55%)	
Female	9 (37.5%)	37 (42%)		19 (36.6%)	27 (45%)	
Performance Status			0.067			0.250
0-1	16 (66.6%)	71 (83.5%)		38 (76%)	49 (83%)	
2	8 (33.3%)	14 (16.5%)		12 (24%)	10 (17%)	
Tumour related symptoms						
Weight loss >10%	6 (28.5%)	15 (21.1%)	0.329	12 (29.2%)	9 (17.6%)	0.142
Bleeding	4 (19%)	31 (43%)	0.038*	16 (38%)	19 (37.2)	0.552
Occlusion	1 (4.7%)	9 (12.6%)	0.281	2 (4.8 %)	8 (15.6%)	0.091
Surgery of Primary Tumour			0.462			0.105
Yes	14 (58.3%)	48 (54.5%)		25 (48%)	37 (61.6%)	
No	10 (41.7%)	40 (45.5%)		27 (52%)	23 (38.3%)	
Location of Metastases						
Liver	13 (54.1%)	76 (86.3%)	0.001*	41 (78.8%)	48 (80%)	0.532
Peritoneum				18 (34.6%)	6 (10%)	0.002*
Lung	4 (16.6%)	28 (31.8%)	0.112	29 (55.7%)	3 (5%)	0.001*
Bone	1 (4.1%)	2 (2.2%)	0.519	2 (3.8%)	1 (1.6%)	0.446
Lymph node	11 (45.8%)	16 (18.1%)	0.007*	25 (48%)	2 (3.3%)	0.001*
Number of Metastatic Locations			0.002*			
1	6 (25%)	54 (61.3%)				
2 or more	18 (75%)	34 (38.6%)				
Serum Levels						
CEA (high)	17 (77.2%)	59 (81.9%)	0.417	37 (82.2%)	39 (79.5%)	0.477
LDH (high)	5 (41.6%)	27 (50.9%)	0.398	15 (50%)	17 (48.5%)	0.553
Hemoglobine (low)	9 (45%)	37 (56.9%)	0.248	23 (57.5%)	23 (51.1%)	0.355
Grade of differentiation			0.56			0.254
1	5 (25%)	10 (18.1%)		7 (20.5%)	8 (19.5%)	
2	11 (55%)	38 (69%)		24 (70.5%)	25 (60.9%)	
3	4 (20%)	6 10.9%)		3 8.8%)	8 (19.5%)	
KRAS			0.539			0.568
Mutated	7 (29.1%)	35 (40.2%)		18 (34.6%)	24 (40.6%)	
Wild-Type	9 (37.5%)	31 (35.6%)		18 (34.6%)	22 (37.2%)	
Unknown	8 (33.3%)	21 (24.1%)		16 (27.1%)	13 (22%)	
Chemotherapy scheme			0.344			0.234
FOLFOX/XELOX	15 (62.5%)	61 (69.3%)		19 (36.6%)	17 (28.3%)	
FOLFOX/XELOX-B	9 (37.5%)	27 (30.7%)		33 (63.4%)	42 (71.6%)	

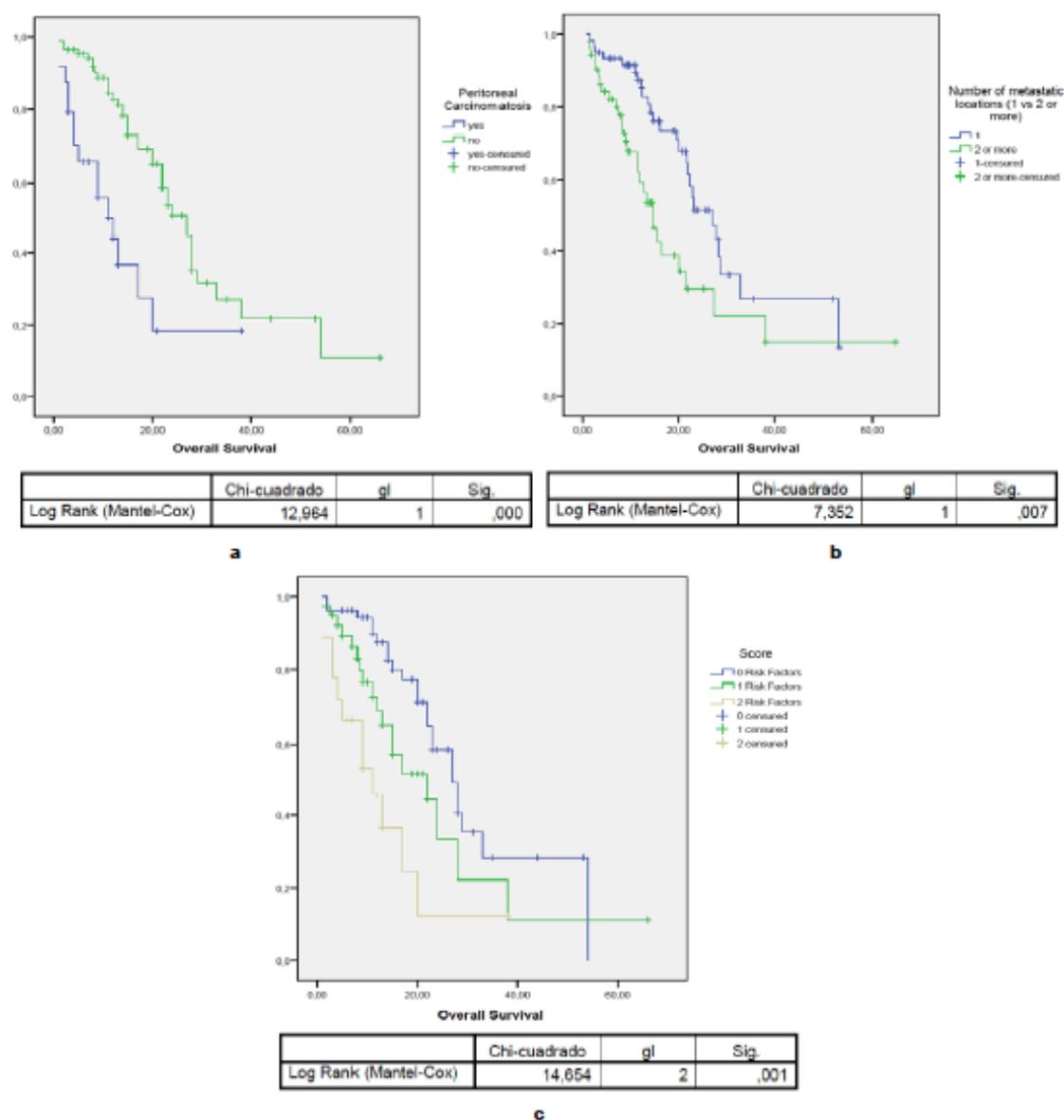


Figure 1: 1a. Kaplan-Meier survival curves according to Peritoneal Carcinomatosis. 1b. Kaplan-Meier curves according to multi-organ metastases. 1c. Kaplan-Meier curves according to number of risk factors 0 vs 1 vs 2.

bevacizumab between groups. Twenty-four patients had PC at the moment of diagnosis. Median OS was shorter in patients with PC as compared with those patient without this condition (12 vs 27.0 months, $P < 0.001$) (Figure 1a). Fifty-two patients (46.4%) presented metastases at two or more organs (multi-organ metastases), and they showed a significantly shorter OS compared with those with single-organ

metastases (14,6 vs 27 months, $P = 0.007$) (Figure 1b). Median OS for patients who did not present any independent prognostic factor was 27.0 months (score 0), compared with 16.5 months for patients with one (score 1), and 11.4 months for patients with both of them (score 2) (log-rank $P = 0.001$). Kaplan-Meier curves for three groups are shown in Figure 1c.

Twenty-one patients (18%) were candidates for surgical metastasectomy after first line chemotherapy. The rate was significantly higher in patients with single vs multi-organ metastases (29.3 vs 9.7%, $P=0.009$), lower in patients with PC vs those without PC (10.5 vs 22.61, $P=0.19$), and higher in patients without any of those factors, vs patients with one of them, and patients with both (30.1 vs 11.1 vs 7.1%, $P=0.038$). Median OS for patients treated with metastasectomy has not been reached after a median follow up of thirty-six months vs 20 months for rest of patients ($P<0.001$).

DISCUSSION

This retrospective study was designed to identify predictive factors of short-term survival in patients presenting de novo metastatic CRC with no indication for a curative treatment, but receiving optimal chemotherapy with fluoropyrimidine and oxaliplatin with or without bevacizumab. Our results indicate that presence of PC and multi-organ metastases are independent predictors for a worse OS.

Our study, as the studies published to date that explore predictive factors of survival, has a retrospective nature and provides conflicting results. Yun *et al.* published data from a retrospective study involving 503 patients with different stages of CRC that underwent surgery, 376 of whom treated with palliative intention. They found that potential predictors of survival for the palliative operation group were CEA level, tumour differentiation, resection of primary tumour and treatment with chemotherapy; but for 131 patients with asymptomatic incurable disease, only chemotherapy was related to OS [18]. This data can hardly be compared with our results, since they studied a more heterogeneous population, with patients operated with different intentions (curative and palliative). Moreover, not all of them were treated with chemotherapy; what resulted in the only independent factor related with survival in the stage IV incurable population.

More recently, Miyamoto *et al.* published data from 161 patients treated in a single institution with advanced CRC treated with first line systemic chemotherapy. They observed that median OS was higher for patients with single-organ metastases when compared with those with multi-organ metastases (two or more locations), while there was no significant difference between patients with metastases in two versus three or more organs. According to their multivariate analysis, left-sided location of the primary

tumour and R0 resection of metastatic lesions were independently associated with good prognosis. In this study patients could have received chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin with or without oxaliplatin or irinotecan, with or without bevacizumab or anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibodies, and 34% of them were suitable for metastasectomy after chemotherapy treatment. In their cohort of patients 18% of patients had peritoneal metastases (31% in the group of multi-organ metastases versus 6% in single-organ metastases subpopulation), but this factor was not related with OS in the univariate analysis and was not included in the multivariate analysis. It should be pointed out that 50% of patients did not receive targeted therapies combined with chemotherapy as first-line treatment, what is a lower rate than in our population (76%); and that they did not communicate data from others possible prognostic factors such as CEA serum levels or KRAS mutations that could also play a role in this setting. Again, all this heterogeneity in clinical and pathological characteristics makes very difficult the comparison of the results.

Our study is focused on a more homogeneous cohort of patients, all of them with inoperable metastatic disease at diagnoses, and all of them treated with optimal first line chemotherapy regimens; reported results should be therefore only considered for patients in this situation. Nevertheless, our analysis point out multi-organ metastatic affection as an independent prognostic factor for OS. The difference (14 vs 27 months) is smaller than the reported by Miyamoto *et al.* (19.2 vs 42 months), probably due to the fact that in their cohort of patients 55% with single organ metastases were candidates for R0 metastasectomy vs only 18% in our study. The importance of surgical resection of metastases in stage IV CRC has been widely studied, and nowadays it is considered the gold standard for patients who are candidates for a complete resection of all metastatic sites. Chua *et al.* reviewed the outcomes of 1142 patients with colorectal liver metastases after hepatectomy and extrahepatic disease resection [19, 20] and they found a median OS of 30 months, and median PFS of 12 months, with a 5-year survival rate of patients with R0 hepatectomy of 25%, confirming that this procedure, when feasible, offers the most definitive treatment and achieves the longest survival rates for patients with advanced CRC. All our patients were considered to have inoperable metastases at diagnoses, and proposed for first line palliative

systemic chemotherapy. The aim of our study was to evaluate possible factors to predict patients outcome in this setting, and we decided not to include in the analysis further interventions such as surgical metastasectomy or second line chemotherapy treatments that patients might received further in their evolution. It is important to point out that even in patients considered by their clinicians to be inoperable, a considerable percentage (18%) could benefit from a radical treatment after systemic chemotherapy, mostly patients without PC and with single-organ metastases, what has undoubtedly influenced in our results, since this factor appears to be the strongest predictor of survival for patients after treatment.

In the other hand, PC has historically been associated with worse outcomes in terms of OS, PFS and treatment efficacy [21]. In addition, these patients suffer more frequently tumor-related symptoms such as abdominal pain, bowel occlusion and nausea and vomiting [22]. Our results suggest that this is still true in the era of modern therapies, and that in spite of the new chemotherapy regimens and the addition of targeted therapies such as bevacizumab, this factor remains important and predicts worse outcome for patients with advanced CRC. During the last years an important amount of clinical evidence has appeared, showing the role of peritoneal cytoreductive surgery with hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion to improve survival of these patients [23,24]. Verwaal *et al.* [25] published data from a prospective randomized study where 105 patients were assigned to a systemic chemotherapy treatment with or without peritoneal cytoreduction surgery; they observed a significant difference in OS favouring the surgery arm (21.6 vs 12.6 months). Though it is true that this study was realized with suboptimal chemotherapy regimen, and before the incorporation of monoclonal antibodies targeting angiogenesis or the EGFR, we think that peritoneal cytoreductive surgery must be considered as an important option to improve outcomes in patients with PC, and must be integrated in the managing of the disease, as complementary procedure to systemic treatments.

In summary, these findings suggest that presence of PC and multi-organ metastases at the moment of advance inoperable CRC diagnosis, are independently related with worse OS, and they predict as well a lower probability of making the patient candidate for metastasectomy after systemic treatment. Further efforts should be made to study the associations

between prognostic factors and CRC biology behaviour.

FUNDING

Funding for this study was received from a Conselleria grant to support clinical Research, titled "Ayuda para proyectos de grupos emergentes en centros asistenciales para el fomento de la investigación sanitaria de la Comunidad Valenciana en 2011".

This work was partially funded by a grant from Ministry of Economy and Competitiveness (MTM2013-45381-P).

INFORMED CONSENT

An informed consent form was reviewed and signed by every patient in order to publish information from clinical history.

Research Involving Human Participants and/or Animals

The research was carried out according to the principles set out in the Declaration of Helsinki 1964 and all subsequent revisions, informed consent was obtained, and the ethic committee approved the study.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

All authors certify that there is not any conflict of interest to be disclosed.

ACKNOWLEDGEMENT

Conselleria de Sanitat Comunidad Valenciana provided funding for this research study.

This work was partially funded by a grant from Ministry of Economy and Competitiveness (MTM2013-45381-P).

REFERENCES

- [1] Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program [homepage on the Internet]. Available from www.seer.cancer.gov. Stat Database: Incidence-SEER 17. Nov 2006 Sub (1973-2004).
- [2] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC cancer staging manual* (7th ed). Eds. New York, NY: Springer 2010; p. 143.
- [3] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2012; 62(1): 10-29. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.20138>

- [4] Bleiberg H. Role of chemotherapy for advanced colorectal cancer. New oportunities. *Semin Oncol* 1996; 23(1 Suppl 3): 42-50.
- [5] De Gramont A, Vignoud J, Toumigand C, Louvet C, André T, Varette C, et al. Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hours continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(2): 214-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-8049\(96\)00370-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-8049(96)00370-X)
- [6] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(6): C1358-66.
- [7] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0803-669>
- [8] Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001; 7(9): 987-9. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0901-987>
- [9] Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E, Sarkar S. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(16): 3706-12. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.00.232>
- [10] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2335-42. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa032691>
- [11] Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007; 25(12): 1539-44. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2006.09.6305>
- [12] Saltz L, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26(12): 2013-9. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2007.14.9930>
- [13] Kuo LJ, Leu SY, Liu MC, Jian JJ, Hongjun Chen S, Chen CM. How aggressive should we be in patients with stage IV colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 2003; 46(12): 1646-1652. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02860770>
- [14] Shah SA, Haddad R, Al-Sukhni W, Kim RD, Greig PD, Grant DR, et al. Surgical resection of hepatic and pulmonary metastases from colorectal carcinoma. *J Am Coll Surg* 2006; 202(3): 468-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2005.11.008>
- [15] Leichman L. The role of chemotherapy in the curative treatment of patients with liver metastases from colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2007; 16: 537-556. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2007.04.003>
- [16] Shepherd NA, Baxter KJ, Love SB. The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: a prospective evaluation. *Gastroenterology* 1997; 112: 1098-1102. [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(97\)70119-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(97)70119-7)
- [17] Eker B, Ozaslan E, Karaca H, Berk V, Bozhurt O, Inanc M, et al. Factors affecting prognosis in metastatic colorectal cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 3015-21. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.7.3015>
- [18] Miyamoto Y, Hayashi N, Sakamoto Y, Ohuchi M, Tokunagam R, Kurashige J, et al. Predictors of long-term survival in patients with stage IV colorectal cancer with multi-organ metastases: a single center retrospective analysis. *Int J Clin Oncol* 2015; published online.
- [19] Yun HR, Lee WY, Lee WS, Cho YB, Yun SH, Chun HK. The prognostic factors of stage IV colorectal cancer and assessment of proper treatment according to the patient's status. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22(11): 1301-1310. <http://dx.doi.org/10.1007/s00384-007-0315-x>
- [20] Miyamoto Y, Hayashi N, Sakamoto Y, Oushi M, Tokunagam R, Kurashige J. Predictors of long-term survival in patients with stage IV colorectal cancer with multi-organ metastases: a single-center retrospective analysis. *Int J Clin Oncol* published online: 07 May 2015.
- [21] Chua TC, Saxena A, Liauw W, Chu F, Morris DL. Hepatectomy and resection of concomitant extrahepatic disease for colorectal liver metastases—a systematic review. *Eur J Cancer* 2012; 48(12): 1757-1765. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2011.10.034>
- [22] Chu DZ, Lang NP, Thompson C, Osteen PK, Westbrook KC. Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors. *Cancer* 1989; 63: 364-367. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142\(19890115\)63:2<364::AID-CNCR2820630228>3.0.CO;2-V](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142(19890115)63:2<364::AID-CNCR2820630228>3.0.CO;2-V)
- [23] Jimenez-Perez J, Caellas J, Garcia-Cano J, Vandervoort J, Garcia Escribano OR, Barcenilla J, et al. Colonic Stenting as a bridge to surgery in malignant large-bowel obstruction: a report from two large multinational registries. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 2174-2180. <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2011.360>
- [24] Haslinger M, Francescutti V, Attwood K, McCart JA, Fakih M, Kane JM 3rd, et al. A contemporary analysis of morbidity and outcomes in cytoreduction/hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion. *Cancer Medicine* 2013; 2: 334-342.
- [25] Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Sloothen GW, van Tinteren H, Boot H, et al. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3737-3743. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2003.04.187>

Received on 01-10-2015

Accepted on 27-10-2015

Published on 05-04-2016

<http://dx.doi.org/10.6000/1927-7229.2016.05.01.1>

© 2016 Garde-Noguera et al.; Licensee Lifescience Global.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

Role of Primary Tumour Resection and Addition of Bevacizumab to Chemotherapy in the Management of Advanced Colorectal Cancer with Inoperable Metastasis: A Retrospective Analysis

Javier Garde Noguera^{1,*}, Elena Evgenyeva², Mireia Gil Raga³, Asunción Juárez Marroquí⁴, Juan Manuel Gasent Blesa⁵, Juan Laforga², Laia Bernet⁶, Mónica Clemente Císcar⁷, Carlos Camps Herrero⁸ and Antonio Lombart Cussac¹

¹Servicio Oncología Médica, Hospital Arnau de Vilanova de Valencia, Spain

²Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Marinasalud de Denia, Spain

³Servicio Oncología Médica, Hospital de Sagunto, Spain

⁴Servicio Oncología Médica, Hospital de Elda, Spain

⁵Servicio Oncología Médica, Hospital Marinasalud de Denia Spain

⁶Servicio de Anatomía Patológica y Oncología Diagnóstica, Hospital Lluís Alcanyis, Xativa, Spain

⁷Centro de Gestión de la Calidad y el Cambio, Universitat Politècnica de Valencia, Spain

⁸Servicio de Oncología Médica, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Spain

Abstract: Purpose: To analyze the impact of primary tumour resection on treatment outcomes in patients with advanced colorectal cancer (CRC) and inoperable metastases at diagnosis in combination with optimal systemic therapy.

Methods: A retrospective study was carried out in four hospitals in Valencia (Spain) including all consecutive patients diagnosed between 1/2009 and 12/2010 of advanced CRC with inoperable metastasis and treated with a fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens with or without bevacizumab (B). Treatment outcomes were compared between patients undergoing or not primary tumour resection.

Results: A total of 112 patients met inclusion criteria: 62 patients underwent resection of the primary tumour (Group 1) and 50 were treated with exclusive chemotherapy (Group 2). Globally, patients in group 2 presented more unfavorable characteristics. Forty-five (72%) and 31 (62%) patients received chemotherapy with bevacizumab respectively. Response rate were 67% in Group 1 and 56% in Group 2. There were no statistically significant differences between the two groups in PFS (12 vs. 10 months; $p=0.11$) and OS (27 vs. 22 months; $p=0.1$). B regimens increased ORR (73% vs. 42%; $p=0.003$) and PFS (12 vs. 11 months; $p=0.019$) but not OS. Complications were higher in the group of patients without primary tumour resection, particularly when associated to B regimens.

Conclusions: Primary tumour resection offers no survival gain for patients with advanced CRC and inoperable metastases. Benefits of adding Bevacizumab to standard chemotherapy were similar in both groups, but it increases the risk of complications in non-resected patients.

Keywords: Primary Tumour Resection, Advanced Colorectal Cancer, Metastases, Survival, Bevacizumab.

INTRODUCTION

In Western countries, approximately 20% of patients with colorectal cancer (CRC) present advanced disease stage at diagnosis [1-3]. The standard approach for advanced CRC with inoperable metastasis has been systemic treatment with chemotherapy for over 40 years. Initially 5-fluorouracil (5-FU) which provided response rates of 10-20% as a single agent [4], followed by combinations with oxaliplatin that increased both response rates and overall survival (OS) [5], and finally with the addition of Bevacizumab (Avastin[®]) a humanized monoclonal

antibody that inhibits vascular endothelial growth factor, a key mediator of angiogenesis [6-8], that has shown in several randomized clinical trials benefit when it is used in combination with various standard chemotherapy regimens [9-12]. The combined use of XELOX-bevacizumab provides a median progression free survival (PFS) of 9.4 months and a median OS of 21.3 months [12], and this combination is currently the most commonly used first-line treatment regimens in patients with advanced CRC.

Despite new advances in chemotherapy, surgery remains an important treatment option for advanced CRC, especially since it offers a curative option for select groups: patients with metastatic disease confined to a single organ, patients with a local

*Address correspondence to this author at the Servicio Oncología Médica, Hospital Arnau de Vilanova de Valencia, Spain; Tel: 699307265; Fax: 963987700; E-mail: javiergardenoguera1@gmail.com

recurrence only or patients with limited intra-abdominal disease. In such cases, an aggressive and multimodal management integrating both surgical resection and systemic chemotherapy treatment allows achieving long-term surviving rates of 50% [13]. Furthermore, surgical resection is the palliative treatment of choice for patients with symptomatic primary tumours that result in bowel obstruction or severe gastrointestinal bleeding, even in patients who are not candidates for metastatic resection.

The most controversial indication for surgery arises in those cases in which the patient has unresectable metastatic disease and an asymptomatic primary tumour. In such cases, the risk-benefit ratio of the primary tumour resection must be evaluated carefully. The role of surgery in these cases is controversial, some authors have noted that the initial resection of the primary tumour may slow the progression of the disease and have a favourable impact on patients' survival [14-17], whereas other studies involving patients treated with modern chemotherapy combinations found no differences in OS rates between patients with primary tumour resection and without surgery [18-20]. There is concern about the increased risk of tumour complications in non operated patients such as bowel obstruction, perforation or haemorrhages, specially with addition of bevacizumab. Results of a phase II study conducted by the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP C-10) involving 86 patients with advanced CRC without primary tumour resection and treated with FOLFOX and bevacizumab [21], has shown a morbidity rate higher than 16% in this patients, with 12% of patients requiring surgery during the treatment (8 for bowel obstruction, 1 for perforation, and 1 for pain), and yielding a median survival time of 19.9 months.

The main objective of our study was to retrospectively analyze the impact of primary tumour resection on the overall survival of advanced CRC patients with inoperable metastases treated with fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens (with or without bevacizumab). As secondary objectives, we intended to analyze the safety of the chemotherapy schedules; the rate of major complications resulting from resection and the rate of complications related the primary tumour in those patients who were not operated.

MATERIALS AND METHODS

This was a multicenter and retrospective study of patients with advanced CRC at diagnosis and treated

with fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens (with or without bevacizumab), at four different hospitals in Valencia (Spain).

Patient Characteristics

The medical records of patients diagnosed with advanced CRC were reviewed. Patients presented pathology-confirmed colorectal adenocarcinoma and were treated between January 2009 and December 2012 with a first-line chemotherapy regimen involving FOLFOX or XELOX in combination (or not) with bevacizumab.

Treatment and Follow-Up

All enrolled patients were treated with fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens (with or without bevacizumab). A complete review of the medical history and baseline measures of the tumour before the treatment beginning were performed to evaluate the patients. The diagnosis and treatment evaluation was carried out with computed axial tomography. Analytical data was also collected before the treatment beginning, including hematologic cell counts, lactate dehydrogenase (LDH) and carcinoembryonic antigen (CEA) levels.

Treatment toxicity was assessed according to the criteria published by the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) version 2.0. Tumour response was evaluated according to RECIST criteria. OS was calculated as the time elapsed from diagnosis to the date of death, and PFS as the time elapsed from the start of treatment to the documented date of disease progression.

Major primary tumour complications were considered those requiring new surgical intervention, discontinuation of chemotherapy or those that resulted in the patient's death.

Statistical Methods

All statistical analyses were performed using the SPSS statistical package version 8.2. A descriptive statistics analysis, including measures of central tendencies and dispersions of quantitative variables, as well as absolute and relative frequencies for categorical variables, was also carried out. T-test was used to compare two independent samples of continuous variables. The chi-square test was used to compare two or more independent groups of subjects with respect to a given categorical variable. Survival curves

were estimated using the Kaplan-Meier method, and then compared using the log rank test.

RESULTS

Patient Characteristics

We found 112 patients with advanced CRC at diagnosis and treated with fluoropyrimidine and oxaliplatin combination chemotherapy regimens (XELOX or FOLFOX) with or without bevacizumab in our medical records. Sixty-two patients (55.3%) underwent resection of the primary tumour prior to chemotherapy treatment (Group 1). The remaining 50 (44.7%) patients did not undergo surgery and received only chemotherapy as first-line treatment of the advanced disease (Group 2).

Patient's characteristics are summarized in Table 1. The median age of the total population was 68 years (67.5 in Group 1 vs. 69.5 in Group 2). The rate of patients over 70 years in Groups 1 and 2 was 33% vs.

50%, respectively ($p=0.063$). Differences were also observed between groups with regard the proportion of women enrolled (33% vs. 55%, $p=0.025$), of patients with weight loss higher than 10% (3% vs. 34%, $p=0.019$) and of patients with high CEA levels at diagnosis (71% vs. 90%, $p=0.018$).

Treatment

In Group 1, 45 out of 62 patients (72.5%) received chemotherapy in combination with bevacizumab (14 with FOLFOX-B and 33 with XELOX-B), the remaining (17 patients) received chemotherapy without bevacizumab (3 with FOLFOX and 14 with XELOX). In Group 2, 31 (62%) patients received chemotherapy with bevacizumab (13 with XELOX-B and 18 with FOLFOX-B), and 19 patients (38%) received chemotherapy without bevacizumab (7 with FOLFOX and 12 with XELOX).

In the total population, 101 patients were evaluated for response: 58 in Group 1 and 43 in Group 2. The

Table 1: Demographic and Clinical Data at Baseline in the Study Population

	Primary tumour resection (n=62)	No primary tumour resection (n=50)	p value
Age (years), median	67.5	69.5	
Age >70 years	21/62 (33%)	25/50 (50%)	0.063
Gender, (Male vs Female)	31/62 (50%) vs 31/62 (50%)	35/50 (70%) vs 15/50 (30%)	0.025*
PS 0-1	52/61 (85.2%)	35/48 (72%)	0.089
HT at diagnosis	25/55 (45%)	18/43 (41%)	0.44
Weight loss >10%	7/51 (13%)	14/41 (34%)	0.019*
Rectal bleeding	17/51 (33%)	18/42 (42%)	0.23
Occlusive Symptoms	8/51 (15%)	2/41 (4.8%)	0.09
Metastatic Sites >1	37/62 (59.6%)	23/50 (46%)	0.1
High CEA levels	37/52 (71%)	38/42 (90%)	0.018*
Anaemia	23/44 (52%)	23/41 (56%)	0.44
High LDH levels	13/34 (38.2%)	19/31 (61%)	0.054
Chemotherapy with BEVACIZUMAB	44/62 (70.9%)	31/50 (62%)	0.21
KRAS mutation	24/36 (66%)	11/20 (55%)	0.3

Table 2: Treatment Response According to the Primary Tumor Resection and Bevacizumab Use

Response	Primary tumour resection (n=58)	No primary tumour resection (n= 43)	Chemotherapy + bevacizumab (n=66)	Chemotherapy - bevacizumab (n=35)
Complete Response	2 (3.4%)	1 (2.3%)	3 (4.5%)	0 (0%)
Partial Response	37 (63%)	23 (46%)	45 (68.1%)	15 (42.8%)
Stable Disease	13 (22.4%)	10 (23.2%)	13 (19.6%)	10 (28.5%)
Progressive Disease	6 (10%)	9 (20%)	5 (7.5%)	10 (28.5%)
p value	0.16		0.003	

response rate in Group 1 was 67.4% [2 Complete Response (CR), 37 Partial Response (PR), 13 Stable Disease (SD), 6 Progressive Disease (PD)], compared with 55.8% Group 2 (1 CR, 23 PR, 10 SD and 9 PD), the differences were not statistically significant ($p=0.16$) (Table 2).

Of the 101 patients who were evaluated for response, 66 received chemotherapy with bevacizumab and 35 received chemotherapy without bevacizumab. The response rate in the bevacizumab group was 72.7% (3 CR, 45 PR, 13 SD and 5 PD), compared to 42.8% in the group without bevacizumab (0 CR, 15 PR, 10 SD and 10 PD, $P=0.003$) (Table 2).

Overall Survival and Disease Progression-Free Survival

Median OS in Group 1 was 27 months, and 22 months in Group 2 ($p=0.1$). The PFS was also higher in Group 1, although the difference was not statistical

significant either (12 vs. 10 months, $p=0.11$) (Figure 1).

Median OS in patients treated with chemotherapy and bevacizumab was 27 months compared with 17 months in patients treated with chemotherapy without bevacizumab ($p=0.108$). PFS was significantly higher in patients treated with bevacizumab (12 vs. 11 months, $p=0.019$) (Figure 2).

In Group 1, patients treated with chemotherapy in combination with bevacizumab achieved a median OS of 27 months, compared with 15 months in patients treated with chemotherapy without bevacizumab. Similarly, in Group 2, patients treated with chemotherapy with bevacizumab achieved a higher median OS than patients treated with chemotherapy without bevacizumab, but differences were not statistically significant (27 vs. 20 months, $p=0.11$) (Figure 3).

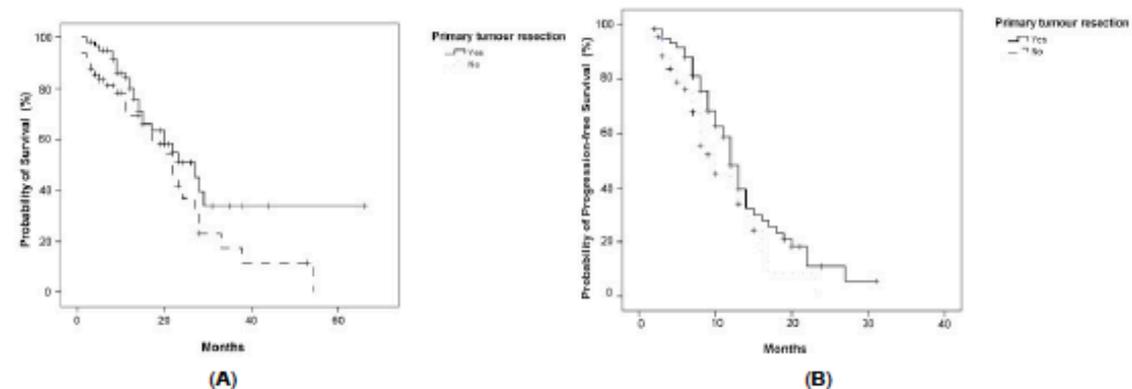


Figure 1: Overall survival (A) and progression-free survival (B) according to primary tumour resection.

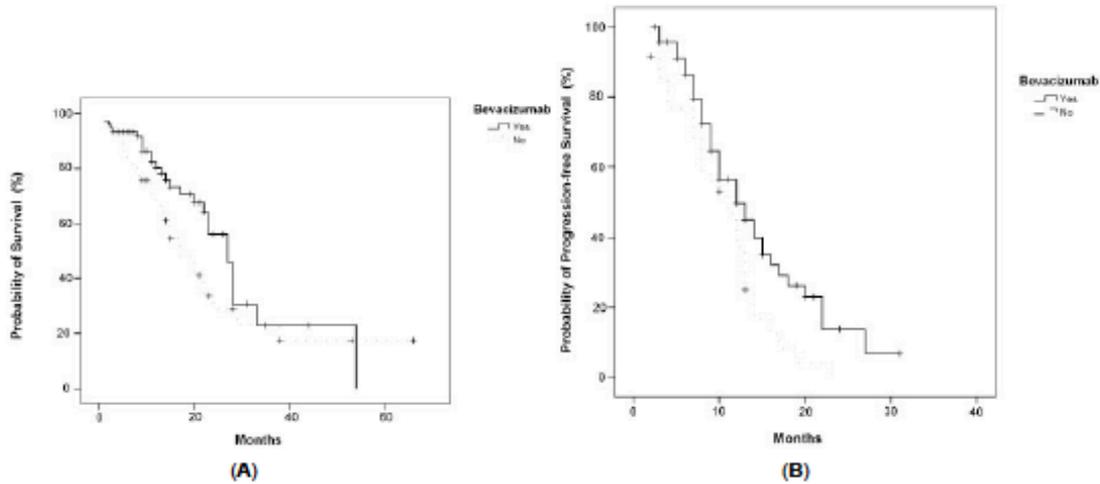


Figure 2: Overall survival (A) and progression-free survival (B) according to the use of bevacizumab.

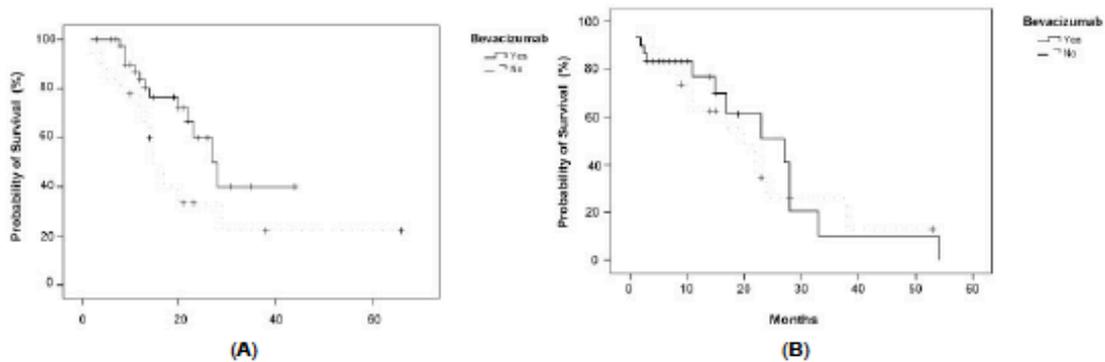


Figure 3: Overall Survival according to bevacizumab use in patients with primary tumour resection (A) and without primary tumour resection (B).

Complications Related to the Primary Tumour or Postoperative

Nine patients suffered major complications resulting from the primary tumour or after the surgery. Eight of these patients belonged to Group 2: 2 patients died from an abdominal perforation, 2 from a bowel obstruction, 4 experienced severe bleeding (resulting in death in 3 of the 4 patient). One patient in Group 1 died 8 weeks after the surgery due to an abdominal sepsis and after receiving the first cycle of chemotherapy. The major complication rate was 16% (8/50) in Group 2 vs. 1.6% (1/62) in Group 1 ($p=0.007$).

Of the 8 patients in Group 2 with a major complication resulting from the primary tumour, 6 were received bevacizumab. The rate of major complications

in Group 2 treated with bevacizumab was 19.3% (6/31), compared to 0% in Group 1 ($p=0.004$). No differences in the major complication rate was observed between patients of Group 1 and Group 2 who did not receive chemotherapy with bevacizumab: 5.5 vs. 10.5%, respectively ($p=0.521$).

Toxicity and Adverse Effects of Chemotherapy

Toxicity after chemotherapy is summarized in Table 3. In the total population, the rate of patients who required a delay in chemotherapy treatment was 38.4%, while the dose was reduced due to toxicity in 32% of patients. The most common toxicity was neuropathy, presented in 34.8% of patients (G3-4 8.9%), and followed by gastrointestinal toxicity presented in 26.3% of patients (3.6% G3-4). Two

Table 3: Toxicity After Chemotherapy

	Total		Primary tumour resection				Bevacizumab			
			Yes		NO		Yes		NO	
	G1-2	G3-4	G1-2	G3-4	G1-2	G3-4	G1-2	G3-4	G1-2	G3-4
Anaemia	9%	1%	7.8%	1.9%	10.5%	0%	12%	1.7%	9.6%	0%
Neutropenia	7.2%	5.4%	3.9%	3.9%	15.7%	10.5%*	8.6%	5.1%	9.6%	9.6%
Thrombocytopenia	3.6%	2.7%	1.9%	1.9%	7.8%	5.2%	1.7%	3.4%	9.6%	3.2%
Febrile neutropenia		1.8%		3.9%		0%		3.4%		0%
Neuropathy	25.9%	8.9%	40.3%	15.3%	20.5%	5.1% ^b	31.6%	13.3%	32.2%	6.4%
Gastrointestinal	22.7%	3.6%	29.4%	5.8%	28.9%	2.6%	34.4%	5.1%	19.3%	3.2%
Vomiting	6.3%	2.7%	11.7%	5.8%	5.4%	0%	12.2%	3.5%	0%	3.2%
Renal	1.8%	0%	3.9%	0%	0%	0%	0%	0%	6.4%	0%

Treatment toxicity assessed according to the criteria published by the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) version 2.0: Grade 0: none; Grade 1: mild; Grade 2: moderate; Grade 3: severe; Grade 4: life-threatening. *p=0.043, ^bp=0.003.

patients were hospitalized due to febrile neutropenia (1.8%). The frequency of other G3-4 toxicities was: neutropenia 5.4%, vomiting 2.7%, and thrombocytopenia 2.7%. Patients in Group 2 suffered a significantly higher incidence of G3-4 neutropenia compared with Group 1 (10.5 vs. 3.9%, $p=0.043$), whereas patients in Group 1 presented a higher rate of neuropathy G3-4 (15.3 vs. 5.1%, $p=0.003$). No significant difference in the incidence of toxicity was observed in patients with chemotherapy in combination with bevacizumab compared to patients with chemotherapy without bevacizumab.

Nine patients discontinued treatment with bevacizumab due to side effects related to the drug: 3 patients developed deep vein thrombosis in the lower limbs, 2 pulmonary embolisms, 2 uncontrollable hypertension with conventional antihypertensive drugs, 1 rectal bleeding and another had adverse reaction during drug infusion. The rate of complications requiring bevacizumab discontinuation was 12% (9/75).

DISCUSSION

This retrospective study was designed to assess the impact of primary tumour resection in survival and tumour related events among patients presenting the novo metastatic colorectal carcinoma (CRC) with no indication for a curative approach but receiving optimal palliative chemotherapy. Our study did not found significant differences in terms of response rate, PFS, or OS according to the resection of the primary tumour.

Our study, as the studies published to date that explore the benefit of primary tumour surgery, has a

retrospective nature and provides conflicting results. Cook *et al.* published data from a retrospective study involving over 26,000 advanced CRC patients treated between 1988 and 2000, 66% of them with primary tumour surgery. Patients who underwent surgery were younger (median, 67 vs. 70.3 years), with lower rate of peritoneal carcinomatosis and rectal carcinomas. Such patients had higher median OS and one-year survival rate (46 vs. 11%). However, no information is provided on the existing symptoms prior to surgery, or types of chemotherapy administered or number of metastatic sites involved [15]. Likewise, Karoui *et al.* published a multicentre study involving 208 asymptomatic patients with advanced CRC treated in France between 1998 and 2007. Eighty-five patients with surgery presented a median OS higher than the non-surgery group (31 vs. 22 months) [17]. More recently, Venderbosch *et al.* have reported the results of a retrospective analysis of 847 patients included in the phase III CAIRO and CAIRO2 studies with 547 patients with primary tumour resection. The authors found an increase in both PFS and OS in patients who underwent surgery [22]. Finally, in the 2012 meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Faron *et al.* presented data of 810 patients (478 with surgery and 332 without surgery), and the preliminary results were consistent with previous studies that observed higher survival rates in patients with surgery of the primary tumour [23].

As expected, patients undergoing tumour resection presented slightly better characteristics, with a lower median age, better performance status, less weight loss, lower proportion of patients with high CEA level, and higher exposition to bevacizumab. Our study, like

other retrospective series can not rule out this. A favourable trend was found in patients who underwent resection of the primary tumour in these three variables (rates of response 67.4 vs. 55.8%, PFS 12 vs. 10 months, and OS 27 vs. 22 months). These differences suggest the existence of different patient profiles that may influence the primary tumour surgery indication.

On the other hand, Poultsides *et al.* reported the results of a study involving 233 consecutive advanced CRC patients enrolled between 2000 and 2006 with combined chemotherapy regimen with 5-FU with either irinotecan or oxaliplatin in combination or not with bevacizumab, and without primary tumour resection. Only 7% of the patients needed emergency surgery for complications related to the primary tumour, another 4% required local intervention (radiation or a stent placement), while the remaining 89% did not need any type of intervention. The authors concluded that for advanced asymptomatic CRC patients the palliative surgery of the primary tumour could be avoided if patients are treated with modern combination chemotherapy regimens [24]. Similarly, McCachill *et al.* published the results of a prospective phase II clinical trial that investigated the combined use of FOLFLOX-bevacizumab in advanced CRC patients without surgery. They found that the 86 patients included in the trial had a median survival time of 19.9 months, with a rate of major complications related to the primary tumour requiring surgery of 14%, and with a mortality rate of 2.3% [21]. Finally, a Cochrane review of 7 recently published randomized studies including a total of 1086 patients, concluded that the primary tumour resection is not consistently associated with an improvement in OS nor significantly reduces the risk of complications such as bowel obstructions, intestinal perforations or gastrointestinal bleeding [25]. Since none of these studies assessed the potential effects of chemotherapy on disease evolution or controlled all of the possible likely confounding variables, we should wait for the results of future randomized clinical trials to obtain a better understanding of the real benefits that primary tumour resection offers to such patients.

As a secondary objective of our study, we found a 16% of complications resulting from the primary tumour. It is noteworthy that the incidence of complications among bevacizumab-treated patients was significantly higher in patients without surgery (19.3% vs 0%). The fact that among patients treated only with chemotherapy no differences were observed in the rate of complication between patients with and without surgery suggests that bevacizumab may be an

important risk factor for patients treated without primary tumour resection. The complication rate in our study is comparable to those previously published: Scheer *et al.* reported an intestinal occlusion rate of 13.9% and a bleeding rate of 3% in non-surgery patients [26]; Scoogins *et al.* reported a bowel obstruction rate of 9% [18]; Pultsides *et al.* found a 11% of cases with a type of obstruction or perforation requiring some type of local treatment [24]; and finally in the study by McCachill *et al.*, which included both patients with surgery and with chemotherapy regimen with bevacizumab, the rate of complications related to the primary tumour was very similar, 14% [21], although the mortality rate was 2.3%, much lower than in our study. Differences in the clinical characteristics of patients (younger, with better PS and lower rates of comorbidities) and the fact that patients were participating in a clinical trial that encouraged more aggressive salvage surgical interventions could explain the differences between the results. Moreover, the risk of post-operative complications associated with the set of antiangiogenics drugs such as bevacizumab is known and has been previously described in surgical interventions for CRCs [27].

Only one patient with primary tumour resection suffered a surgery major complication (onset of abdominal sepsis after the first cycle of chemotherapy) representing 1.6% of the patient population. These data are below of the previously published rates of morbidity and mortality, which ranged approximately 20-30% and 1-6%, respectively [14, 18 and 28]. However, it is difficult to assess the real rate of surgical morbidity and mortality in our study because our eligibility criteria focused our analysis strictly on patients who had received chemotherapy, and it is possible that other patients that initially underwent surgery might have had complications that would have barred them from receiving a chemotherapy regimen and, therefore, excluding them from our analysis.

Chemotherapy with bevacizumab was significantly associated with higher rates of response and PFS, and although differences in OS did not reach statistical significance we also observed a positive trend in favour of this combined treatment strategy. The benefit of adding bevacizumab was evident in both groups, which is consistent with previously published data [12, 21 and 24], and toxicity results in our study are also consistent with other studies. No significant differences were observed between groups or according to bevacizumab use.

CONCLUSIONS

In conclusion, data from our study suggest that the resection of the primary tumour offers no benefits for patients with advanced CRC and inoperable metastases. Moreover, we observed that the benefits associated with the addition of bevacizumab to chemotherapy with fluoropyrimidines and oxaliplatin were no different between patients with and without resection. In patients without resection, we detected a significantly increased risk of complications. Therefore, caution must be exercised in the use of these drugs and patients should be carefully evaluated prior to the administration of such treatment. All the data currently available come from retrospective studies with important selection criteria biases that hamper to determine the real impact of the primary tumour resection on the evolution of patients with advanced CRC and inoperable metastases. Thus, the results of ongoing randomized and prospective studies are needed to clarify this issue.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the helpful comments of Mr. Vicent Giner-Bosch (Centro de Gestión de la Calidad y el Cambio, Universitat Politècnica de València), who reviewed a preliminary version of this article.

CONFLICT OF INTEREST

Financial support for this research was provided by Roche. The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov) SEER*Stat Database: Incidence - SEER 17 Regs Limited-Use, Nov 2008 Sub (1973-2004 varying), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, released April 2007, based on the November 2006 submission. Accessed May 2013.
- [2] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, Eds. *AJCC cancer staging manual* (7th ed). New York, NY: Springer 2010; p. 143.
- [3] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2012; 62(1): 10-29. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.20138>
- [4] Bleiberg H. Role of chemotherapy for advanced colorectal cancer. New opportunities. *Semin Oncol* 1996; 23(1 Suppl 3): 42-50.
- [5] De Gramont A, Vignoud J, Toumigand C, Louvet C, André T, Varette C, et al. Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hours continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(2): 214-9.

- [6] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(6): C1358-66. [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-8049\(96\)00370-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-8049(96)00370-X)
- [7] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0603-669>
- [8] Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001; 7(9): 987-9. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0901-987>
- [9] Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E, Sarkar S. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(16): 3706-12. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.00.232>
- [10] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2335-42. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa032691>
- [11] Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007; 25(12): 1539-44. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2006.09.6305>
- [12] Saltz L, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26(12): 2013-9. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2007.14.9930>
- [13] Shah SA, Haddad R, Al-Sukhni W, Kim RD, Greig PD, Grant DR, et al. Surgical resection of hepatic and pulmonary metastases from colorectal carcinoma. *J Am Coll Surg* 2006; 202(3): 468-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2005.11.008>
- [14] Galizia G, Lieto E, Orditura M, Castellano P, Imperatore V, Pinto M, et al. First-line chemotherapy vs bowel tumor resection plus chemotherapy for patients with unresectable synchronous colorectal hepatic metastases. *Arch Surg* 2008; 143(4): 352-8. <http://dx.doi.org/10.1001/archsurg.143.4.352>
- [15] Cook AD, Single R, McCahill LE. Surgical resection of primary tumors in patients who present with stage IV colorectal cancer: an analysis of surveillance, epidemiology, and end results data, 1988 to 2000. *Ann Surg Oncol* 2005; 12(8): 637-45. <http://dx.doi.org/10.1245/ASO.2005.06.012>
- [16] Konyalian VR, Rosing DK, Haukoos JS, Dixon MR, Sinow R, Bhaheetharan S, et al. The role of primary tumour resection in patients with stage IV colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9(5): 430-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1318.2007.01161.x>
- [17] Karoui M, Roudot-Thoraval F, Mesli F, Mitry E, Aparicio T, Des Guetz G, et al. Primary colectomy in patients with stage IV colon cancer and unresectable distant metastases improves overall survival: results of a multicentric study. *Dis Colon Rectum* 2011; 54(8): 930-8. <http://dx.doi.org/10.1097/DCR.0b013e31821cced0>
- [18] Scoggins CR, Meszoely IM, Blanke CD, Beauchamp RD, Leach SD, et al. Nonoperative management of primary colorectal cancer in patients with stage IV disease. *Ann Surg Oncol* 1999; 6(7): 651-7. <http://dx.doi.org/10.1007/s10434-999-0651-x>
- [19] Stelzner S, Hellmich G, Koch R, Ludwig K. Factors predicting

- survival in stage IV colorectal carcinoma patients after palliative treatment: a multivariate analysis. *J Surg Oncol* 2005; 89(4): 211-7.
<http://dx.doi.org/10.1002/jso.20196>
- [20] Karoui M, Koubaa W, Delbaldo C, Charachon A, Laurent A, Piedbois P, et al. Chemotherapy has also an effect on primary tumor in colon carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(12): 3440-6.
<http://dx.doi.org/10.1245/s10434-008-0167-9>
- [21] McCahill L, Yothers GA, Sharif S, Petrelli NJ, Lai LL, Bechar N, et al. Primary mFOLFOX6 plus bevacizumab without resection of the primary tumor for patients presenting with surgically unresectable metastatic colon cancer and an intact asymptomatic colon cancer: definitive analysis of NSABP trial C-10. *J Clin Oncol* 2012; 30(26): 3223-8.
<http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2012.42.4044>
- [22] Venderbosch S, Wilt JH, Teerenstra S, Loosveld OJ, van Bochove A, Sinnige HA, et al. Prognostic value of resection of primary tumor in patients with stage IV colorectal cancer: retrospective analysis of two randomized Studies and a review of the literature. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(12): 3252-60.
<http://dx.doi.org/10.1245/s10434-011-1951-5>
- [23] Faron M, Bourredjem A, Pignon JP, Bouche O, Douillard JY, Adenis A, et al. Impact on survival of primary tumor resection in patients with colorectal cancer and unresectable metastasis: pooled analysis of individual patients' data from four randomized trials. *J Clin Oncol* 2012; 30(15suppl): Abstract 3507.
- [24] Poultsides GA, Servais EL, Saltz LB, Patil S, Kemeny NE, Guillem JG, et al. Outcome of primary tumor in patients with synchronous stage IV colorectal cancer receiving combination chemotherapy without surgery as initial treatment. *J Clin Oncol* 2009; 27(20): 3379-84.
<http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.20.9817>
- [25] Cirocchi R, Trastulli S, Abraha I, Vettoretto N, Boselli C, Montedori A, et al. Non-resection versus resection for an asymptomatic primary tumour in patients with unresectable stage IV colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 8: CD008997.
- [26] Scheer MG, Sloots CE, van der Wilt GJ, Ruers TJ. Management of patients with asymptomatic colorectal cancer and synchronous irresectable metastases. *Ann Oncol* 2008; 19(11): 1829-35.
<http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdn398>
- [27] Kozloff M, Yood MU, Berlin H, Flynn PJ, Kabbinnar FF, Purdie DM, et al. Clinical Outcomes associated with bevacizumab-containing treatment of metastatic colorectal cancer: The BRITe Observational Cohort Study. *Oncologist* 2009; 14(9): 862-70.
<http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0071>
- [28] Ruo L, Gougoutas C, Paty PB, Guillem JG, Cohen AM, Wong WD. Elective bowel resection for incurable stage IV colorectal cancer: prognostic variables for asymptomatic patients. *J Am Coll Surg* 2003; 198(5): 722-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1072-7515\(03\)00136-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1072-7515(03)00136-4)

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Hanahan D & Weinberg RA. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- ² Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 65(2),87–108.
- ³ Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90.
- ⁴ Ryerson AB, Eheman CR, Altekruse SF, Ward JW, Jemal A, Sherman RL, et al. (2016). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer*, 122(9), 1312–1337.
- ⁵ Siegel RL, Killer KD and Jemal A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *Ca Cancer J Clin*, 67:7-30
- ⁶ Center MM, Jemal A and Ward. (2009). International Trends in Colorectal Cancer Incidence Rates. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(6), 1688–1694.
- ⁷ Center MM, Jemal A, Smith RA and Ward E. (2009). Worldwide Variations in Colorectal Cancer. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*,59(6), 366–378.
- ⁸ Chan AT and Giovannucci EL. (2010). Primary Prevention of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*,138(6),2029–2043.
- ⁹ Lindberg LJ, Ladelund S, Frederiksen BL, Smith-Hansen L and Bernstein I. (2016). Outcome of 24 years national surveillance in different hereditary colorectal cancer subgroups leading to more individualized surveillance. *J Med Genet* 2016-104284 Published Online, 30 December 2016.
- ¹⁰ Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM et al. (1993). Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*, 104(5):1535.
- ¹¹ Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, Schootman M, Lian M, Park Y, et al. (2012). Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer. *Cancer*, 118(14), 3636–3644.
- ¹² Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, Schootman M, Zauber AG, Hollenbeck AR, et al. (2012). Contribution of Behavioral Risk Factors and Obesity to Socioeconomic Differences in Colorectal Cancer Incidence. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 104(18), 1353–1362.
- ¹³ Klabunde CN, Cronin KA, Breen N, Waldron WR, Ambs AH & Nadel MR. (2011). Trends in Colorectal Cancer Test Use among Vulnerable Populations in the United States. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 20(8), 1611–1621.
- ¹⁴ Atkin WS, Morson BC and Cuzick JC. (1992). Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Eng Journal Med*, 326(10):658-662.
- ¹⁵ Ekblom A, Helmick C, Zack M, and Adami HO. (1992). Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl Journal Med*, 323(18):1228-1233.
- ¹⁶ Nottage K, McFarlane J, Krasin MJ, Li C, Srivastava D, Robison LL, et al. (2012). Secondary Colorectal Carcinoma After Childhood Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30(20), 2552–2558.
- ¹⁷ Ahnen Dj, Wade SW, Jones WF, Sifri R, Mendoza Silveiras J, Guiffre S, et al. (2014). The Increasing Incidence of Young-Onset Colorectal Cancer: A Call to Action. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(2), 216–224.

-
- ¹⁸ Surveillance, Epidemiology, and End Results Program of The National Cancer Institute. [http://www.cancervic.org.au/downloads/cec/cancer-in-vic/CCV-Statistics trends.pdf](http://www.cancervic.org.au/downloads/cec/cancer-in-vic/CCV-Statistics_trends.pdf)
- ¹⁹ Singh KE, Taylor TH, Pan C-JG, Stamos MJ, and Zell JA. (2014). Colorectal Cancer Incidence Among Young Adults in California. *Journal of Adolescent and Young Adult Oncology*, 3(4), 176–184.
- ²⁰ Dozois EJ, Boardman LA, Suwanthanma W, Limburg PJ, Cima RR, Bakken JL, et al. (2008). Young-Onset Colorectal Cancer in Patients With No Known Genetic Predisposition. *Medicine*, 87(5), 259–263.
- ²¹ Chang DT, Pai RK, Rybicki LA, Dimaio MA, Limaye M, Jayachandran P, et al. (2012). 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. *Modern Pathology*, 25(8), 1128–1139.
- ²² Wender R, Brooks D, Smith R, et al. Colon Cancer Rising Among Young Adults. American Cancer Society. www.cancer.org/cancer/news/news/colon-cancer-cases-rising-among-young-adults (Accessed on March 19, 2016).
- ²³ Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, et al. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(12), 906–916.
- ²⁴ Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Masonneuve P. (2008). Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*, 300(23):2765-2778.
- ²⁵ Mizoue, T., Inoue, M., Wakai, K., Nagata, C., Shimazu, T., Tsuji, I., et al. (2008). Alcohol Drinking and Colorectal Cancer in Japanese: A Pooled Analysis of Results from Five Cohort Studies. *American Journal of Epidemiology*, 167(12), 1397–1406.
- ²⁶ Jänne PA and Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. (2000). *N Engl J Med*, 342(26):1960.
- ²⁷ Griffin MR, Bergstralh EJ, Coffey RJ, Beart RW, and Melton LJ 3rd. (1987). Predictors of Survival After Curative Resection of Carcinoma of the Colon and Rectum. *Cancer*, 60(9), 2318-2324
- ²⁸ Weiss, J. M., Pfau, P. R., O'Connor, E. S., King, J., LoConte, N., Kennedy, G., & Smith, M. A. (2011). Mortality by Stage for Right- Versus Left-Sided Colon Cancer: Analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare Data. *Journal of Clinical Oncology*, 29(33), 4401–4409.
- ²⁹ Price, T. J., Beeke, C., Ullah, S., Padbury, R., Maddern, G., Roder, D., et al. (2014). Does the primary site of colorectal cancer impact outcomes for patients with metastatic disease? *Cancer*, 121(6), 830–835.
- ³⁰ Fante R, Roncucci L, Di Gregorio C, Tamassia MG, Losi L, Benatti P, et al. (1996). Frequency and Clinical Features of multiple tumors of large bowel in general population and in patients with hereditary colorectal carcinoma. *Cancer*, 77, 2013-2021
- ³¹ Knox Rd, Luey N, Sioson L, Kedziora A, Clarkson A, Watson N, et al. (2015). Medullary colorectal carcinoma revisited: a clinical and pathological study of 102 cases. *Ann Surg Oncol*, 22(9):2988-96.
- ³² Lee DW, Han SW, Lee HJ, Rhee YY, Bae JM, Cho NY, et al. (2013). Prognostic implication of mucinous histology in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *British Journal of Cancer*, 108(10), 1978–1984.
- ³³ Nissan A, Paty PB, Guillem JG & Cohen AM. (1998). Signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: A matched control study. *Gastroenterology*, 114, A1414.
- ³⁴ Masoomi H, Ziogas A, Lin BS, Barleben A, Mills S, Stamos MJ, & Zell JA. (2012). Population-Based Evaluation of Adenosquamous Carcinoma of the Colon and Rectum. *Diseases of the Colon & Rectum*, 55(5), 509–514.
- ³⁵ Winn B, Tavares R, Fanion J, Noble L, Gao J, Sabo E, et al. (2009). Differentiating the undifferentiated: immunohistochemical profile of medullary carcinoma of the colon with an emphasis on intestinal differentiation. *Human Pathology*, 40(3), 398–404.

-
- ³⁶ Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, Keith M, Laufer J, Kasper M, Koch PJ, Franke WW. (1993). The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation*, 53(2), 75-93
- ³⁷ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. (2010). *AJCC cancer staging manual* (7th ed). New York, NY: Springer.
- ³⁸ Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, Yothers G, Deutsch M, Allegra CJ, et al. (2009). Preoperative Multimodality Therapy Improves Disease-Free Survival in Patients With Carcinoma of the Rectum: NSABP R-03. *Journal of Clinical Oncology*, 27(31), 5124–5130.
- ³⁹ Cukier M, Smith AJ, Milot L, Chu W, Chung H, Fenech D, et al. (2012). Neoadjuvant chemoradiotherapy and multivisceral resection for primary locally advanced adherent colon cancer: a single institution experience. *Eur J Surg Oncol*, 38(8), 677.
- ⁴⁰ Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS and Kerr DJ. (2007). Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomized study. *Lancet*, 370(9604), 2020
- ⁴¹ Leichman L. (2007). The role of chemotherapy in the curative treatment of patients with liver metastases from colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 16, 537-556.
- ⁴² Bleiberg H. Role of chemotherapy for advanced colorectal cancer. New opportunities. (1996). *Semin Oncol*, 23, 42-50
- ⁴³ De Gramont A, Vignoud J, Tournigand C, Louvet C, Andre T, Varette C, et al. (1997). Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hours continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 33, 214-219
- ⁴⁴ Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*, 25, 1539–1544
- ⁴⁵ Saltz L, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. (2008). Bevacizumab in combination with oxaliplatinbased chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*, 26(12), 2013-9.
- ⁴⁶ Ferrara N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C1358–C1366.
- ⁴⁷ Shepherd Na, Baxter KJ and Love SB. (1997). The Prognostic Importance of Peritoneal Involvement in Colonic Cancer: A Prospective Evaluation. *Gastroenterology*, 112, 1096-102
- ⁴⁸ Yun HR, Lee WY, Lee OS, Cho YB, Yun SH, and Chun HK. (2007). The prognostic factors of stage IV colorectal cancer and assessment of proper treatment according to the patient's status. *International Journal of Colorectal Disease*, 22(11), 1301–1310.
- ⁴⁹ Miyamoto Y, Hayashi N, Sakamoto Y, Ohuchi M, Tokunagam R, Kurashige J, et al. (2015). Predictors of long-term survival in patients with stage IV colorectal cancer with multi-organ metastases: a single-center retrospective analysis. *International Journal of Clinical Oncology*, 20, 1140-6
- ⁵⁰ Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- ⁵¹ Hayflick L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*, 62, 1180-1190
- ⁵² Shay JW and Bacchetti S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, 33, 787-791.
- ⁵³ Folkman J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*, 3, 643-651.
- ⁵⁴ Warburg O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 269-270

-
- ⁵⁵ Sanchez-Cespedes M. (2003). Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer*, 40, 111-121.
- ⁵⁶ Sekido Y, Fong, K.M., and Minna, J.D. (2005). Cancer of the Lung. In: *Cancer. Principles & Practice of Oncology*, ed. V.T. De Vita, S. Hellman, and S.A. Rosenberg. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 745-841.
- ⁵⁷ Tortola S, Marcuello E, González I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, et al. (1999). P53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 17(5), 1375.
- ⁵⁸ Bourne HR, Sanders DA and McCormick F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305), 117.
- ⁵⁹ Moon BS, Jeong WJ, Park J, Kim TI, Min do S and Choi KY. (2014). Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ β -catenin signaling. *J Natl Cancer Inst*, 106, 373
- ⁶⁰ Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319(9), 525
- ⁶¹ Miranda E, Destro A, Malesci A, Balladore E, Bianchi P, Baryshnikova E, et al. (2006). Genetic and epigenetic changes in primary metastatic and nonmetastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*, 95(8), 1101
- ⁶² Kuerbitz SJ, Plunkett BS and Walsh WV. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci*, 89, 7491-7495
- ⁶³ Russo A. (2005). The TP53 Colorectal Cancer International Collaborative Study on the Prognostic and Predictive Significance of p53 Mutation: Influence of Tumor Site, Type of Mutation, and Adjuvant Treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 23(30), 7518-7528.
- ⁶⁴ Garde-Noguera J and Gil-Raga M. (2016). Advanced Colorectal Cancer: Clinico-Pathological and molecular factors with prognostic importance, and potential predictive markers of response to modern systemic treatments. *J Anal Oncol*, 5, 1-3.
- ⁶⁵ Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 1626-34.
- ⁶⁶ Irahara N, Baba Y, Nosho K, Shima K, Yan I, Dias-Santagata, et al. (2010). NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagn Mol Pathol*, 19, 157-163.
- ⁶⁷ De Roock W, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, Kalogeras KT, et al. (2010). Effects of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3Ca mutations on the efficacy of Cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*, 11, 753-62.
- ⁶⁸ Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. (2010). Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*, 28, 466-74.
- ⁶⁹ Pai RK, Jayachandran P, Koong AC, Chang DT, Kwok S, Ma L, et al. (2012). BRAF-mutated, microsatellite-stable adenocarcinoma of the proximal colon: an aggressive adenocarcinoma with poor survival, mucinous differentiation, and adverse morphologic features. *Am J Surg Pathol*, 36, 744-52.
- ⁷⁰ Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kinai A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, et al. (2014). FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 15, 1065-1075.
- ⁷¹ Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, Wollner I, Taube JM, Anders RA, et al. (2013). Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res*, 19, 462-468.

-
- ⁷² Siena S, Sartore-Bianchi A, Lonardi S, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, et al. (2015). Trastuzumab and lapatinib in Her-2 amplified metastatic colorectal patients (mCRC): The HERACLES trial. *J Clin Oncol*, 33: (suppl;abstr 3508). (HERACLES Trial EudraCT 2012002128-33)
- ⁷³ Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, AT Le, Haney J, Schulte N, et al. (2014). ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. *Mol Cancer Res*, 12, 111-118.
- ⁷⁴ Zeng ZS, Weiser MR, Kuntz E, Chen CT, Sajid KA, Nash GM, et al. (2008). C-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Lett*, 265, 258-269.
- ⁷⁵ Gerber HP and Ferrara N. (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*, 65, 671-80.
- ⁷⁶ Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR and Ellis LM. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*, 55, 3964-8
- ⁷⁷ Takahashi T and Shibuya M. (1997). The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*, 14, 2079-89.
- ⁷⁸ Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, and Alitalo K. (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*, 60, 203-212.
- ⁷⁹ The Cancer Genome Atlas Network. (2012). *Nature*, 487, 330-337.
- ⁸⁰ De Sousa EM, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LP, et al. (2013). Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med*, 19, 614-618
- ⁸¹ Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collison EA, Gibb WJ, Wullschlegel S, et al. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nature Medicine*, 19, 619-625.
- ⁸² Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*, 21, 1350-1356.
- ⁸³ Zetter BR. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med*, 49, 407-424.
- ⁸⁴ Ahn GO and Brown JM. (2009). Role of endothelial progenitors and other bone marrow-derived cells in the development of the tumor vasculature. *Angiogenesis*, 12, 159-164.
- ⁸⁵ Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, and Heissig B. (2002). Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?. *Nat Rev Cancer*, 2, 826-835.
- ⁸⁶ Martinez-Ezquerro JD and Herrera LA. (2006). Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología*, 1, 83-96.
- ⁸⁷ Roskoski R Jr. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol*, 62, 179-213.
- ⁸⁸ Folkman J. (1997). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285, 1182-1186.
- ⁸⁹ Gupta MK and Qin RY. (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol*, 9, 1144-1155.
- ⁹⁰ Bergers G and Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3, 401-410.
- ⁹¹ Weis SM and Cheresh DA. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*, 17, 1359-1370.
- ⁹² Carmeliet P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438, 932-936.

-
- ⁹³ Cao Y. (2009). Linfangiogenesis y Metástasis Linfática. In: *Angiogenesis y Cáncer*, ed. 2009. E Alba and A Rodríguez-Quesada. Barcelona: TACTICS MD, 71-94.
- ⁹⁴ Werynska B, Dziegiel P, and Jankowska R. (2009). Role of lymphangiogenesis in lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol*, 47, 333-342.
- ⁹⁵ Tobler NE and Detmar M. (2006). Tumor and lymph node lymphangiogenesis impact on cancer metastasis. *J Leukoc Biol*, 80, 691-696
- ⁹⁶ Bikfalvi A (2007). Angiogenesis: molecular mechanisms of activation, promotion and maintenance. *J BUO*, 12: Suppl 1, S59-S66.
- ⁹⁷ Nagahashi M, Ramachandran S, Rashid OM, and Takabe K. (2010). Lymphangiogenesis: a new player in cancer progression. *World J Gastroenterol*, 16, 4003-4012.
- ⁹⁸ Wissmann C and Detmar M. (2006). Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res*, 12, 6865-6868.
- ⁹⁹ Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, et al. (2005). Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol*, 18, 1232-1242.
- ¹⁰⁰ Shi YH and Fang WG. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World J Gastroenterol*, 10, 1082-1087.
- ¹⁰¹ Semenza GL. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3, 721-732.
- ¹⁰² Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL and Sivridis E. (2006). Comparison of Metabolic Pathways between Cancer Cells and Stromal Cells in Colorectal Carcinomas: a Metabolic Survival Role for Tumor-Associated Stroma. *Cancer Research*, 66, 632-637.
- ¹⁰³ Shibuya M. (2001). Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*, 26, 25-35.
- ¹⁰⁴ Dvorak HF. (2005). Angiogenesis: update. *J Thromb Haemost*, 3, 1835-1842.
- ¹⁰⁵ Kou B, Li Y, Zhang L, Zhu G, Wang X, Li Y, et al. (2004). In vivo inhibition of tumor angiogenesis by a soluble VEGFR-2 fragment. *Exp Mol Pathol*, 76, 129-137.
- ¹⁰⁶ Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219, 983-985.
- ¹⁰⁷ Ferrara N and Henzel WJ. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161, 851-858.
- ¹⁰⁸ Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, et al. (1989). Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem*, 264, 20017-20024.
- ¹⁰⁹ Kerbel RS. (2008). Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*, 358, 2039-2049.
- ¹¹⁰ Ferrara N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25, 581-611.
- ¹¹¹ Otróck ZK, Makarem JA, and Shamseddine AI. (2007). Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis*, 38, 258-268.
- ¹¹² Ferrara N, Gerber HP, and LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669-676.
- ¹¹³ Nash AD, Baca M, Wright C, and Scotney PD. (2006). The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther*, 19, 61-69.
- ¹¹⁴ Roy H, Bhardwaj S and Yla-Herttuala S. (2006). Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett*, 580, 2879-2887.
- ¹¹⁵ Ribatti D. (2008). The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis*, 11, 215-221.

-
- ¹¹⁶ Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, et al. (2004). A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res*, 2, 315-326.
- ¹¹⁷ Saijo N. (2012). Critical comments for roles of biomarkers in the diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Treat Rev*, 38, 63-67.
- ¹¹⁸ Coate LE, John T, Tsao MS, and Shepherd FA. (2009). Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*, 10, 1001-1010
- ¹¹⁹ Pohl M, Werner N, Munding J, Tannapfel A, Graeven U, Nickenig G, et al. (2011). Biomarkers of anti-angiogenic therapy in metastatic colorectal cancer (mCRC): original data and review of the literature. *Z Gastroenterol*, 49(10), 1398-1406.
- ¹²⁰ Kara O, Duman BB, Kara B, Erdogan S, Parsak CK and Sakman G. (2012). Analysis of PTEN, VEGF, HER2 and P53 status in determining colorectal cancer benefit from bevacizumab therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 13(12), 6397.
- ¹²¹ Tsai HL, Lin CH, Huang CW, Yang IP, Yeh YS, Hsu WH, et al. (2015). Decreased peritherapeutic VEGF expression could be a predictor of responsiveness to first-line FOLFIRI plus bevacizumab in mCRC patients. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(2), 1900-1910.
- ¹²² Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W, Holmgren EB, Tobin P, Guerrero AS, et al. (2006). Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 24(2), 217-227.
- ¹²³ Giatromanolaki, A., Koukourakis, M. I., Sivridis, E., Chlouverakis, G., Vourvouhaki, E., Turley, H., et al. (2007). Activated Vegfr2/kdr Pathway In Tumour Cells And Tumour Associated Vessels Of Colorectal Cancer. *European Journal of Clinical Investigation*, 37(11), 878-886.
- ¹²⁴ Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, and Ellis LM. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Research*, 55, 3964-3968.
- ¹²⁵ Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, and Harris AL. (2006). Lactate Dehydrogenase 5 Expression in Operable Colorectal Cancer: Strong Association With Survival and Activated Vascular Endothelial Growth Factor Pathway-A Report of the Tumour Angiogenesis Research Group. *Journal of Clinical Oncology*, 24(26), 4301-4308.
- ¹²⁶ Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Kidilis V, Gatter KC, Harris AL. (2003). Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *British Journal of Cancer*, 89, 877-885.
- ¹²⁷ Kolev Y, Uetake H, Takagi Y, and Sugihara K. (2008). Lactate Dehydrogenase-5 (LDH-5) Expression in Human Gastric Cancer: Association with Hypoxia-Inducible Factor (HIF-1 α) Pathway, Angiogenic Factors Production and Poor Prognosis. *Annals of Surgical Oncology*, 15(8), 2336-2344.
- ¹²⁸ Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Turley H, Harris AL, and Koukourakis MI. (2006). Lactate dehydrogenase 5 (LDH-5) expression in endometrial cancer relates to the activated VEGF/VEGFR2(KDR) pathway and prognosis. *Gynecologic Oncology*, 103(3), 912-918.
- ¹²⁹ Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Trarbach T, Folprecht G, et al. (2011). Prognostic and Predictive Role of Lactate Dehydrogenase 5 Expression in Colorectal Cancer Patients Treated with PTK787/ZK 222584 (Vatalanib) Antiangiogenic Therapy. *Clinical Cancer Research*, 17(14), 4892-4900.
- ¹³⁰ Carrillo-de Santa Pau E, Carrillo Arias F, Caso Pelaez E, Muguruza Trueba, Sanchez Hernandez I, Muñoz Molina GM, et al. (2010). Vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels are associated with survival in early stages of lung cancer patients. *Cancer Invest*, 28(4), 393-398

-
- ¹³¹ Lim SH, Becker TM, Chua W, Caixeiro NJ, Ng WL, Kienzle N, et al. (2014). Circulating tumour cells and circulating free nucleic acid as prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Lett*, 346(1), 24–33.
- ¹³² Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(45), 16368–16373.
- ¹³³ Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. (2008). Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 26(19), 3213–3221.
- ¹³⁴ Shivapurkar N, Mikhail S, Navarro R, Bai W, Marshall J, Hwang J, et al. (2013). Decrease in blood miR-296 predicts chemotherapy resistance and poor clinical outcome in patients receiving systemic chemotherapy for metastatic colon cancer. *Int J Colorectal Dis*. 28(6), 887.
- ¹³⁵ Stiegelbauer V, Perakis S, Deutsch A, Ling H, Gerger A and Pichler M. (2014) MicroRNAs as novel predictive biomarkers and therapeutic targets in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 20(33), 11727–11735
- ¹³⁶ Trotti A, Colevas D, Setser A, Rusch V, Jaques D, Budach V, et al. (2003). CTCAE v3.0: Development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Seminars in Radiation Oncology*, 13, 176-181.
- ¹³⁷ Eisehauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. (2009). New response evaluation criteria in solid tumors: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 45, 228–47.
- ¹³⁸ Stewart M, Turley H, Cook N, Pezzella F, Pillai G, Ogilvie D, et al. (2003). The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumours and relocates intracellularly on phosphorylation: an immunohistochemical study. *Histopathology*, 43, 33–9.
- ¹³⁹ Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C, Polycronidis A, and Sivridis E. (2005). Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clinical and Experimental Metastasis*, 22, 25-30.
- ¹⁴⁰ Zhang SD, McCrudden CM, Lin Y, Kwok HF. (2015). The significance of combining VEGFA, FLTI and KDR expressions in colon cancer patient prognosis and predicting response to bevacizumab. *Oncotargets Ther*, 8, 835–843.
- ¹⁴¹ Takahashi T and Shibuya M. (1997). The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*, 14, 2079–89.
- ¹⁴² Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N and Williams LT. (1993). Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 7533–7.
- ¹⁴³ Calvani M, Trisciuglio D, Bergamaschi C, Shoemaker RH and Melillo G. (2008). Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells. *Cancer Res*, 68, 285-91.
- ¹⁴⁴ Yang SX, Steinberg SM, Nguyen D and Swain SM. (2011). p53, HER2 and tumor cell apoptosis correlate with clinical outcome after neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy in breast cancer. *Int J Oncol*, 38, 1445–52.
- ¹⁴⁵ Said R, Hong DS, Warneke CL, Lee JJ, Wheler JJ, Janku F, et al. (2013). P53 mutations in advanced cancers: clinical characteristics, outcomes, and correlation between progression-free survival and bevacizumab containing therapy. *Oncotarget*, 4, 705–14.
- ¹⁴⁶ Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis, Gatter KC, et al. (2003). Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *British Journal of Cancer*, 89, 877-885.

-
- ¹⁴⁷ Scartozzi M, Giampieri R, Maccaroni E, Del Prete M, Faloppi L, Bianconi M, et al. (2012). Pre-treatment lactate dehydrogenase levels as predictor of efficacy of first-line bevacizumab-based therapy in metastatic colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, 106, 799-804.
- ¹⁴⁸ Garde-Noguera J, Gil-Raga M, Evgenyeva E, Garcia JA, Llombart-Cussac A, Camps-Herrero C. (2016). High pKDR immunohistochemical expression is an unfavourable prognostic biomarker in patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy plus bevacizumab. *Clin Trans Oncol*, 18, 405-12.
- ¹⁴⁹ Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*, 359, 1757-1765.
- ¹⁵⁰ Doudillard JY, Kelly SO, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al (2013). Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*, 369:1023-34.
- ¹⁵¹ Gonzalez-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, and Fernandez-Peralta AM (2004). Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol*, 27, 39-45.
- ¹⁵² Seung TK, Park Kh, Kim JS, Shin SW, and Kim YH. (2013). Impact of KRAS mutation status on outcome in metastatic colon cancer patients without anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Cancer Res Treat*, 45, 55-62.
- ¹⁵³ Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR and Clarke PA. (1998). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst*, 90, 675-84
- ¹⁵⁴ Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. (2001). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer*, 85, 692-6.
- ¹⁵⁵ Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004, 350, 2335-2342.
- ¹⁵⁶ Price TJ, Hardingham JE, Lee CK, Weickhardt A, Townsend AR, Wrin JW, et al. (2011). Impact of KRAS and BRAF gene mutation status on outcomes from the Phase III AGITG MAX Trial of capecitabine alone or in combination with bevacizumab and mitomycin in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 29, 2675-82.
- ¹⁵⁷ Cook AD, Single R, and McCahill LE. (2005). Surgical resection of primary tumors in patients who present with stage IV colorectal cancer: an analysis of surveillance, epidemiology, and end results data, 1988 to 2000. *Ann Surg Oncol*, 12(8), 637-45.
- ¹⁵⁸ Karoui M, Roudot-Thoraval F, Mesli F, Mitry E, Aparicio T, Des Guetz G, et al. (2011). Primary colectomy in patients with stage IV colon cancer and unresectable distant metastases improves overall survival: results of a multicentric study. *Dis Colon Rectum*, 54(8), 930-938.
- ¹⁵⁹ Venderbosch S, Wilt JH, Teerenstra S, Loosveld OJ, van Bochove A, Sinnige HA, et al. (2011). Prognostic value of resection of primary tumor in patients with stage IV colorectal cancer: retrospective analysis of two randomized studies and a review of the literature. *Ann Surg Oncol*, 18(12), 3252-60.
- ¹⁶⁰ Faron M, Bourredjem A, Pignon JP, Bouche O, Douillard JY, Adenis A, et al. (2012). Impact on survival of primary tumor resection in patients with colorectal cancer and unresectable metastasis: pooled analysis of individual patients' data from four randomized trials. *J Clin Oncol*, 30(15suppl), Abstract 3507
- ¹⁶¹ Poultsides GA, Servais EL, Saltz LB, Patil S, Kemeny NE, Guillem JG, et al. (2009). Outcome of primary tumor in patients with synchronous stage IV colorectal cancer receiving combination chemotherapy without surgery as initial treatment. *J Clin Oncol*, 27(20), 3379-84.
- ¹⁶² McCahill L, Yothers GA, Sharif S, Petrelli NJ, Lai LL, Bechar N, et al. (2012). Primary mFOLFOX6 plus bevacizumab without resection of the primary tumor for patients presenting with surgically unresectable metastatic colon cancer and an intact asymptomatic colon cancer: definitive analysis of NSABP trial C-10. *J Clin Oncol*, 30(26), 3223-8.

-
- ¹⁶³ Cirocchi R, Trastulli S, Abraha I, Vettoretto N, Boselli C, Montedori A, et al. (2012). Non-resection versus resection for an asymptomatic primary tumour in patients with unresectable stage IV colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 8, CD008997.
- ¹⁶⁴ Scheer MG, Sloots CE, van der Wilt GJ, and Ruers TJ. (2008). Management of patients with asymptomatic colorectal cancer and synchronous irresectable metastases. *Ann Oncol*, 19(11), 1829-35.
- ¹⁶⁵ Scoggins CR, Meszoely IM, Blanke CD, Beauchamp RD, and Leach SD, et al. (1999). Nonoperative management of primary colorectal cancer in patients with stage IV disease. *Ann Surg Oncol*, 6(7), 651-657.
- ¹⁶⁶ Kozloff M, Yood MU, Berlin H, Flynn PJ, Kabbinavar FF, Purdie DM, et al. (2009). Clinical Outcomes associated with bevacizumab-containing treatment of metastatic colorectal cancer: The BRITe Observational Cohort Study. *Oncologist*, 14(9), 862-70.
- ¹⁶⁷ Chua TC, Saxena A, Liauw W, Chu F, and Morris DL. (2012). Hepatectomy and resection of concomitant extrahepatic disease for colorectal liver metastases—a systematic review. *Eur J Cancer*, 48(12), 1757-1765.
- ¹⁶⁸ Chu DZ, Lang NP, Thompson C, Osteen PK, and Westbrook KC. (1989). Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors. *Cancer*, 63, 364-367.
- ¹⁶⁹ Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Sloothen GW, van Tinteren H, Boot H, et al. (2003). Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 21, 3737-3743.