



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

**BIOMARCADORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y
MOLECULARES EN CÁNCER DE COLON EN
ESTADIOS INICIALES: ANÁLISIS EN BIOPSIAS
LÍQUIDAS Y EN TEJIDO TUMORAL.
IMPLICACIONES PRONÓSTICAS.**

TESIS DOCTORAL presentada por:
Mireia Gil Raga. Licenciada en Medicina y Cirugía.

Dirigida por:

Dr. Carlos Camps Herrero
Dra. Eloisa Jantus Lewintre

Valencia, 2017



CARLOS CAMPS HERRERO
Profesor titular
Departamento de Medicina
Universitat de València

INFORMA:

Que Dña. Mireia Gil Raga, licenciada en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **“BIOMARCADORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y MOLECULARES EN CÁNCER DE COLON EN ESTADIOS INICIALES: ANÁLISIS EN BIOPSIAS LÍQUIDAS Y EN TEJIDO TUMORAL. IMPLICACIONES PRONÓSTICAS”**. 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 por la Universitat de València.

En Valencia, a 26 de abril de 2017.

Prof. Carlos Camps Herrero
DNI: 22517012N



FUNDACIÓ
INVESTIGACIÓ
HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARI
VALÈNCIA

ELOISA JANTUS LEWINTRE

Licenciada en Bioquímica

Doctora por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que Dña. Mireia Gil Raga, licenciada en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **“BIOMARCADORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y MOLECULARES EN CÁNCER DE COLON EN ESTADIOS INICIALES: ANÁLISIS EN BIOPSIAS LÍQUIDAS Y EN TEJIDO TUMORAL. IMPLICACIONES PRONÓSTICAS”**. 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 por la Universitat de València.

En Valencia, a 26 de abril de 2017.

Eloisa Jantus Lewintre, PhD
DNI: X5674832L

“Pronunciaré esperanza, la gritaré por dentro

Si es lo que hace falta

La escribiré mil veces

Me alejaré de espaldas

Quizás de repetirla algo me quede”

L.L,

«El Poeta Halley» (2016).

A mis padres

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

A mis directores, el Dr. Camps y la Dra. Jantus, por haber sido mi guía durante todo el proceso. Por el conocimiento, la motivación y los consejos transmitidos. Gracias.

A todo el equipo de Oncología y Cirugía del Hospital de Sagunto, sin los que no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo de investigación, en especial a Marisa García por su gran dedicación. Agradecer también a los pacientes y sus familias su participación voluntaria en el proyecto.

A Silvia Calabuig, Sandra Gallach, Eva Escorihuela y el resto de compañeros del laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Hospital General de Valencia, por el trabajo realizado y el apoyo recibido.

A Vicente Giner, por su inestimable ayuda con la metodología estadística, su amistad y por lo mucho que he aprendido de él.

A mis compañeros y amigos, David Balaguer, Vega Iranzo, Javier Garde y Maria José Safont por el apoyo incondicional y los buenos momentos vividos. A Ana Durá, con quién compartir los últimos contratiempos de la tesis ha sido divertido.

A Toñi, por ayudarme siempre cuando más lo necesito y confiar tanto en mí.

A mis iaias, Angelita y Luisa, a mis padres, Ángel y Marisa, y a mis hermanos, Jordi e Irene, por vuestro amor, comprensión y optimismo a lo largo de los años. Por creer en mí. Gracias también

a mi suegra, Vicenta, y a mis cuñados, Neus, Carlos, Pablo y Silvia, por el cariño y aliento que me dais.

En especial, a Vicen, porque a tu lado me siento capaz de todo. Cada día vuelvo a casa con la ilusión de ver tu sonrisa. Juntas, con mucho amor, hemos hecho posible que el rey de nuestra casa sea el Capitán Tapón.

ÍNDICE:

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	13
LISTA DE FIGURAS.	18
LISTA DE TABLAS.....	20
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	22
1.1. Introducción.....	24
1.2. Biomarcadores y factores pronósticos en cáncer.....	25
1.2.1 importancia de los biomarcadores en cáncer.	25
1.2.2. Factores pronósticos en cáncer.....	28
1.3. Biopsia líquida.....	29
1.3.1. Marcadores tumorales en CCR.....	29
1.3.2. Concepto y utilidad de la biopsia líquida.	31
1.4. Cáncer de colon.	33
1.4.1. Epidemiología y factores de riesgo.....	34
1.4.2. El cribado del CCR.	36
1.4.3. Biología molecular en el ccr.	39
1.4.4. Factores pronósticos en CCR.....	49
2. OBJETIVOS.....	52
3. METODOLOGÍA.....	55
3.1. Pacientes y controles.	57
3.1.1. Pacientes.....	57
3.1.2. Grupo control.....	58
3.2. Muestras Biológicas.....	59
3.2.1. Sangre periférica.....	59
3.2.2. Muestra de tejido tumoral.	59
3.3. Aislamiento de CTCs a partir de sangre periférica.....	60
3.4. Extracción de ARN.....	61

3.5. Estudio de expresión génica por RTqPCR.	62
3.6. Análisis de expresión de las proteínas del Sistema de Reparación MMR (MLH1 y MSH2).	64
3.7. Análisis del estado mutacional de los genes de la familia RAS (KRAS y NRAS) y del gen BRAF.....	65
3.8. Análisis estadístico de los datos.....	71
3.8.1. Cálculo de la muestra.	73
4. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL.	74
4.1. Estudio descriptivo de las características demográficas, clínicas y patológicas de la población a estudio.....	76
4.1.1. Grupo control.....	76
4.1.2. Pacientes intervenidos de CCR (casos).....	77
4.2. Biopsia líquida: análisis de expresión de ARNm en sangre periférica y en CTCs.....	82
4.2.1. Estudio descriptivo de los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes <i>KRT19</i> y <i>CEA</i> en los pacientes antes de la cirugía y en los controles.....	83
.....	86
4.2.2. Valor diagnóstico en el CCR del análisis de ARNm en sangre periférica y CTCs de ambos genes (<i>CEA</i> y <i>KRT19</i>).....	86
4.2.3. Estudio descriptivo de los niveles de expresión de ARNm en sangre de los genes <i>KRT19</i> y <i>CEA</i> en los pacientes intervenidos de CCR antes y después de la cirugía.....	92
4.2.4. Correlación de los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes <i>KRT19</i> y <i>CEA</i> antes y después de la cirugía con las principales características clínico-patológicas y análisis de su valor pronóstico.	93
4.3. Tejido tumoral: estudio del estado mutacional de los genes RAS y BRAF y de la expresión proteica del sistema de reparación de ADN MMR.....	97
4.3.1. Análisis descriptivo del estado mutacional de los genes de la familia RAS (<i>KRAS</i> y <i>NRAS</i>) y <i>BRAF</i>	97

4.3.2. Análisis del estado de expresión de las proteínas del sistema MMR (MLH 1 y MSH 2).	99
4.4. Correlación de las variables analizadas con las principales características clínico-patológicas.	100
4.4.1. Correlación entre las características clínicas y patológicas.	100
4.4.2. Estado mutacional de los genes de la familia <i>RAS</i> y del gen <i>BRAF</i> .	104
4.4.3. Análisis de expresión del sistema de reparación de ADN MMR (proteínas MLH1 y MSH2).	110
4.5. Valor pronóstico.	114
4.5.1. Características clínicas y patológicas.	114
4.5.2. Estado mutacional de los genes de la familia <i>RAS</i> y del gen <i>BRAF</i> .	125
4.5.3. Estado de expresión del sistema de reparación de ADN MMR (proteínas MLH1 y MSH2).	131
4.5.4. Integración de resultados. Análisis multivariante de Cox.	132
4.6. Clasificación molecular.	134
4.6.1. Patrón de comportamiento clínico y patológico de los subtipos propuestos.	138
4.6.2. Valor pronóstico de la clasificación propuesta.	140
4.6.3. Integración de resultados.	143
5. CONCLUSIONES FINALES.	146
6. BIBLIOGRAFÍA.	150
7. ANEXOS.	170
7.1. Dictámen de la Comisión de Investigación.	172
7.2. Resolución de las ayudas para proyectos de grupos emergentes en centros asistenciales concedidas por la Conselleria de Sanidad en 2011.	173
7.3. Comunicación al congreso internacional ASCO 2016.	175

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS.

AJCC: Abreviatura en inglés de *American Joint Committee on Cancer* (Comité conjunto americano del cáncer).

ADN: Abreviatura del ácido desoxirribonucleico.

ARN: Abreviatura del ácido ribonucleico.

ARNm: Abreviatura del ácido ribonucleico mensajero.

ARMS: Tecnología basada en la amplificación refractaria de sistema de mutaciones.

APC: Abreviatura en inglés de *Adenomatous polyposis coli*.

BMP3: Gen cuyo nombre es la abreviatura en inglés de *Bone Morphogenetic Protein 3*.

BRAF: Gen cuya abreviatura en inglés de *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*.

CA 19.9: Abreviatura de antígeno carbohidrato 19.9.

CCR: Abreviatura de cáncer colorrectal.

CCRm: Abreviatura de cáncer colorrectal metastásico.

CCS: Abreviatura en inglés de *Colorectal Cancer Satype* (subtipo de cáncer colorrectal).

CCT: Colonografía computerizada por TC.

CEA: Miembro de la familia de las moléculas de adhesión celular relacionado con el antígeno carcinoma embrionario.

CMS: Abreviatura en inglés de *Colorectal molecular subtype* (subtipo molecular de cáncer colorrectal).

CMSP: Abreviatura de células mononucleares de sangre periférica.

CpG: Abreviatura de los pares de bases, Citosina y Guanina, enlazados por un fosfato.

CTCs: Abreviatura de células tumorales circulantes.

dMMR: Abreviatura utilizada para definir la presencia de una deficiencia en el sistema de reparación de ADN, MMR.

DNAsa: Enzima que degrada el ADN.

D.O: Abreviatura de densidad óptica.

EDTA: Abreviatura del ácido etilendiaminetetraacético.

EGFR: Abreviatura en inglés de *Epidermal growth factor receptor* (receptor del factor de crecimiento epidérmico).

EII: Abreviatura de enfermedad inflamatoria intestinal.

EMS: Abreviatura de estabilidad de microsatélites (en inglés, *Microsatellite stability [MSS]*).

EpCAM: Abreviatura en inglés de *epithelial cell adhesion molecule* (moléculas epiteliales de adhesión celular).

ESMO: Abreviatura en inglés de *European Society for Medical Oncology* (Sociedad Europea de Oncología Médica).

FDA: Abreviatura en inglés de *The Food and Drug Administration*.

FHGU: Abreviatura de la Fundación Hospital General de Valencia.

FMIC: Abreviatura del fenotipo metilador de islas CpG.

FOLFOX: Abreviatura del esquema de quimioterapia con los fármacos 5-fluorouracilo en infusión continua, Oxaliplatino y Leucovorin.

FU: Abreviatura del fármaco fluorouracilo.

G: Unidad de medida de la velocidad de centrifugación (fuerza centrífuga relativa).

Hb: Cifra de hemoglobina en sangre.

HR: Abreviatura de hazard ratio.

IEGFR: Abreviatura de los inhibidores de EGFR.

IHC: Abreviatura de inmunohistoquímica.

IMS: Abreviatura de inestabilidad de microsatélites (en inglés, *Microsatellite instability [MSI]*).

INC: Abreviatura de inestabilidad cromosómica.

KRAS: Oncogen *v-ki-ras kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (perteneciente a la familia *RAS*).

KRT19 (alias CK-19, K19, K1CS): Gen que codifica para la proteína CK-19 (queratina citoesquelética tipo I, 19).

LDH: Abreviatura de la enzima lactato deshidrogenasa.

LV: Abreviatura de leucovorin.

M: Abreviatura utilizada en el sistema de estadificación TNM para denominar la presencia de metástasis a distancia.

MAPK: Abreviatura en inglés de *mitogen-activated protein kinases* (proteína quinasas activadas por mitógenos).

MicroARNs: En inglés denominados *miRNAs*. Se definen como una clase de ARNs no codificantes que participan en la regulación de la expresión génica.

MLH 1: Abreviatura de MutL, e. coli, Homolog of, 1.

MMR: Abreviatura del inglés *mismatch repair* (reparación del desequilibrio).

MSH 2: Abreviatura de MutS, e. coli, Homolog of, 2.

MSH6: Abreviatura de MutS, e. coli, Homolog of, 6.

MYH: Gen cuyo nombre es la abreviatura en inglés de *mutY homolog*.

N: Abreviatura utilizada en el sistema de estadificación TNM para denominar la afectación de los nódulos linfáticos regionales.

NCCN: Abreviatura en inglés de *National Comprehensive Cancer Network* (Red nacional extensa del cáncer).

NCDB: Abreviatura en inglés de *National Cancer Data Base* (base de datos nacional de cáncer).

NDRG4: Gen supresor de tumores cuyo nombre es la abreviatura en inglés de *N-myc down-regulated gene 4*.

NRAS: Oncogen *neuroblastoma ras Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (perteneciente a la familia RAS).

OMS: Abreviatura de la Organización Mundial de la salud.

PBS: Abreviatura en inglés de *Phosphate Buffered Saline* (solución salina amortiguada por fosfatos).

PCR: Abreviatura en inglés de *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa).

PI3KCA: Abreviatura en inglés del gen que codifica para *Phosphatidylinositol 3-kinase* (Fosfoinositol 3-quinasa).

PMS2: Abreviatura en inglés de *Postmeiotic Segregation Increased 2*.

PTEN: Abreviatura en inglés del gen que codifica para *Phosphatase and tensin homolog* (homólogo fosfatasa y tensina).

QT: Abreviatura de quimioterapia.

R1: Término utilizado para denominar la resección incompleta del tumor primario con afectación microscópica de los márgenes de resección .

RAS: Familia de proto-oncogenes cuyo nombre procede de los términos en inglés *Rats sarcoma*.

RNAsa: Enzima que degrada el ARN.

RPM: Abreviatura de revoluciones por minuto.

RR: Abreviatura de riesgo relativo.

RT: Abreviatura de radioterapia.

RTqPCR: Abreviatura de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real.

SEER: Abreviatura en inglés de *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (Vigilancia, Epidemiología y Resultados).

SG: Abreviatura de supervivencia global.

SLE: Abreviatura de supervivencia libre de enfermedad.

T: Abreviatura utilizada en el sistema de estadificación TNM para denominar la extensión del tumor primario.

TEO: Abreviatura de operación endoscópica transanal.

TGF- β : Abreviatura en inglés de *Transforming growth factor beta* (factor de crecimiento transformante beta).

TGFB2: Abreviatura en inglés de *Transforming growth factor beta 2 receptor* (receptor del factor de crecimiento transformante beta 2).

TNM: Abreviatura en inglés de *tumor-node- metastasis* (tumor-nódulos-metástasis).

TSOH: Abreviatura del test de sangre oculta en heces.

TSOHg: Abreviatura del test de sangre oculta en heces basado en la prueba Guaiac.

TSOHi: Abreviatura del test de sangre oculta en heces basado en el análisis por inmunohistoquímica.

UICC: Abreviatura en inglés de *International Union for Cancer Control* (Unión Internacional para el Control del Cáncer).

WNT: Nombre acuñado a una vía de señalización molecular procedente del término en inglés *Wingless* (sin alas).

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1: Las propiedades del cáncer. (Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011).....	25
Figura 2: Etapas de la carcinogénesis (29).	33
Figura 3: Estimación de casos diagnosticados y fallecimientos por sexo en 10 tipos de tumores. Estados Unidos, 2015 (Siegel et al. 2015).	35
Figura 4: Patrones de inestabilidad genética en el desarrollo de CCR. Adaptado de Markowitz y Bertagnolli (Markowitz, 2009). Muestra el solapamiento entre los principales mecanismos de inestabilidad genómica en el CCR.....	42
Figura 5: Sistema de clasificación de CCR asociado al fenotipo celular y la respuesta terapéutica. (Figura 5; Sadanandam et al., 2013).	47
Figura 6: Propuesta de clasificación del CCR, reflejando las diferencias biológicas en la expresión genética entre los subtipos moleculares. (Figura 5, Guinney et al., 2005).	48
Figura 7: Supervivencia a los 5 años según las categorías TN (Gunderson, 2010).....	49
Figura 8: Técnica Ficoll Hypaque para la obtención de CMSP.	60
Figura 9: Fórmula matemática utilizada en el modelo de Pfaffl....	64
Figura 10: Ensayos del kit Therascreen <i>RAS</i> Extension Pyro.....	70
Figura 11: Representación gráfica de la expresión relativa de ARNm de <i>CEA</i> y <i>KRT19</i> en casos y controles.....	85
Figura 12: Porcentaje de pacientes con niveles de CEA > 4. A) tamaño tumoral, B) afectación ganglionar y C) estadio tumoral.....	102
Figura 13: Localización tumoral en función del estado mutacional del gen <i>BRAF</i> ^{V600E}	107
Figura 14: Estado de expresión del Sistema MMR y de la proteína MLH 1 en función del estado mutacional del gen <i>BRAF</i> ^{V600E}	108
Figura 15: Estado mutacional del gen <i>BRAF</i> ^{V600E} en función del estadio tumoral.....	108
Figura 16: Figuras de Kaplan-Meier según los niveles de CEA... 118	
Figura 17: Figuras de Kaplan-Meier de SLE según T, N y estadio tumoral según la clasificación TNM.....	123
Figura 18: Figuras de Kaplan-Meier de SLE según la RNL.....	125
Figura 19: Figuras de Kaplan-Meier de SLE según el estado mutacional de los genes de la familia RAS.....	128

Figura 20: Figuras de Kaplan-Meier de SLE según el estado mutacional del gen BRAF ^{V600E}	131
Figura 21: Figura de Kaplan-Meier de SLE en función del número de factores pronóstico independientes.....	134
Figura 22: Figuras de Kaplan-Meier de SLE entre los 5 subtipos moleculares propuestos.....	141
Figura 23: Figuras de Kaplan-Meier de SLE entre los subtipos cMMR.....	142

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Programa de tiempos y temperaturas utilizados en la Transcripción reversa.....	62
Tabla 2: Ensayos TaqMan® empleados en la RTqPCR.....	63
Tabla 3: Mutaciones del gen <i>KRAS</i> detectadas.....	67
Tabla 4: Valores de corte del Δ cq para cada mutación del gen <i>KRAS</i> , codones 12 y 13 analizada.....	68
Tabla 5: Características demográficas y analíticas del grupo control.....	76
Tabla 6: Características demográficas de los pacientes.....	77
Tabla 7: Clasificación TNM de los pacientes.....	79
Tabla 8: Características clínicas de los pacientes.....	81
Tabla 9: Análisis descriptivo del ARNm de <i>CEA</i> y <i>KRT19</i> en casos y controles.....	84
Tabla 10: Comparación de niveles expresión de ARNm de <i>CEA</i> en sangre sin selección previa de CTCs.....	87
Tabla 11: Resultado de los tests de ARNm de <i>CEA</i> y <i>KRT19</i> en muestras de sangre con o sin selección previa de CTCs.	88
Tabla 12: Niveles expresión relativa de ARNm de <i>CEA</i> y <i>KRT19</i> en muestras de sangre pre y postquirúrgicas de los casos de CCR.....	92
Tabla 13: Relación entre los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes <i>CEA</i> y <i>KRT19</i> (tanto prequirúrgicos como postquirúrgicos), y las principales características clínico-patológicas y moleculares.....	94
Tabla 14: Análisis de supervivencia de niveles de expresión relativa de ARNm de los genes <i>CEA</i> y <i>KRT19</i> en sangre previo a la cirugía.....	95
Tabla 15: Análisis de supervivencia de niveles de expresión relativa de ARNm de los genes <i>CEA</i> y <i>KRT19</i> en sangre posterior a la cirugía.....	95
Tabla 16: Mutaciones observadas en el gen <i>KRAS</i>	98
Tabla 17: Mutaciones observadas en el gen <i>NRAS</i>	98
Tabla 18: Expresión de las proteínas del Sistema de reparación MMR.....	99
Tabla 19: Distribución de los pacientes en función de la cifra de Hb al diagnóstico y la localización del tumor primario.....	101
Tabla 20: Correlación del estado mutacional de los genes RAS (<i>KRAS</i> y <i>NRAS</i>) con las características clínico-patológicas.....	105

Tabla 21: Distribución del estado mutacional de <i>BRAF</i> ^{V600E} según las características clínico-patológicas.	109
Tabla 22: Distribución del estado de expresión de MLH 1 y MSH 2 en función las características clínico-patológicas.....	111
Tabla 23: Distribución del estado de expresión del sistema MMR en función las características clínico-patológicas.....	113
Tabla 24: Análisis univariante de la SLE según las variables patológicas.	122
Tabla 25: Análisis de regresión Cox para SLE.....	133
Tabla 26: Resultado de la SLE en función del número de factores pronósticos independientes.	133
Tabla 27: Clasificación molecular en función de la expresión del sistema MMR y del estado mutacional de <i>RAS</i> y <i>BRAF</i>	137
Tabla 28: Distribución de las características clínico-patológicas en función de los subtipos moleculares.	138
Tabla 29: Análisis univariante de supervivencia (SLE) de los 5 subtipos moleculares.....	140

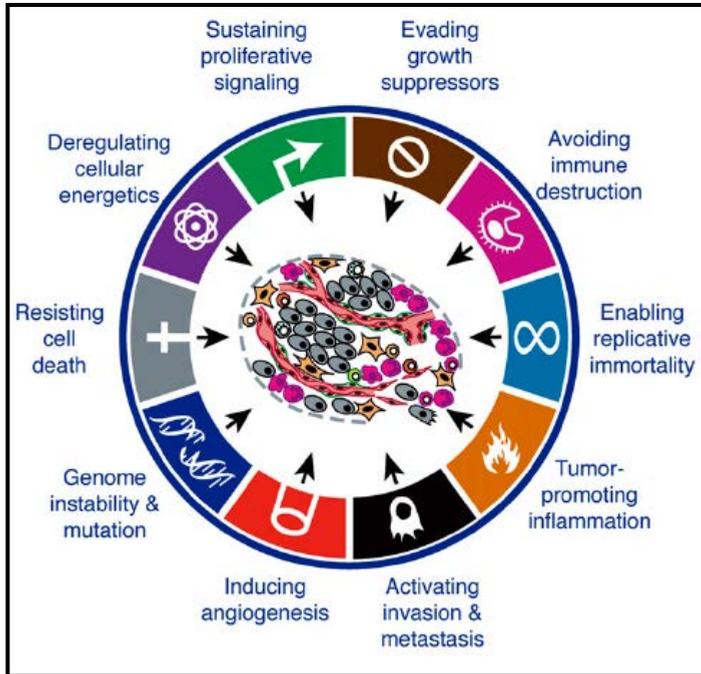
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

1.1. Introducción.

El cáncer es un término genérico que se utiliza para designar a un conjunto heterogéneo de enfermedades de base genética que difieren en su histogénesis, morfogénesis, evolución clínica y pronóstica. Todos los tumores presentan como característica común un proceso conocido como carcinogénesis. En dicho proceso se suceden diversas etapas, cada una de ellas gobernada por una alteración genética concreta, que confiere una ventaja proliferativa a la célula normal transformándola en una célula con genotipo maligno (1).

Hanahan y Weinberg describieron en el año 2000 seis propiedades esenciales que adquiere la célula normal durante la carcinogénesis, que son las siguientes: independencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento, evasión de muerte celular programada (apoptosis), potencial de replicación ilimitado, capacidad de inducir angiogénesis y capacidad de invasión tisular y metastatizar. Posteriormente se ha propuesto la inclusión de entre estas propiedades las siguientes: las alteraciones producidas por la inflamación (2), la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción inmune (3), **(figura 1)**.

Figura 1: Las propiedades del cáncer. (Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011).



1.2. Biomarcadores y factores pronósticos en cáncer.

1.2.1 importancia de los biomarcadores en cáncer.

En los últimos años ha mejorado notablemente nuestro conocimiento sobre los mecanismos de desarrollo y progresión del cáncer gracias a la aplicación de novedosas técnicas de laboratorio como son la secuenciación del ADN, el perfil de expresión génica, el análisis de metilación de ADN y la proteómica. Dichos avances nos han permitido conocer los principales mecanismos moleculares implicados en la oncogénesis y la proliferación celular.

El desarrollo de la oncología translacional ha permitido el desarrollo de nuevas terapias dirigidas y estrategias de tratamiento. Progresivamente hemos pasado de utilizar tratamientos basados en las características clínicas y patológicas a desarrollar las nuevas terapias en función del perfil molecular del tumor. Los avances en las técnicas de imagen e histopatológicas también han contribuido notablemente en la aproximación a una “medicina personalizada”. Los conocimientos biológicos y moleculares obtenidos en la investigación básica se están incorporado al diseño de los ensayos clínicos, cuyos resultados se trasladan posteriormente a la práctica diaria.

Los biomarcadores son características biológicas que indican un proceso normal, un proceso patogénico o una respuesta farmacológica a una determinada intervención terapéutica (4). Se utilizan principalmente como indicador de la evolución de una enfermedad: aumentan si la enfermedad avanza, se mantienen constantes si se estabiliza y disminuye si remite (5). Pueden ser utilizados en la identificación de individuos con alto riesgo de desarrollar la enfermedad, el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de nuestros pacientes, así como en el diseño de combinaciones de fármacos y en la identificación de mecanismos de resistencia. El desarrollo de ensayos clínicos con nuevas terapias deberían incluir biomarcadores que nos permitieran seleccionar adecuadamente a los pacientes.

Un marcador pronóstico debe medirse previamente al tratamiento con el fin de definir las características patológicas y moleculares que determinan la evolución de la enfermedad, y seleccionar a aquellos pacientes que necesitan un seguimiento

más exhaustivo o recibir un tratamiento adyuvante. En la práctica oncológica actual la administración de un tratamiento adyuvante implica tratar a muchos pacientes para obtener beneficio en pocos. Dada la gravedad de la enfermedad y el potencial beneficio aunque sea en un número limitado de pacientes, su indicación parece razonable siempre y cuando la toxicidad sea aceptable. Sin embargo, lo ideal sería disponer de un biomarcador cuya expresión identificara una supervivencia similar entre los pacientes tratados y no tratados. Por otro lado, también sería de gran utilidad distinguir a aquéllos pacientes que se beneficiarán de un tratamiento específico de los que no lo harán. Esta evaluación de tratamiento se realiza mediante un biomarcador predictivo que suele medirse antes de recibir un tratamiento y aporta información de la probabilidad de responder a un determinado tratamiento. En los últimos años se han desarrollado biomarcadores predictivos asociados al uso de nuevas terapias biológicas contra dianas moleculares como es el caso de la mutación del oncogén *BRAF* en melanoma, el reordenamiento del gen *ALK* en cáncer de pulmón o la amplificación de *HER-2* en cáncer de mama. En CCR metastásico la presencia de una mutación en los oncogenes *KRAS* o *NRAS* es un marcador predictivo de resistencia a las terapias con anticuerpos monoclonales anti-EGFR, y aproximadamente el 45% de los pacientes presentan una mutación en uno de los dos genes.

Para que un biomarcador sea útil en la práctica clínica debe obtenerse con facilidad y mediante procedimientos poco cruentos, siguiendo un protocolo de actuación estandarizado y reproducible. También debe aportar un beneficio clínico como

mejorar la supervivencia o disminuir la toxicidad de los fármacos. Por último, debe ser validado en una población independiente de la utilizada para su desarrollo.

Dada la utilidad de los biomarcadores en la individualización del diagnóstico y tratamiento de los pacientes, deberíamos incorporarlos en el diseño de los ensayos clínicos futuros que nos permitan desarrollar protocolos de actuación más costo-efectivos.

1.2.2. Factores pronósticos en cáncer.

Se conocen como factores pronósticos (FP) aquellos síntomas, signos, características patológicas o moleculares que nos proporcionan información sobre la supervivencia global (SG), la supervivencia libre de enfermedad (SLE), la respuesta terapéutica o la aparición de complicaciones (6), es decir, nos informan sobre la evolución de la enfermedad. Su conocimiento nos permite informar adecuadamente al paciente, comprender los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en el desarrollo de la enfermedad, comparar la eficacia de un tratamiento en subgrupos de pacientes con un pronóstico similar y diseñar ensayos clínicos con una estratificación equitativa de los mismos (7). Los FP pueden ser características intrínsecas de los pacientes (edad, sexo, estado general, comorbilidades), características clínicas, patológicas y moleculares relacionadas con el propio tumor (localización anatómica, estadio tumoral, marcadores de proliferación celular, oncoproteínas, estado mutacional de oncogenes y genes supresores de tumores, perfiles de expresión génica, estado de metilación del ADN, fenotipo molecular, etc.), características relacionadas con el tratamiento (tipo de cirugía,

esquemas de QT, dosificación, toxicidad, tiempos terapéuticos, etc.) o características relacionadas con el entorno del paciente.

1.3. Biopsia líquida.

1.3.1. Marcadores tumorales en CCR.

Clásicamente, los marcadores tumorales se definen como sustancias producidas por células tumorales o por células normales como respuesta a la aparición de un cáncer u otras enfermedades benignas. Estas sustancias pueden encontrarse en la sangre u otros componentes orgánicos como la orina, las heces, el líquido peritoneal, etc. La mayoría de los marcadores tumorales utilizados se detectan tanto en personas con un diagnóstico de cáncer como en personas sanas o con una enfermedad benigna, sin embargo, las concentraciones suelen ser mayores en las primeras. Pueden ser útiles en: el diagnóstico precoz (marcadores diagnósticos); la determinación del pronóstico (marcadores pronósticos); la predicción de la eficacia del tratamiento (marcadores de seguimiento); el control clínico tras la cirugía del tumor primario y la monitorización del tratamiento en la enfermedad avanzada (8).

El marcador tumoral serológico más utilizado hasta el momento en el CCR es el antígeno carcinoembrionario (CEA). Es una glicoproteína intracelular presente en el colon fetal que se expresa en aproximadamente el 90% de los CCR. Los niveles de CEA también pueden estar elevados en otros tumores como el cáncer de pulmón, tumores gástricos y pancreáticos, etc., en personas

fumadoras y en patologías benignas como la cirrosis hepática y la colitis ulcerosa.

En CCR, niveles elevados de CEA preoperatorio se han asociado con un peor pronóstico de la enfermedad. Por otro lado, la falta de normalización de la cifra de CEA tras 4-8 semanas desde la cirugía del tumor primario hace sospechar una resección incompleta o la presencia de micrometástasis, observando un riesgo relativo de recidiva de 3,77 en personas con niveles de CEA postoperatorio elevados (9). También es de utilidad en el seguimiento de los pacientes intervenidos de CCR para detectar una posible recidiva de la enfermedad. En este sentido, la guía de la Sociedad Europea de Oncología Médica (en inglés ESMO) recomienda su determinación cada 3-6 meses durante los 3 primeros años y cada 6-12 meses durante el 4º y 5º año tras la cirugía (10), y la guía americana NCCN (11) cada 3-6 meses durante los dos primeros años y cada 6 meses hasta completar los 5 años de seguimiento.

Otro de los marcadores tumorales utilizados clásicamente en el CCR es el antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9). Pese a que múltiples estudios han sugerido su valor como factor pronóstico en CCR, presenta una sensibilidad menor que el CEA y actualmente las guías internacionales no recomiendan su uso en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

La mayoría de los marcadores tumorales utilizados hasta el momento son proteínas. Sin embargo, en los últimos años ha emergido la hipótesis de que la determinación del ADN o ARNm de los genes implicados en la síntesis de estas proteínas podría mejorar la sensibilidad diagnóstica de los marcadores tumorales.

1.3.2. Concepto y utilidad de la biopsia líquida.

Se define como la captación y el análisis de células tumorales circulantes (CTCs) y/o ácidos nucleicos (ADN y/o ARN) circulantes procedentes del tumor en la sangre. Su análisis puede aportar información molecular precisa acerca de la evolución de la enfermedad desde etapas iniciales hasta la aparición de metástasis, así como información útil en el manejo clínico de la enfermedad mediante la selección del tratamiento, la monitorización del comportamiento tumoral durante el tratamiento y el estudio de los mecanismos de resistencia a los fármacos (12). Estos avances han sido posibles gracias al importante desarrollo biotecnológico acontecido en los últimos años. Múltiples estudios han demostrado que es posible reconstruir el genoma tumoral a partir de ADN procedente del plasma (13); (14) y de las CTCs.

Las CTCs son células tumorales procedentes de tumores sólidos que se propagan a través de la sangre y/o el drenaje linfático. Proceden del tumor primario y se ha postulado que contienen subpoblaciones celulares con la capacidad de invadir y generar metástasis a distancia (15). Se han propuesto múltiples modelos para describir el proceso de diseminación de las células tumorales desde el tumor primario hasta la colonización de órganos a distancia, bien mediante la adquisición de la capacidad para metastatizar o mediante la extensión física a órganos vecinos (16); (17).

Las CTCs están presentes en el torrente circulatorio en concentraciones muy bajas; aproximadamente 1 ml de sangre periférica total contiene 1-10 CTCs frente a 10^6 - 10^7 células

sanguíneas nucleadas y 109 células rojas sanguíneas (18). Por lo tanto, a menudo es necesario mejorar la sensibilidad de la técnica de detección de CTCs mediante la introducción de un paso para incrementar su concentración antes de intentar capturarlas. En este contexto, se han desarrollado diferentes métodos para realizar el enriquecimiento celular, la caracterización y la identificación de las CTCs: CTC microchips, aparatos de filtración, análisis mediante transcripción reversa cuantitativa por PCR, sistemas microscópicos automáticos, etc (19); (20).

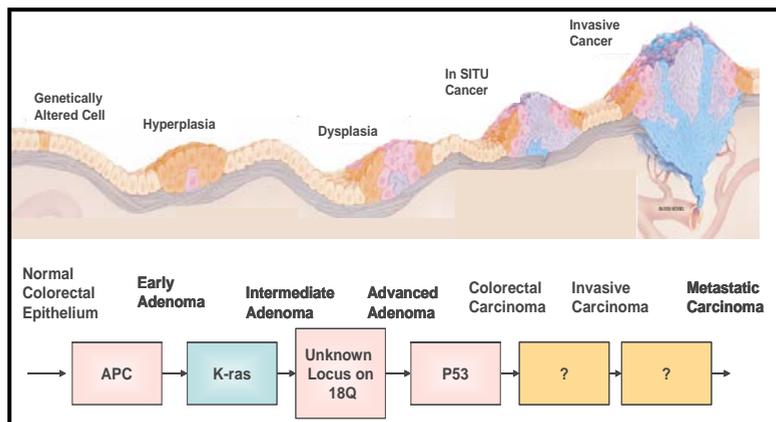
Uno de los principales métodos de enriquecimiento de CTCs utilizado hasta el momento se basa en el uso de bolas magnéticas unidas a anticuerpos contra antígenos epiteliales de adhesión celular “epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)” presentes en las CTCs, y el posterior aislamiento de dichas bolas mediante un aparato magnético (21). El aislamiento de CTCs mediante esta tecnología (“CellSearch system”) ha demostrado ser un factor pronóstico y predictivo de respuesta en CCR metastásico (22), y en otros tumores sólidos como el Cáncer de Mama (23) y de Próstata (24). Dicha metodología se basa en el supuesto que las CTCs mantienen las mismas características que su tejido de origen y, por tanto, la mayoría de CTCs procedentes de un CCR expresarán marcadores epiteliales específicos como citoqueratinas. La especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo permite el aislamiento de CTCs con un alto nivel de pureza. Sin embargo, el enriquecimiento de CTCs es altamente dependiente del anticuerpo utilizado y actualmente se desconoce cuál es el antígeno ideal que permita capturar todas las CTCs y excluir las células hematológicas (25). Estudios recientes

muestran la variabilidad de expresión de EpCAM en ciertos fenotipos de CTCs, y la existencia de subpoblaciones celulares que no expresan un fenotipo epitelial, probablemente debido al fenómeno de transición epitelio-mesénquima, que no serían detectadas mediante esta técnica (26); (27).

1.4. Cáncer de colon.

El Cáncer Colorrectal (CCR) es una enfermedad heterogénea que se origina en el colon y en el recto. La mayoría de los tumores se desarrollan lentamente a partir de pólipos adenomatosos o adenomas. El epitelio intestinal tiene una alta tasa de recambio celular que favorece la aparición de alteraciones genéticas específicas que favorecen a su vez la aparición de cambios morfológicos en el tejido. Vogelstein describió el primer modelo de carcinogénesis basado en dichas alteraciones (28). Estudios realizados posteriormente sugieren que el CCR es una consecuencia de diversos factores, algunos de ellos heredados y otros adquiridos a lo largo de la vida (**figura 2**).

Figura 2: Etapas de la carcinogénesis (29).



1.4.1. Epidemiología y factores de riesgo.

En el año 2012, el CCR fue el tercer tumor más frecuente en hombres (746.000 casos, 10% del total) y el segundo en mujeres (614.000 casos, 9.2% del total) en todo el mundo (**figura 3**). Al menos el 55% de los casos ocurrieron en los países más desarrollados. Según los datos publicados por Siegel y colaboradores en 2015, desde mediados de los años 80 se ha observado en Estados Unidos un descenso en la incidencia del CCR (más del 4% por año) atribuible a un descenso de los factores de riesgo y a la introducción de los métodos de cribado (30). Sin embargo, se espera un incremento en el número de casos nuevos en adultos entre 20 y 49 años en el año 2030, siendo la causa desconocida (31).

En España, el CCR es el tercer tumor más prevalente en hombres y el segundo en mujeres, siendo el tumor más prevalente teniendo en cuenta ambos sexos. En el año 2012 se diagnosticaron 19,261 casos en hombres y 12,979 casos en mujeres, y fallecieron por esta patología 8,742 hombres y 5,958 mujeres (segunda causa de mortalidad por cáncer en ambos sexos); (32).

Se han descrito diversos factores involucrados en el desarrollo del CCR sin existir una causa específica. La edad, una historia previa de pólipos colónicos, la enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) y la existencia de factores hereditarios están relacionados con el aumento de la incidencia de CCR. Por otro lado, existen diferentes mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del CCR con una respuesta heterogénea a los diferentes carcinógenos y tratamientos que ponen de manifiesto la complejidad de este tipo de cáncer.

Figura 3: Estimación de casos diagnosticados y fallecimientos por sexo en 10 tipos de tumores. Estados Unidos, 2015 (Siegel et al. 2015).

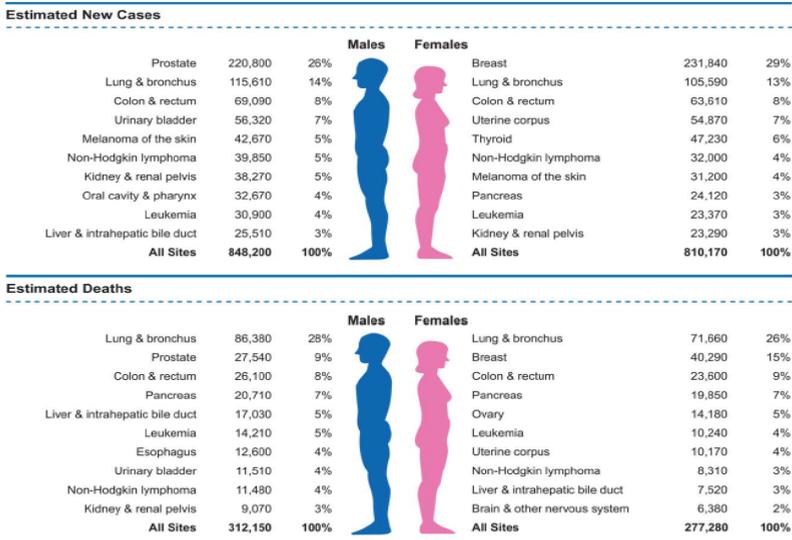


FIGURE 1. Ten Leading Cancer Types for the Estimated New Cancer Cases and Deaths by Sex, United States, 2015.

La mayoría de los CCR son esporádicos, sin embargo, hasta en un 20% de los casos se observa una agrupación familiar. Diversos estudios muestran un aumento del riesgo de CCR en familiares de pacientes de primer grado diagnosticados de adenomas o carcinomas invasivos (33,34). Se han descrito varios síndromes hereditarios asociados con el CCR: síndrome de Lynch o HNPCC, síndrome polipósico adenomatoso familiar, síndromes hamartomatosos polipósicos (Peutz-Jeghers, poliposis juvenil y enfermedad de Cowden) y poliposis asociada al gen *MYH*. El síndrome de Lynch es el más común de todos ellos y supone entre un 2% y un 4% del total de CCR. Se origina por la aparición de mutaciones germinales en el ADN de los genes del Sistema de

Reparación de Genes (“*Mismatch Repair [MMR] System*”): *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* (35).

La exposición a determinados factores ambientales y la predisposición genética heredada favorecen el desarrollo de adenomas y carcinomas. Respecto a la dieta diversos estudios han sugerido un aumento de la incidencia de CCR asociado al consumo elevado de carne roja y procesada (36); y un descenso de la misma asociado a una dieta rica en fibra, pescado, calcio, vitamina D (37,38) y legumbres (39). El consumo de alcohol (40) y tabaco también aumentan el riesgo de desarrollar CCR, estando este último relacionado con una mayor mortalidad (41). Otros factores de riesgo son la obesidad, el bajo consumo de vegetales y frutas, y la inactividad física (42–44).

1.4.2. El cribado del CCR.

1.4.2.1. Pruebas de cribado.

Las pruebas de cribado han demostrado la reducción de la incidencia en CCR. En países desarrollados han contribuido, a su vez, a reducir la mortalidad, principalmente gracias a la colonoscopia (45).

Las pruebas de cribado disponibles se pueden clasificar en 2 grupos (46): 1) tests basados en el análisis de heces: TSOH basado en la prueba Guaiac [TSOHg], TSOH basado en la detección de hemoglobina por inmunohistoquímica (TSOHi) y la detección de DNA en heces; y 2) endoscopias y tests radiológicos: colonoscopia, sigmoidoscopia flexible, cápsula endoscópica, enema con doble contraste baritado y colonografía computarizada por tomografía (CCT).

Respecto a los tests basados en el análisis de heces, si el resultado es positivo es necesario realizar una colonoscopia posteriormente independientemente del test utilizado. En los últimos años han emergido diferentes tests basados en el análisis de ADN en heces como método de cribado. De todos ellos, destaca el Test de Cologuard® (Exact Sciences), aprobado por la FDA en agosto de 2014. Incluye el análisis por ensayo cuantitativo molecular de mutaciones de *KRAS*, metilación aberrante de los genes *NDRG4*, *BMP3*, y *β-actina* y la detección de hemoglobina por técnicas de inmunoensayo.

En cuanto a los tests endoscópicos, las principales limitaciones que presentan son: la invasividad del test, la necesidad de preparación previa, la utilización de recursos para su realización (tiempo del examen, uso de sedación, etc), los riesgos inherentes a la prueba como son el sangrado y la perforación (47) y que los resultados son operador dependiente. Pese a ello, la colonoscopia es el método de cribado más completo, ya que permite el examen de toda la mucosa del intestino grueso y la exéresis de pólipos en una única sesión. Su uso parece ser menos efectivo en la disminución del riesgo de CCR en los tumores localizados en el lado derecho según los resultados de varios estudios (48; 49; 50).

1.4.2.2. Búsqueda de biomarcadores serológicos.

Dada la invasividad de la colonoscopia, la baja adherencia de la población y el riesgo de complicaciones asociado a la técnica, la búsqueda de un biomarcador no invasivo con una eficacia similar en la detección del CCR es una prioridad. El desarrollo de un biomarcador serológico como primera prueba de cribado sería

mejor aceptado y conseguiría un mayor porcentaje de uso que las herramientas disponibles hasta el momento (51).

La detección serológica de autoanticuerpos contra antígenos asociados al tumor ha sido ampliamente estudiada como biomarcador potencial para la detección del CCR. La sensibilidad individual de cada autoanticuerpo parece baja. Fletcher y colaboradores, utilizando como valor normal una cifra de CEA \leq 2,5 mg/L, calcularon que el valor CEA tenía una sensibilidad del 36% y una especificidad del 87% en pacientes diagnosticados de CCR estadio A y B según la clasificación de Dukes (52). El valor aislado de Ca 19.9 tampoco resulta útil como método de cribado. Diferentes autores han propuesto paneles serológicos que incluyan la detección de múltiples marcadores tumorales para aumentar la sensibilidad de la técnica (53). Un ejemplo de ello es la firma serológica propuesta por Butvilovskaya y colaboradores en la que se incluye la detección de anticuerpos contra glicanos asociados al CCR y diferentes marcadores tumorales ya conocidos (CEA, Ca 19-9, Ca 12.5, etc), alcanzando una sensibilidad y especificidad del 88% y 98% respectivamente (54). Pese a que se han publicado resultados prometedores, la mayoría de los estudios tienen un tamaño muestral pequeño y carecen de una validación prospectiva de los resultados.

La detección y cuantificación de ácidos nucleicos circulantes de origen tumoral es una herramienta con un excelente potencial como método diagnóstico en CCR. Múltiples estudios han propuesto el uso de la cuantificación de ADN libre circulante, de ARNm libre circulante y de células tumorales circulantes (CTCs) como método de cribado para el diagnóstico de CCR, sin embargo,

los resultados publicados hasta el momento muestran una gran variabilidad tanto en la concentración de ADN y ARN como en la sensibilidad y especificidad de la técnica empleada, indicando la presencia de diversos factores pre-analíticos y analíticos que pueden influir en el valor de la prueba como método diagnóstico (55).

1.4.3. Biología molecular en el ccr.

El CCR es una enfermedad heterogénea. Durante años el conocimiento de la variabilidad de los tumores colorrectales se limitaba al análisis histopatológico a partir del cual se establecían clasificaciones genéricas con manifestaciones clínicas diferentes. Hoy en día, se está empezando a comprender la heterogeneidad genética y biológica que subyace a la variabilidad clínica y patológica. El desafío actual es comprender el fundamento molecular que explique la susceptibilidad individual a desarrollar el CCR y determinar los factores que influyen en el inicio del desarrollo y en la progresión de la enfermedad, así como en la respuesta o resistencia a los distintos tratamientos. (56).

1.4.3.1. Fundamentos moleculares.

Los principales fundamentos moleculares del CCR son la inestabilidad genómica, la inactivación mutacional de genes supresores de tumores, la activación de oncogenes, las modificaciones epigenéticas y el microambiente tumoral e interacción huésped-tumor.

- Inestabilidad genómica:

La pérdida de estabilidad genómica es uno de los mecanismos moleculares más importantes en el desarrollo del CCR ya que

facilita la aparición de múltiples mutaciones asociadas al tumor. Dicha pérdida se puede producir por diferentes causas: inestabilidad cromosómica, defectos en el sistema de reparación de desequilibrios en ADN ("*DNA mismatch repair (MMR) system*") y metilación aberrante de ADN (57).

La inestabilidad cromosómica (INC) es el tipo de inestabilidad genómica más frecuente, supone el 80%-85% de los casos de CCR esporádico. Dicha inestabilidad permite la aparición de mutaciones en diversos genes supresores de tumores (*APC, P53, SAMD4*), favoreciendo así el desarrollo del fenotipo tumoral. El segundo tipo más frecuente es el déficit del sistema MMR que se caracteriza por la inactivación de alguno de los genes que componen (*MLH 1, MSH 2, MSH6 y PMS2*). Dicha inactivación puede ser heredada a través de mutaciones en la línea germinal, como en el Síndrome de Lynch, o adquirida a través del silenciamiento génico mediante metilación. La inactivación somática de los genes MMR ocurre en el 15% de los casos de CCR esporádicos, siendo el silenciamiento bialélico de la región promotora del gen *MLH 1* la causa más frecuente. La pérdida de función del sistema MMR puede ser medida por la presencia de inestabilidad de microsatélites (IMS), que favorece el cambio de tamaño de repeticiones de mononucleótidos o dinucleótidos dispersos a lo largo del genoma, o por la identificación de la pérdida de expresión de la proteína codificada por el gen mediante técnicas de inmunohistoquímica. Se ha descrito una elevada concordancia entre la detección de un alto grado de IMS y la pérdida de expresión de las proteínas *MLH 1* y *MSH 2* (58; 59), con un valor pronóstico equiparable (60).

Otros mecanismos para desarrollar CCR son la inactivación en la línea germinal del gen *MYH*, encargado de la reparación de ADN mediante la excisión de 8-oxoguanina, y el silenciamiento génico epigenético mediante la metilación aberrante de ADN. En el CCR se ha observado un subgrupo de pacientes que presentan una metilación aberrante considerable en ciertas islas CpG (secuencias de ADN repetidas presentes en el genoma normal en las que la citosina está metilada dentro de los dinucleótidos CpG) asociadas a áreas promotoras de determinados genes, produciendo su silenciamiento. Este fenómeno se conoce como fenotipo metilador de islas CpG (FMIC); (61). Está presente en el 15% de los casos de CCR y, prácticamente, en el 100% de los casos con metilación aberrante del gen *MLH 1*.

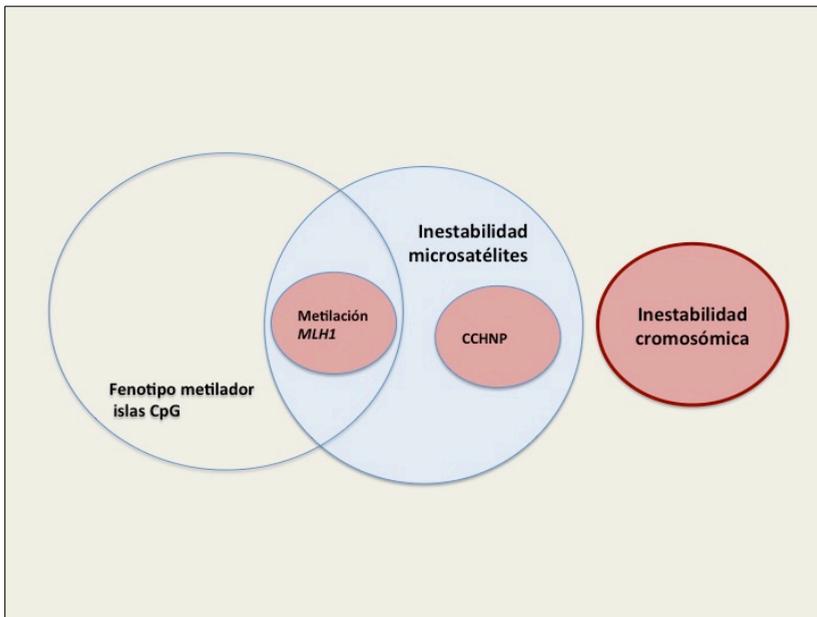
Durante el desarrollo del CCR, las alteraciones genéticas descritas previamente pueden aparecer de forma separada o conjunta, generando el primer nivel de heterogeneidad inter-tumor (**figura 4**).

- Inactivación mutacional de genes supresores de tumores:

La mutación más frecuente en CCR (85% de los casos) afecta al gen supresor de tumores *APC* que codifica para la proteína APC. La inactivación de dicho gen activa la vía metabólica Wnt de forma constitutiva, considerándose un evento inicial en el CCR ya que regula la expresión de genes implicados en la activación celular. El segundo paso clave en el desarrollo del CCR es la inactivación de la vía p53, implicada en el control del ciclo celular y la apoptosis (62). Su inactivación favorece la progresión de adenoma a carcinoma invasivo. El tercer paso en el desarrollo del CCR es la inactivación mutacional de la vía TGF- β , siendo la mutación somática que inactiva *TGFBR2* la más frecuente. Su inactivación

favorece la transición de adenoma a displasia de alto grado o carcinoma (63).

Figura 4: Patrones de inestabilidad genética en el desarrollo de CCR. Adaptado de Markowitz y Bertagnoli (Markowitz, 2009). Muestra el solapamiento entre los principales mecanismos de inestabilidad genómica en el CCR.



- Activación de oncogenes:

Los oncogenes implicados en el desarrollo de CCR con más frecuencia son los pertenecientes a la familia *RAS* (*KRAS* y *NRAS*) y *BRAF*. El 20-25% de los tumores humanos presentan una mutación en alguno de los genes de la familia *RAS*. Son mutaciones puntuales de un nucleótido que afectan con mayor frecuencia a los codones 12 y 13 del exón 2 y al codón 61 del exón 3. En el CCR el

gen *KRAS* aparece mutado en aproximadamente el 40% de los casos. El 70-80% de las mutaciones afectan al codón 12 y el 15-20% al codón 13 del exón 2. La presencia de mutaciones en el gen *NRAS* se detecta en el 3-5% de los casos, siendo las localizaciones más frecuentes el codón 61 del exón 3 y los codones 12 y 13 del exón 2 (64). Se considera que las mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* son mutuamente excluyentes. La frecuencia de mutaciones del gen *BRAF* en el CCR varía entre el 8% y 12% de los casos y es prácticamente excluyente con las mutaciones *RAS* (65). La mutación V600E es la más frecuente (más del 80% de todas las mutaciones *BRAF*). Se han descrito otras mutaciones *BRAF* en <1% de los casos, cuyo significado está prácticamente inexplorado.

Las mutaciones oncogénicas de estos genes producen la activación amplificada de la vía metabólica RAS/RAF/MAPK por debajo del receptor extracelular EGFR, que se traduce en un aumento de la proliferación celular y la angiogénesis, en una disminución de la apoptosis y en una alteración del metabolismo celular (66).

La aparición de una mutación en los genes *RAS* es un fenómeno temprano en la carcinogénesis del CCR y se mantiene durante el curso de la enfermedad, motivo por el cual la concordancia en la tasa de mutaciones entre el tumor primario y las metástasis es del 95% (67). En etapas tempranas confieren un mínimo potencial de malignidad, sin embargo favorecen el potencial celular de malignidad en etapas más avanzadas de la enfermedad. Las mutaciones en el gen *BRAF* comparadas con las de la familia *RAS*, son más frecuentes en pólipos hiperplásicos, adenomas serrados y tumores de colon proximales.

Por último, un tercio de los pacientes con CCR presentan mutaciones somáticas en el oncogén *PI3KCA*, favoreciendo el crecimiento y supervivencia celular incontrolado a través de la activación de la vía metabólica PI3K.

- *Modificaciones epigenéticas:*

Los mecanismos epigenéticos implicados en el desarrollo del CCR son: la metilación de citosina en las islas CpG; las modificaciones de histonas, los microARNs, los ARNs no codificantes y la remodelación nucleosomal. Dichos mecanismos están implicados tanto en el inicio del desarrollo del CCR como en la progresión de la enfermedad (68).

- *Microambiente tumoral e interacción huésped-tumor:*

Las interacciones entre los distintos componentes del microambiente tumoral (matriz extracelular, factores de crecimiento, citoquinas, fibroblastos, células relacionadas con el espacio vascular, células de respuesta inflamatoria, etc.) están implicadas en la proliferación de las células tumorales, en su potencial metastásico y en la localización de las metástasis (69). Tanto las interacciones del microambiente tumoral como la interacción huésped-tumor son otras de las causas de la heterogeneidad del CCR. Dichas interacciones dependen de las variaciones genéticas de las personas diagnosticadas de CCR, sin embargo la manifestación clínica de dichas variaciones puede ser modificada por la exposición a diferentes causas de estrés a lo largo de la vida del sujeto (comorbilidades, cambios hormonales, estilo de vida, dieta, etc.).

1.4.3.2. Clasificación molecular en CCR.

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 (70). Se identificó un grupo de pacientes (16%) con hipermutación genética, tres cuartos de los cuáles presentaban a su vez IMS. 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 produjeron a través de una secuencia de eventos genéticos diferente.

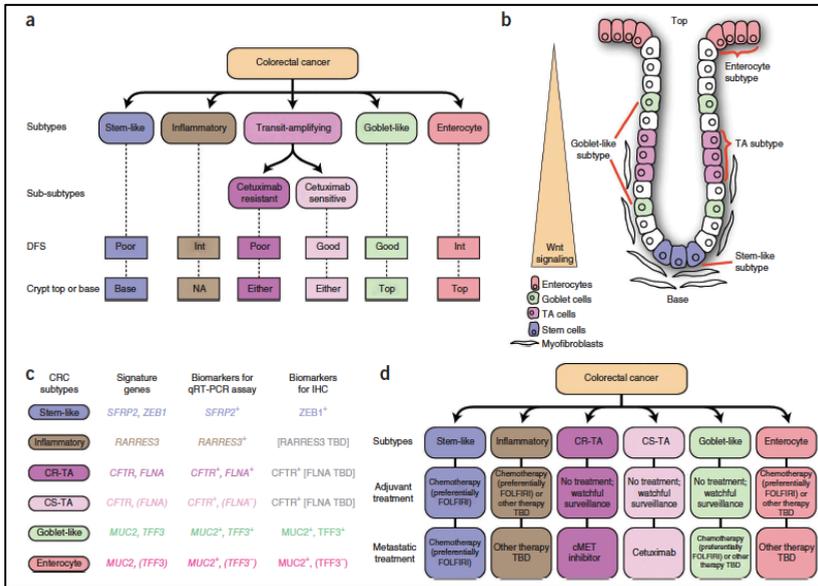
De las firmas moleculares desarrolladas posteriormente destacamos dos de ellas. La primera, publicada por De Sousa E Melo y colaboradores, clasificó 90 pacientes con CCR estadio II en tres subtipos llamados CCS1 (“Colorectal Cancer Subtype”), CCS2 y CCS3. CCS1 se caracterizó principalmente por la ausencia de IMS, la ausencia de un 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 IMS, de un 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 (71).

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 (72). Los subtipos moleculares propuestos también mostraron diferencias significativas en el pronóstico (**figura 5**).

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 (73), 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 6** 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.

Figura 5: Sistema de clasificación de CCR asociado al fenotipo celular y la respuesta terapéutica. (Figura 5; Sadanandam et al., 2013).



- 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.

Desde una perspectiva biológica, dicha clasificación aporta un mayor conocimiento de los subtipos “no-IMS” 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 cuáles 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 6: Propuesta de clasificación del CCR, reflejando las diferencias biológicas en la expresión genética entre los subtipos moleculares. (Figura 5, Guinney et al., 2005).

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

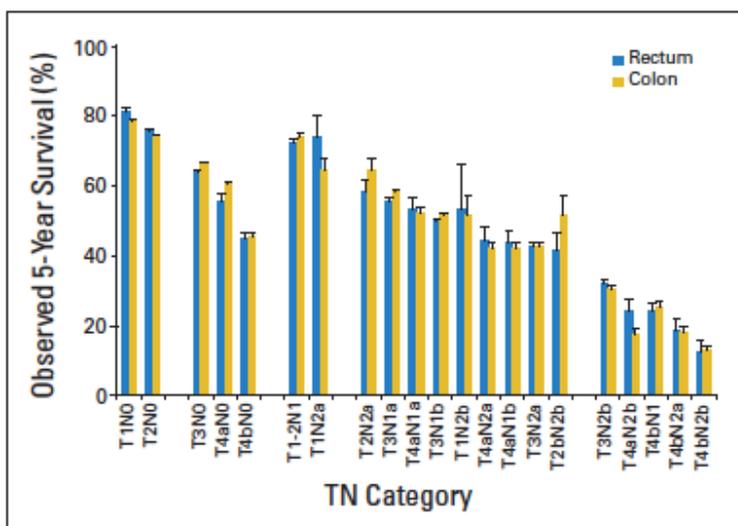
CIMP, CpG island methylator phenotype; MSI, microsatellite instability; SCNA, somatic copy number alterations.

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.

1.4.4. Factores pronósticos en CCR.

Hasta la fecha, la supervivencia y el riesgo de recaída de los pacientes diagnosticados de CCR tras la cirugía sola o combinada con quimioterapia adyuvante, viene determinada principalmente por el grado de penetración de la pared intestinal por el tumor primario (T según la clasificación TNM) y por la afectación ganglionar local (N según esta clasificación). En el año 2010 se publicaron los resultados del análisis de supervivencia de 109,953 pacientes incluidos en la base de datos SEER entre 1992 y 2004 en función de estos dos parámetros y la afectación metastásica (M). En la **figura 7** se observan las diferencias de supervivencia de los pacientes en función de las diferentes combinaciones de la T y la N (74). Gracias a los resultados de este estudio se realizó la última revisión del estadiaje tumoral del TNM, publicándose la 7ª edición del Manual de estadiaje de AJCC Cancer (75).

Figura 7: Supervivencia a los 5 años según las categorías TN (Gunderson, 2010).



Sin embargo, el estadiaje tumoral no es suficiente para clasificar adecuadamente a los pacientes. El mayor beneficio observado con la QT adyuvante es una reducción del riesgo de recaída del 23% utilizando el esquema de QT más activo (76) en el estadio III. En el estadio II se estima que el beneficio absoluto sobre la supervivencia no supera el 4%. Por ello, es necesario buscar nuevos parámetros que nos ayuden a estratificar mejor a los pacientes. De hecho, a la hora de establecer la indicación de QT adyuvante en el estadio II es importante clasificar a los pacientes en alto o bajo riesgo teniendo en cuenta los principales factores de riesgo establecidos como factores pronósticos (11,77): Tumores T4, histología pobremente diferenciada excepto en el subgrupo de tumores con inestabilidad de microsatélites, invasión linfovascular y perineural, obstrucción y/o perforación intestinal, márgenes de resección positivos, inadecuado número de nódulos linfáticos analizados (< 12) y elevación del marcador tumoral CEA.

Un ejemplo de la aplicabilidad de las nuevas tecnologías en la búsqueda de biomarcadores pronósticos y predictivos en CCR son las firmas génicas publicadas en pacientes con CCR estadios II y III. Oncotype DX Colon Cancer Test™ (78) cuantifica la expresión de 12 genes clasificando a los pacientes según el riesgo de recaída en alto riesgo, riesgo intermedio o riesgo bajo. Esta firma ha sido validada clínicamente en pacientes con CCR estadios II y III procedentes del estudio QUASAR (79) y NSABP C-07 (80), mostrando diferencias significativas en el riesgo de recaída a los tres años la SLE y la SG. ColoPrint® (81) analiza la expresión de 18 genes diferenciando los tumores según el riesgo

de recurrencia en alto y bajo riesgo. Dicha firma parece particularmente útil en pacientes con estadio II (82). Sin embargo, ninguno de estos test ha demostrado ser un factor predictivo de respuesta al tratamiento con QT adyuvante.

A lo largo de nuestro estudio analizaremos las principales características clínicas, patológicas y moleculares propuestas como posibles factores pronósticos, y propondremos una clasificación molecular sencilla que nos permita estratificar a los pacientes en función del riesgo.

2. OBJETIVOS.

Objetivo principal:

Dada la heterogeneidad del CCR, el objetivo principal del estudio es analizar los posibles biomarcadores clínicos, patológicos y moleculares con implicaciones diagnósticas y pronósticas en el CCR en estadios iniciales (estadios I-III).

Objetivos específicos:

1. Realizar en nuestra cohorte de pacientes un estudio descriptivo de las principales variables demográficas, clínicas y patológicas implicadas en el CCR en estadios iniciales.
2. Analizar la sensibilidad y especificidad de los niveles de expresión del ARNm de los genes *CEA* y *KRT19* en sangre periférica en el diagnóstico del CCR.
3. Analizar el valor pronóstico de los niveles de expresión relativa del ARNm de los genes *CEA* y *KRT19* en sangre periférica en pacientes intervenidos de CCR (estadios I-III), así como su correlación con las principales variables clínico-patológicas.
4. Analizar en las muestras de tejido tumoral el estado mutacional de los genes *RAS* (*KRAS*, *NRAS*) y *BRAF*, y la expresión de las proteínas del sistema MMR (*MLH1* y *MSH2*). Correlacionar los resultados con el pronóstico y las principales variables clínico-patológicas de los pacientes.
5. Proponer una clasificación con 5 subtipos moleculares según el estado mutacional de los genes *RAS* y *BRAF*, y el estado de expresión del sistema MMR. Analizar el comportamiento clínico y patológico así como el pronóstico de los diferentes subtipos.

3. METODOLOGÍA.

3.1. Pacientes y controles.

3.1.1. Pacientes.

Se incluyeron de forma prospectiva 105 pacientes con los siguientes criterios de inclusión: ser intervenido de un CCR localizado (estadios I-III) en el Hospital de Sagunto, tener un diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinoma y aceptar participar en el estudio de forma voluntaria mediante la firma de un consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron que no hubieran recibido tratamiento con QT o RT previamente.

Todos los pacientes fueron intervenidos desde noviembre de 2011 hasta febrero de 2014 y firmaron el documento de consentimiento informado el día previo a la intervención. El estudio se llevó a cabo asegurando el cumplimiento de las normas éticas y legales vigentes en conformidad con la Declaración de Helsinki. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital de Sagunto el 23 de noviembre de 2010.

Las variables demográficas basales recogidas en los pacientes fueron las siguientes: sexo, edad, motivo de consulta, antecedentes oncológicos personales y familiares, comorbilidades, hábito tabáquico, consumo de alcohol, localización del tumor primario y realización de colonoscopia completa previa a la intervención. También se recogieron las variables clínicas: cifra de Hb (g/dl) al diagnóstico, valor de los marcadores tumorales CEA (ng/ml) y CA 19.9 (UI/ml) en las 24 horas previas y a las 4 semanas de la intervención quirúrgica, resección mediante laparoscópica o por laparotomía abierta, cirugía urgente o programada, presencia de

complicaciones post-quirúrgicas, y administración de QT adyuvante así como el esquema de tratamiento administrado. Por último, las variables patológicas registradas fueron: grado histológico clasificado en 2 subgrupos (83): bajo grado ($\geq 50\%$ de formación glandular) o alto grado ($<50\%$ de formación glandular); extensión tumoral según la 7ª edición TNM de la AJCC (75); número de nódulos linfáticos regionales analizados; ratio entre el número de nódulos linfáticos afectados y analizados (84); presencia o ausencia de invasión venosa, linfática y perineural; presencia o ausencia de perforación tumoral o abscesificación y estado del margen de resección (85).

3.1.2. Grupo control.

Se incluyeron en el estudio 32 voluntarios clasificados en 2 grupos:

- i. Sujetos que fueron sometidos a una colonoscopia durante el período de reclutamiento del estudio a los que se les resecó un pólipo adenomatoso y que aceptaron participar en el estudio firmando el documento de consentimiento informado (n=12).
- ii. Voluntarios sanos a los que se les realizó una colonoscopia entre enero y marzo de 2016 sin objetivarse patología en dicha exploración y que aceptaron participar en el estudio firmando el consentimiento informado (n=20).

En todos los pacientes del grupo control se registró la edad, el sexo, el hábito tabáquico y el valor de los marcadores tumorales CEA y CA 19.9.

3.2. Muestras Biológicas.

3.2.1. Sangre periférica.

En los pacientes intervenidos de CCR, la primera extracción sanguínea se realizó en las 24 horas previas a la intervención y la segunda en la primera visita de control al Servicio de Oncología Médica (semana 4 post cirugía).

En los individuos controles se realizó una única extracción de sangre periférica el mismo día de la colonoscopia justo antes de la realización de la prueba.

En todos los casos, se recogieron dos muestras de 10 ml de sangre periférica en tubos con EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer®) eliminando el primero de ellos para evitar contaminaciones de la muestra por células epiteliales tras la venopunción, y un tercer tubo también de 10 ml de tipo PAXgene™ que contiene un aditivo que evita la degradación del ARN in vitro y es ampliamente utilizado para la realización de estudios de expresión génica.

Todas las muestras fueron enviadas al laboratorio de Oncología Molecular de la FHGU antes de que transcurrieran 4 horas desde la extracción, a temperatura ambiente para su posterior procesamiento.

3.2.2. Muestra de tejido tumoral.

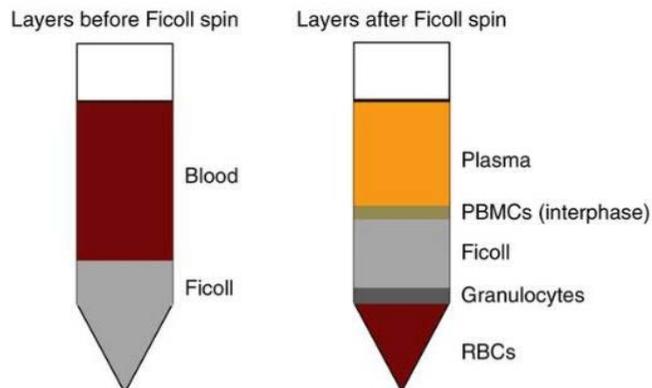
Los excedentes de las muestras de tejido tumoral incluidas en parafinas con diagnóstico histopatológico confirmado de cáncer de colon fueron solicitadas al servicio de Anatomía Patológica para su caracterización molecular y la realización de pruebas de IH adicionales.

3.3. Aislamiento de CTCs a partir de sangre periférica.

El aislamiento de CTCs en las muestras de sangre periférica recogidas con EDTA debe realizarse dentro de las 4-5 horas de extracción, para ello primero es necesario un primer paso de selección de células mononucleares.

a. Selección de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) mediante el uso de la técnica de centrifugación por gradiente de densidad en Ficoll Hypaque. Para ello, la muestra homogeneizada se dispensa sobre una capa de Ficoll de 10 ml en un tubo Falcon de 25 ml. Durante la centrifugación realizada a 400 g durante 20 minutos a temperatura ambiente, se van formando varias capas según el gradiente de densidad. Según se muestra en la **figura 8**, la capa fina y opalescente que se forma en la interfase entre el Ficoll y el plasma es la que corresponde a las CMSP y es la que se recoge para continuar con el aislamiento de CTCs.

Figura 8: Técnica Ficoll Hypaque para la obtención de CMSP.



PBMCs: siglas en inglés de CMSP; RBCs: siglas en inglés de “red blood cells” (eritrocitos).

b . Selección positiva de las células epiteliales sobre las CMSP: Se incubaron las CMSP con bolas inmunomagnéticas conjugadas con anticuerpos epiteliales (Dynabeads® Epithelial Enrich, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la separación magnética utilizando columnas de separación y el separador magnético DynaMag™-2 (Invitrogen). Las determinaciones de expresión génica se realizaron sobre las células seleccionadas. Dicha fracción celular fue inmediatamente conservada en criotubos a -80º C hasta el momento de su utilización.

Las muestras almacenadas en tubos PAXgene no precisaron procesamiento previo a la extracción de ARN.

3.4. Extracción de ARN.

Se realizó tanto sobre la fracción enriquecida de CTCs como sobre la muestra de sangre periférica conservada en los tubos Paxgene™, mediante el uso de columnas de afinidad (RNAeasy® micro Kit, Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

El procedimiento básico de la tecnología RNAeasy® es el siguiente: se añade a la muestra a analizar un tampón de lisis para crear las condiciones óptimas para la unión de ARN a la membrana de Rneasy MinElute. Posteriormente se añade la muestra a la columna. El ARN se une a la membrana de sílice que se encuentra en el interior de la columna. Las posibles trazas de ADN presentes en la muestra se degradan mediante el tratamiento con DNAsas presentes en la columna. Tras un par de lavados, el ARN total se eluye en agua libre de RNAsas.

La cuantificación de ARNm obtenido en cada muestra se realizó mediante nanoespectrofotometría (*NanoDrop 2000C, Thermo Fisher Scientific*).

3.5. Estudio de expresión génica por RTqPCR.

A partir del ARN extraído de las muestras sanguíneas se realizó la reacción de retrotranscripción para la síntesis del ADN complementario de cadena simple (ADNc). La reacción se realizó a partir de 20 ng de ARN procedente de las CTCs y de 180ng de ARN procedente de los tubos PAXgene™, utilizando el Kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems) y un termociclador Mastercycler (Eppendorf), según las instrucciones del fabricante. Las condiciones para el termociclador se detallan en la **tabla 1**.

Tabla 1: Programa de tiempos y temperaturas utilizados en la Transcripción reversa.

Pasos	Duración	Temperatura
1	10 minutos	25 °C
2	2 horas	37 °C
3	5 segundos	85 °C
4	∞	4 °C

El ADNc proveniente de las CTCs se sometió a una preamplificación para aumentar la cantidad de ADNc de partida. La cuantificación de los transcritos de los genes a analizar se llevó a cabo mediante la reacción de PCR cuantitativa en tiempo real

(RTqPCR) usando sondas de hidrólisis específicas marcadas con el fluorocromo 6-carboxiluoresceína (FAM). Para la detección de fluorescencia se emplearon sistemas de fluorescencia Taqman® MGB (*Applied Biosystems*).

Los niveles de expresión génica se determinaron mediante el uso de ensayos TaqMan® Gene Expression Assay (*Applied Biosystems*) correspondientes a los genes a analizar (**tabla 2**). Como gen de control endógeno (en inglés “housekeeping”) se analizó la expresión del gen *CDKN1B*.

Tabla 2: Ensayos TaqMan® empleados en la RTqPCR.

Gen	Tamaño del amplicón (pb)	Código del ensayo
<i>KRT19</i>	116	Hs00761767_s1
<i>CEA</i>	65	Hs00926316_m1
<i>CDKN1B</i>	71	Hs00153277_m1

Para calcular la eficiencia de la reacción de RTqPCR, se realizó una curva de diluciones seriadas (50 ng/μl, 5 ng/μl, 0,5 ng/μl y 0.005 ng/μl) a partir de un ADNc de referencia (qPCR Human Reference cDNA random-primed, Clontech) para cada reacción de amplificación. Aplicando la siguiente relación, $E = (10^{-1/\text{pendiente}})$, obtuvimos directamente el valor de la eficiencia de amplificación para cada reacción para comprobarlo. En todos los casos obtuvimos un valor cercano a 2 por lo que asumimos dicho valor como valor de eficiencia.

Para la cuantificación de la expresión génica relativa se usó el método matemático desarrollado por Michael W. Pfaffl (**figura 9**), (86). Este método se basa en la cuantificación relativa de la expresión del gen problema en la muestra a analizar respecto a la expresión del ADNc de referencia. Así mismo, los valores se normalizaron calculando un ratio entre el gen problema en comparación con un gen endógeno (en este caso *CDKN1B*).

Figura 9: Fórmula matemática utilizada en el modelo de Pfaffl.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP target (control - sample)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP ref (control - sample)}}$$

La unidad de expresión génica utilizada para la expresión ΔCP es $d\text{Ct}$ según la fórmula detallada previamente.

3.6. Análisis de expresión de las proteínas del Sistema de Reparación MMR (MLH1 y MSH2).

A partir de la muestra de tejido tumoral embebida en formol e incluida en parafina se analizó la expresión por IHC de las proteínas del sistema de reparación de ADN MMR (*mismatch repair*): MLH 1 y MSH 2. Para ello se utilizaron los anticuerpos monoclonales de ratón FLEX de DAKO® (“MutL Protein Homolog 1” y “MutL Protein Homolog 2”). La pérdida de expresión fue definida como la ausencia de tinción nuclear en las células tumorales y la presencia de tinción en las células colónicas

epiteliales normales. La expresión de cada una de las proteínas se clasifica como presencia de expresión (MLH 1 +, MSH 2 +) vs ausencia de expresión (MLH 1 -, MSH 2 -). La pérdida de expresión de alguna de las dos proteínas indica una deficiencia en el sistema de reparación MMR (dMMR) y la presencia de expresión de ambas proteínas indica un sistema competente (cMMR).

3.7. Análisis del estado mutacional de los genes de la familia RAS (KRAS y NRAS) y del gen BRAF.

- Extracción y cuantificación del ADN.

Para la extracción de ADN a partir de tejido tumoral embebido en parafina (FFPE) se utilizaron 5-10 cortes de 5 µm obtenidos con micrótopo, que se almacenaron en un microtubo de 1.5 ml. A continuación se desparafinaron las muestras con 600 µl de aceite mineral, seguido de 1 ml de xileno. Posteriormente se realizó un lavado con 1 ml de etanol 100% para quitar los restos de xileno. El último paso del desparafinado consistió en dejar secar las muestras a 37° C durante 20 minutos para eliminar los restos del etanol.

La extracción del ADN se hizo mediante un kit basado en columnas de afinidad diseñado para muestras FFPE (QIAamp DNA FFPE Tissue, Qiagen). Con el fin de estandarizar el proceso de extracción, se utilizó un sistema automatizado (QIACUBE, Qiagen), compatible con el kit, utilizando el tejido previamente desparafinado y siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez obtenido el ADN se procedió a su cuantificación y se almacenó a -20° C hasta su utilización.

La cuantificación del ADN se realizó por nanoespectrofotometría mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) que permite la medición en volúmenes pequeños de muestra (0.5 μ L- 2.0 μ L). Este equipo mide la densidad óptica (D.O.) de las muestras en el espectro 230-290 nm, calculando la concentración de ADN a partir de la D.O. a 260 nm (usando un coeficiente de extinción molar para ADN de 50). También calcula los ratios D.O. 260nm/280nm y D.O.260nm/230nm, que son indicadores de contaminación por proteínas, o reactivos usados durante el proceso de extracción, respectivamente.

- Análisis del estado mutacional del gen KRAS.

En primer lugar se realizó el análisis de las mutaciones del gen *KRAS* localizadas en los codones 12 y 13 del exón 2. Posteriormente se realizaron las determinaciones de la extensión de *RAS* (*KRAS* exón 3 y 4, *NRAS* exones 2, 3 y 4).

Para el análisis mutacional del gen *KRAS* exón 2 se utilizó un kit comercial, *TheraScreen*[®] *KRAS mutation Kit* (DXS Roche) que detecta siete mutaciones localizadas en los codones 12 y 13 (**tabla 3**) mediante PCR a tiempo real que combina tecnologías ARMS y Scorpions, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3: Mutaciones del gen *KRAS* detectadas.

Mutación	Cambio de Base
Gly12Ala	(GGT>GCT)
Gly12Asp	(GGT>GAT)
Gly12Arg	(GGT>CGT)
Gly12Cys	(GGT>TGT)
Gly12Ser	(GGT>AGT)
Gly12Val	(GGT>GTT)
Gly13Asp	(GGC>GAC)

Brevemente, el kit consta de 8 mezclas de reacción diferentes, la primera mezcla es el ensayo control que amplifica una región del exón 4 del gen *KRAS* libre de polimorfismos y se usa para valorar el ADN total de una muestra. Las 7 restantes son los ensayos de mutación (uno por cada mutación). El volumen final de reacción fue 25 μ l, de los cuales 19.8 μ l correspondían a la mezcla de reacción (conteniendo: cebadores, sondas, dNTPs, buffer de reacción son Cl_2Mg), 0.2 μ l a Taq Polimerasa y 5 μ l a la muestra a una concentración de 40ng/ μ l. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 4 minutos a 95 $^\circ$ C y 45 ciclos de 30 segundos 95 $^\circ$ C/1 minuto 60 $^\circ$ C, realizadas en un termociclador LightCycler 480 II (Roche).

La cuantificación en los ensayos en tiempo real utilizan el número de ciclos de PCR necesarios para detectar una señal de fluorescencia superior a la señal de referencia como medida de las moléculas diana presentes al comienzo de la reacción. El punto en

el que se detecta una señal superior a la lectura de fluorescencia de referencia se denomina “ciclo umbral” o ciclo de cuantificación (Cq) (87) y es el que se utiliza para realizar los cálculos.

El análisis del estado mutacional de cada muestra se realiza calculando los valores de Δcq de las muestras, siendo el Δcq la diferencia entre el valor de Cq de cada ensayo de mutación (denominado “ciclo umbral” o “ciclo de cuantificación” (Cq) (87) y el valor de Cq del ensayo control de una misma muestra. Las muestras se clasifican como positivas para una mutación si su valor de Δcq es inferior al valor de corte de Δcq (**tabla 4**), que es diferente para cada mutación. Por encima de este valor se considera que la muestra es negativa para la mutación.

Tabla 4: Valores de corte del Δcq para cada mutación del gen *KRAS*, codones 12 y 13 analizada.

Ensayo	Δcq
Gly12Ala	6.25
Gly12Asp	7.72
Gly12Arg	6.83
Gly12Cys	6.95
Gly12Ser	8.95
Gly12Val	6.5
Gly13Asp	9.09

Para el análisis del resto de mutaciones del gen *KRAS* localizadas en los exones 3 (codones 59, 61) y 4 (codones 117 y 146) y del gen *NRAS* localizadas en los exones 2 (codones 12 y 13), 3

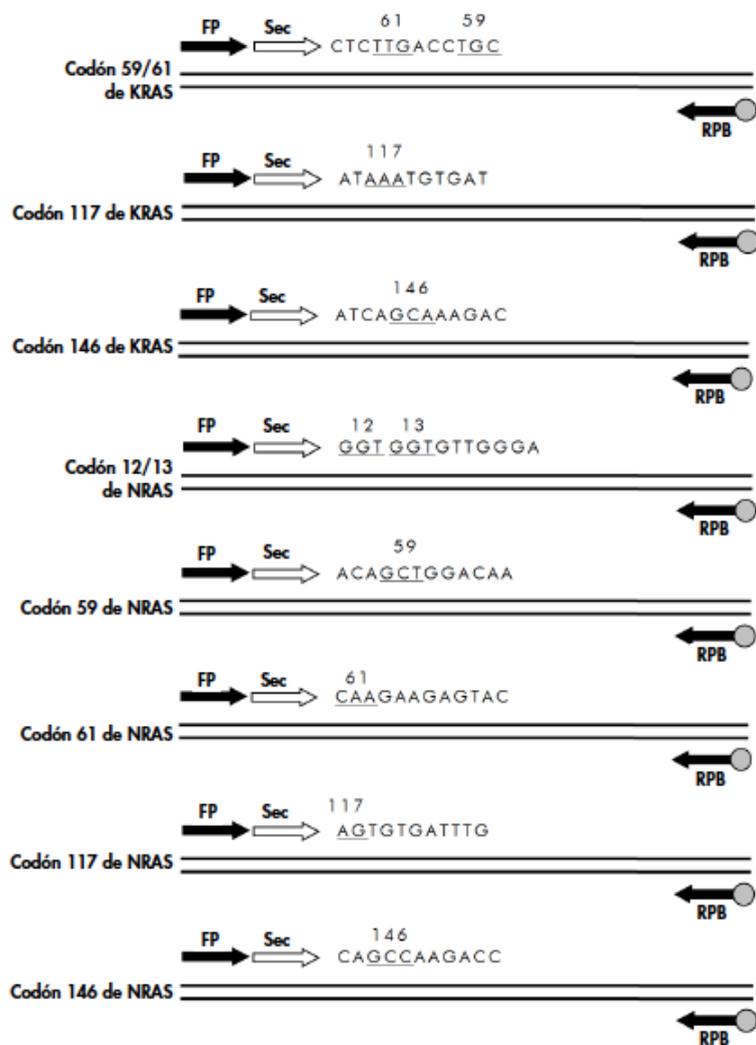
(codones 59, 61) y 4 (codones 117 y 146) se utilizó el kit comercial de pirosecuenciación, *TheraScreen® RAS Extension Pyro®* (Qiagen; **Figura 10**), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las 8 regiones a analizar se amplificaron por separado mediante PCR usando cebadores unidos a biotina. Los amplicones generados se inmovilizaron con microesferas de Streptavidin Sepharose® High Performance y ,posteriormente, se incubaron con los primers de secuenciación correspondientes. Una vez hecho esto, la secuenciación se llevo a cabo en el sistema PyroMark Q24 utilizando siempre los controles pertinentes Los análisis se realizaron mediante el software PyroMark Q24 2. 0. 7.

- Análisis del estado mutacional del gen BRAF.

Para el análisis del estado mutacional del gen *BRAF* se utilizó el Kit comercial de amplificación OncoGenBasic-S1 Ref. 0B-S1 (Seqplexing Genetest) y el sistema de secuenciación GS Junior (Roche) que permite detectar mutaciones del oncogen *BRAF* en el exón 15 (codones 581-620), según las instrucciones del fabricante.

La sensibilidad de este procedimiento en muestras de parafina permite detectar las mutaciones presentes en menos de un 1% de las copias del ADN de una muestra. En cuanto a la interpretación de los resultados se considera negativo cuando las mutaciones están presentes en menos del 1% de las copias de ADN y positivo en más del 2,5% de las copias. En los casos en los que se obtuvo un porcentaje inferior al 2.5% se repitió la reacción dándose el resultado por positivo al mantenerse la identificación de la mutación.

Figura 10: Ensayos del kit Therascreen *RAS* Extension Pyro.



3.8. Análisis estadístico de los datos.

Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico versión 18.0 (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.).

En primer lugar se realizó el análisis descriptivo de las distintas variables incluidas en el estudio. Para ello se realizó el cálculo de frecuencias absolutas y relativas (representadas gráficamente con diagramas de barras). Las variables cuantitativas continuas se describieron mediante el cálculo de la media, la mediana, la desviación estándar y los valores mínimo y máximo, siendo el diagrama de cajas y bigotes el figura más utilizado.

El test de kolmogorov-Smirnoff fue utilizado para valorar la normalidad de la muestra, comprobándose que la distribución de los niveles de expresión de ARN en sangre periférica de los genes incluidos en el estudio no era normal. Por ello, se aplicó al estudio de dichas variables pruebas estadísticas de tipo no paramétricas. Para la comparación de grupos independientes se emplearon: la prueba de Mann-Whitney para dos grupos y la prueba de Kruskall-Wallis para más de dos grupos. La prueba de suma de rangos de diferencias por pares de Wilcoxon se utilizó para la comparación de las variables dependientes (nivel de expresión de ARN de cada gen antes y después de la cirugía).

A la hora de analizar las relaciones de dependencia o independencia entre variables cualitativas de carácter bidimensional se utilizaron las tablas de contingencia y los estadísticos Chi-cuadrado y Odds Ratio. El test exacto de Fisher fue el estadístico utilizado cuando en más del 20% de las celdas había menos de 5 casos y el test de Cramer el estadístico

empleado cuando una variable tenía más de 2 categorías. Las variables continuas, como los niveles de expresión de ARN se transformaron previamente en variables categóricas.

Se realizó un seguimiento de todos los pacientes incluidos en el estudio desde el momento de la inclusión. El punto de corte temporal para el análisis de los resultados del presente estudio fue febrero de 2016. Durante el periodo de seguimiento se registraron las siguientes variables: recaída tumoral, localización anatómica de la recaída tumoral, cirugía de dicha recaída, administración de QT posteriormente a la recaída, aparición de un segundo tumor primario en cualquier localización, éxitus, SLE definida como el intervalo temporal entre la fecha de recaída (o fecha de último seguimiento en los pacientes que no presentaron recaída) y la fecha de la intervención quirúrgica y, por último, SG definida como el intervalo temporal entre la fecha del éxitus (o fecha del último seguimiento en los pacientes que no habían fallecido en ese momento) y la fecha de la intervención.

Los análisis de supervivencia se realizaron mediante el uso del método de Kaplan-Meier y el estadístico log-rango. La SLE en meses se calculó teniendo en cuenta la fecha de la cirugía hasta la fecha de la recidiva tumoral o el último seguimiento del paciente mediante la siguiente fórmula: $12 \times (\text{Fecha Fin} - \text{Fecha inicio}) / 365,25$. El análisis multivariante para valorar los factores pronósticos independientes se realizó utilizando el método de regresión de Cox. Para ello se incluyeron todas las variables que fueron significativas en el análisis univariante y aquellas en las que el p valor estaba cercano a la significación estadística.

El nivel de significación empleado en todos los análisis fue el habitual del 5% ($\alpha = 0,05$). Cualquier valor de probabilidad inferior a 0,05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa.

3.8.1. Cálculo de la muestra.

Para detectar una diferencia en la tasa de supervivencia (SLE) a los 3 años entre los pacientes según los valores pronósticos analizados; y asumiendo un error tipo alfa de 0.05 y una potencia estadística del 70%, se estima necesaria una muestra de 106 pacientes para cumplir los objetivos del estudio (88).

4. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL.

4.1. Estudio descriptivo de las características demográficas, clínicas y patológicas de la población a estudio.

4.1.1. Grupo control.

Se incluyeron 32 voluntarios, clasificados en 2 grupos: **Grupo control 1** (detección de un pólipo adenomatoso en la colonoscopia) y **Grupo control 2** (sin hallazgos patológicos en la colonoscopia). Las características demográficas y analíticas se resumen en la **tabla 5**.

Tabla 5: Características demográficas y analíticas del grupo control.

	Grupo control 1		Grupo control 2	
Total	N	%	N	%
	12	100%	20	100%
Edad (años)				
≤ 65	6	50%	11	55%
> 65	6	50%	9	45%
Sexo				
Hombre	6	50%	9	45%
Mujer	6	50%	11	55%
Consumo de tabaco				
No fumador	6	50%	11	55%
Ex - fumador	4	33%	7	35%
Fumador activo	2	17%	2	10%
CEA (ng/ml)				
≤ 4	11	91,6%	20	100%
> 4	0	0%	0	0%
CA 19.9 (UI/ml)				
≤ 40	11	91,6%	20	100%
> 40	0	0%	0	0%

4.1.2. Pacientes intervenidos de CCR (casos).

- Características demográficas y antecedentes personales.

Se incluyeron 105 pacientes intervenidos de CCR estadios I-III con una mediana de edad de 67 años (rango 39 – 90). El 65% eran hombres. 4 pacientes (4%) tenían un diagnóstico previo de enfermedad inflamatoria intestinal (EII), (2 Colitis Ulcerosa y 2 Enfermedad de Crohn). La gran mayoría eran no fumadores o ex-fumadores (91,5%) y no consumían alcohol diariamente (86,7%). En la **tabla 6** se detallan las principales características demográficas de los pacientes.

Tabla 6: Características demográficas de los pacientes.

Total	N = 105	% = 100
Edad (años)		
≤ 65	39	37%
> 65	66	63%
Sexo		
Hombre	68	64,8%
Mujer	37	35,2%
Consumo de tabaco		
No fumador	51	48,6%
Ex - fumador	45	42,9%
Fumador activo	9	8,6%
Consumo de alcohol		
No consumidor	90	85,7%
Ex - consumidor	1	1%
Consumidor diario	14	13,3%

- Características clínicas y patológicas.

El principal motivo de consulta fue el sangrado (69,5%) y en el 30,5% de los casos (n = 32) se inició el estudio tras un resultado positivo en el TSOH. La distribución de la localización del tumor primario fue: colon ascendente 39 casos (37,1%); colon transverso 9 casos (8,6%); colon descendente 37 casos (35,2%) y recto 19 casos (18,1%). De forma simplificada se agruparon las distintas localizaciones en dos categorías: colon derecho (incluye colon ascendente y colon transverso) y colon izquierdo (incluye colon descendente y recto). En un paciente se diagnosticaron dos tumores de forma sincrónica, uno en cada localización.

En el análisis sanguíneo realizado al diagnóstico se observó que el 41% de los pacientes presentaba anemia al diagnóstico según la clasificación de la OMS (89). En cuanto a los marcadores tumorales, el 33% y el 11,4% de los pacientes tenía un valor elevado de CEA (CEA > 4 mg/ml) y de CA 19.9 (> 40 UI/ml), respectivamente.

Todos los pacientes fueron intervenidos de forma programada. En el 64% de los casos la cirugía fue por vía laparoscópica o endoscópica (microcirugía endoscópica transanal, en inglés "TEM") y en el 36% mediante laparotomía abierta. El 26% de los pacientes (n = 27) presentaron alguna complicación quirúrgica.

Tras la cirugía se llevó a cabo el estudio anatómo-patológico de la pieza quirúrgica. La distribución de los casos según la clasificación TNM (7ª edición) fue la siguiente (**tabla 7**):

- Tumor primario (T): T1 12 casos (11,4%), T2 22 casos (21%), T3 58 casos (55,2%), T4a 7 casos (6,7%) y T4b 6 casos (5,7%).
- Nódulos linfáticos regionales (N): Nx 2 casos (1,9%), N0 78 casos (74,3%), N1a 4 casos (3,8%), N1b 10 casos (9,5%), N2a casos 7 (6,7%) y N2b 4 casos (3,8%).
- Estadio tumoral: estadio I 31 casos (29,5%), estadio IIA 39 casos (37,1%), estadio IIB 5 casos (4,8%), estadio IIC 5 casos (4,8%), estadio IIIA 2 casos (1,9%), estadio IIIB 18 casos (17,1%) y estadio IIIC 5 casos (4,8%).

Tabla 7: Clasificación TNM de los pacientes.

Total	N = 105	% = 100
T		
T1	12	11,4%
T2	22	21%
T3	58	55,2%
T4	13	12,4%
N		
N0	78	74,3%
N1	14	13,3%
N2	11	10,5%
ESTADIO TUMORAL		
I	31	29,5%
II	49	46,7%
III	25	23,8%

En todos los casos la histología tumoral fue Adenocarcinoma. La distribución según el grado histológico fue: bajo grado 90 casos (85,7%) y alto grado 13 casos (12,4%). El 22,9% (n = 24) de las piezas quirúrgicas analizadas presentaban invasión linfática, el 2,9% (n = 3) invasión venosa, el 13,3% (n = 14) invasión perineural, el 11,4% (n = 12) perforación o abscesificación tumoral y el 1,9% afectación microscópica del margen de resección (R1). La media de número de nódulos linfáticos regionales evaluados fue 13,15 y la mediana 12, con un rango entre 0 y 32.

El 36,2% de los pacientes (n = 38) recibieron QT adyuvante. Al analizarlo por estadio tumoral, la recibió el 36,7% de los pacientes con estadio II (n = 18), el 80% con estadio III (n = 20) y ningún paciente con estadio I. Los esquemas de QT administrados fueron: capecitabina en monoterapia en 12 casos y un esquema basado en oxaliplatino en 6 en el estadio II; 2 y 18 casos respectivamente en el estadio III.

Durante el periodo de observación, 19 pacientes (18,1%) presentaron una recidiva tumoral, de los cuales 8 fueron éxitus. El número total de éxitus durante el estudio fue 11 (10,5%). En 4 pacientes se diagnosticó un segundo tumor primario en otra localización (no colorrectal). Las localizaciones más frecuentes de las recidivas tumorales fueron: pulmón (n = 6), hígado (n = 2), local (n = 2) y afectación de 2 o más órganos (n = 6). En 6 casos se pudo realizar resección quirúrgica de la recidiva (3 cirugías pulmonares, 1 local, 1 hepática y 1 de los dos órganos afectados). En la **tabla 8** se detallan las características clínicas de los pacientes.

Tabla 8: Características clínicas de los pacientes.

Total	N = 105	% = 100%
Motivo de consulta		
Sangrado	73	69,5%
Alteración ritmo intestinal	15	14,3%
Dolor abdominal	12	11,4%
Otros	5	4,8%
Localización tumor primario		
Colon derecho	48	45,7%
Colon izquierdo	56	53,3%
Hb (g/dl)*		
No anemia: ≥ 12	62	59%
Anemia leve: $\leq 11,9 - \geq 10$	20	19,1%
Anemia moderada: $\leq 9,99 - \geq 8$	18	17,1%
Anemia severa: < 8	5	4,8%
CEA (ng/ml)		
≤ 4	66	62,9%
> 4	35	33,3%
Valores perdidos	4	3,8%
CA 19.9 (UI/ml)		
≤ 40	89	84,8%
> 40	12	11,4%
Valores perdidos	4	3,8%

Total	N = 105	% = 100%
Tipo de resección quirúrgica		
Hemicolectomía derecha	41	39%
Hemicolectomía derecha ampliada	8	7,6%
Sigmoidectomía	29	27,6%
Resección anterior de recto	18	17,1%
Resección endoscópica/TEM	5	4,8%
Colectomía subtotal o total	4	3,8%
Tipo de cirugía		
Cirugía abierta	38	36,2%
Cirugía laparoscópica	62	59%
Resección endoscópica/TEM	5	4,8%
Complicación quirúrgica		
No	78	74,3%
Sí	27	25,7%

*.Definición de anemia según la OMS ((Blanc B. et al, 1968).

4.2. Biopsia líquida: análisis de expresión de ARNm en sangre periférica y en CTCs.

Dos de los objetivos específicos del estudio son analizar el papel diagnóstico y pronóstico de la determinación de ARNm de los genes *KRT19* y *CEA*, basándonos en la suposición de que es una metodología más precisa que el análisis del producto proteico final derivado de su transcripción génica (los antígenos tumorales CEA y CA 19.9). Dicha determinación se llevó a cabo por un lado, directamente sobre la muestra de sangre periférica (preservada en tubos PAXgene™) y, por otro, sobre una selección positiva de

células epiteliales obtenidas de células mononucleares extraídas previamente de la muestra sanguínea (selección de CTCs), suponiendo también que esta última es más precisa.

4.2.1. Estudio descriptivo de los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes *KRT19* y *CEA* en los pacientes antes de la cirugía y en los controles.

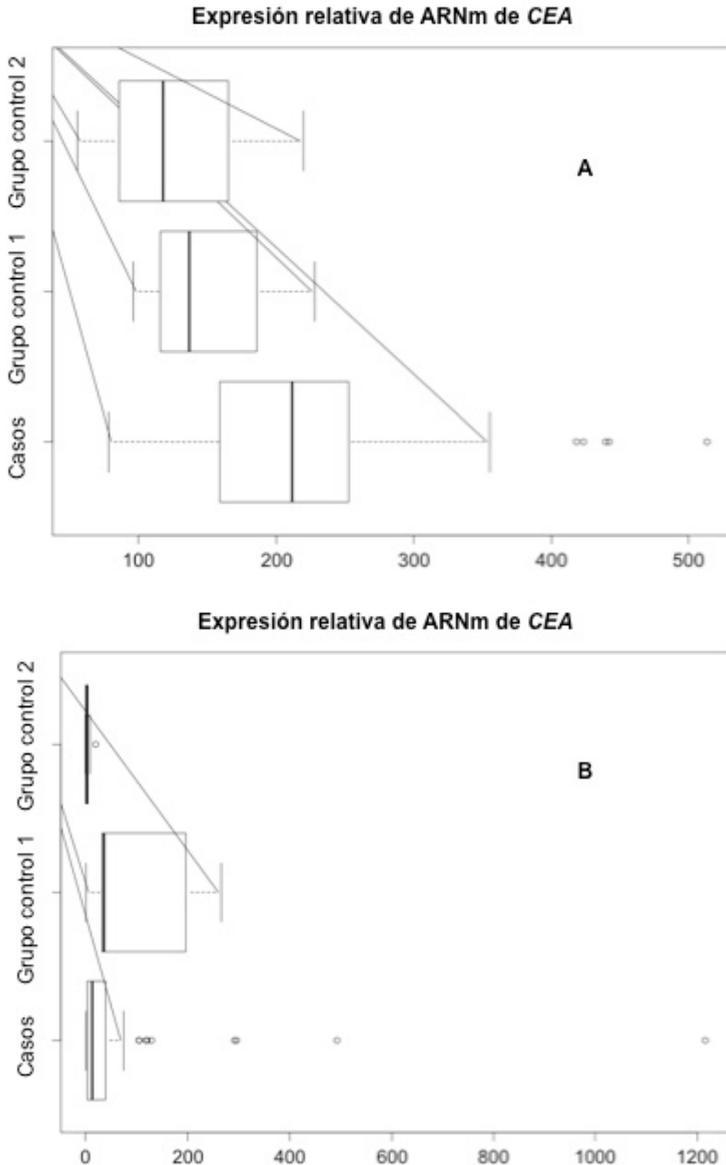
Se realizó la determinación de ARNm de *CEA* y *KRT19* en las muestras de biopsia líquida obtenidas preoperatoriamene en los casos de CCR y en los controles. No se obtuvo ningún resultado válido en el análisis de ARNm de *KRT19* en las muestras con selección previa de CTCs en ningún grupo. En la **tabla 9** se describen los resultados del análisis de expresión relativa del ARNm de *CEA* en sangre periférica y en CTCs y de *KRT19* en sangre periférica en los casos y controles (representados en la **figura 11** mediante diagramas de caja y bigotes).

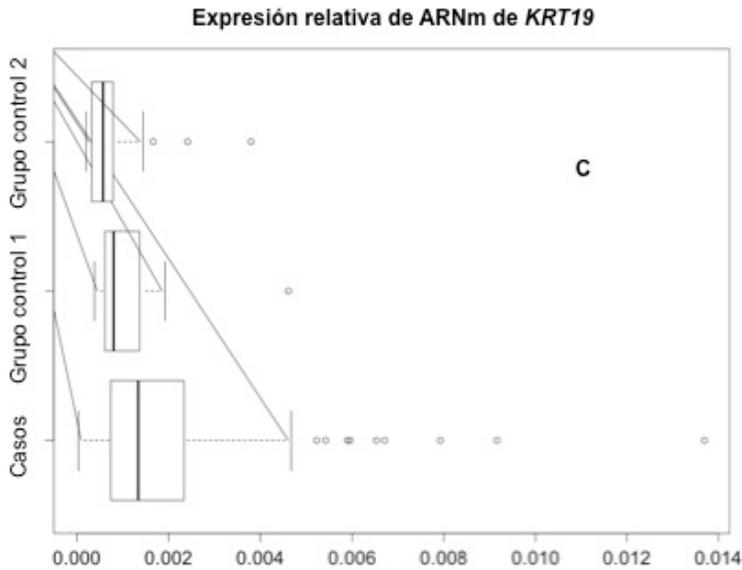
Tabla 9: Análisis descriptivo del ARNm de CEA y KRT19 en casos y controles.

	Casos CCR (n = 105)	Grupo control 1: Pólipos adenomatosos (n = 12)	Grupo control 2: voluntarios sanos (n = 20)
<i>Expresión relativa de ARNm de CEA en muestras de sangre periférica</i>			
n válidos	87	7	20
Mediana	211,30	137,00	117,70
IC(mediana)_{95%}	190,50-225,17	97,83-219,69	99,27-149,65
Media	215,00	152,00	125,80
Desv. Típica	87,65	53,11	50,07
<i>Expresión relativa de ARNm de CEA en muestras de CTCs</i>			
n válidos	73	7	19
Mediana	12,61	36,92	1,74
IC(mediana)_{95%}	12,47-28,98	17,72- 258,32	1,08-4,39
Media	54,09	108,60	3,45
Desv. Típica	157,5663	112,7472	4,824262
<i>Expresión relativa de ARNm de KRT19 en muestras sin selección de CTCs</i>			
n válidos	87	7	20
Mediana	0,0013	0,0007	0,0005
IC(mediana)_{95%}	0,0012- 0,0018	0,0005-0,0027	0,0004-0,0010
Media	0,0019	0,0013	0,0008
Desv. Típica	0,0022	0,0014	0,0008

Figura 11: Representación gráfica de la expresión relativa de ARNm de *CEA* y *KRT19* en casos y controles.

A: Expresión relativa de ARNm de *CEA* en sangre periférica; B: Expresión relativa de ARNm de *CEA* en CTCs; C: Expresión relativa de ARNm de *KRT19* en sangre periférica.





4.2.2. Valor diagnóstico en el CCR del análisis de ARNm en sangre periférica y CTCs de ambos genes (*CEA* y *KRT19*).

En el estudio nos propusimos analizar el papel de la detección de ARNm de los genes *KRT19* y *CEA* en sangre periférica como método diagnóstico, en muestras con y sin selección previa de CTCs. Para comparar los niveles de expresión relativa del ARNm de ambos genes entre los casos de CCR y los controles se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney, ya que las muestras comparadas no tenían una distribución normal.

Los resultados mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión de ARNm de *CEA* en sangre periférica, entre los casos y cada uno de los dos grupos control (**tabla 10**). Al analizar dichos niveles del gen en las muestras de CTCs, también se observaron diferencias significativas entre los casos y el grupo control 2 (voluntarios sanos), (estimación mediana de la diferencia =

8,746786, IC 95% [3,3519-20,2020]; $p < 0,001$). La diferencia observada entre los casos y el grupo control 1 (pólipos adenomatosos) no alcanzó la significación estadística (estimación mediana de la diferencia = $-29,86035$, IC 95% $[-134,086889-1,247029]$; $p = 0,07338$). Por último, también se documentaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de ARNm de *KRT19* en sangre periférica entre los casos y el grupo control 2 (estimación mediana de la diferencia = $0,00062688450$, IC 95% $[0,0002349079-0,0011611450]$; $p = 0,001906$), no siendo así entre los casos y el grupo control 1 (estimación mediana de la diferencia = $0,000346648$, IC 95% $[-0,000362868-0,001220115]$; $p = 0,3348$).

Tabla 10: Comparación de niveles expresión de ARNm de CEA en sangre sin selección previa de CTCs.

	Casos vs Grupo control 1 (pólipos adenomatosos)	Casos vs Grupo control 2 (voluntarios sanos)
p-valor	0,04523	< 0,0001
Estim. mediana de la diferencia	56,67959	79,07617
IC (mediana de la diferencia) 95%	2,239287 113,450473	48,03277 113,70981

Para determinar el valor de punto de corte para la expresión génica se utilizó el valor 95% del intervalo de confianza de los voluntarios sanos, basándonos en la metodología utilizada en el

estudio realizado por Shen y colaboradores (90). Para cada marcador individual, consideramos el test positivo si la expresión relativa era superior a dicho valor de punto de corte. Para la combinación de marcadores, el test fue positivo si alguno de los marcadores era positivo. En la **tabla 11** se describen los resultados de los tests en los casos y el grupo de voluntarios sanos.

Tabla 11: Resultado de los tests de ARNm de CEA y KRT19 en muestras de sangre con o sin selección previa de CTCs.

	Resultado Test	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
Test ARNm de CEA sin selección previa de CTCs		
Casos CCR	67	20
Grupo control 2	7	13
Test ARNm de KRT19 sin selección previa de CTCs		
Casos CCR	50	37
Grupo control 2	4	16
Test ARNm de CEA con selección previa de CTCs		
Casos CCR	52	21
Grupo control 2	4	15
Test combinado ARNm de CEA y KRT19 sin selección previa de CTCs		
Casos CCR	76	11
Grupo control 2	9	11

La sensibilidad y especificidad de la determinación de ARNm de CEA fue del 77% y del 65% en sangre periférica y del 71% y del 79% en CTCs, y de la determinación de ARNm de KRT19 en sangre periférica fue del 57% y del 80%, respectivamente. Al analizar los

dos marcadores de forma conjunta en las muestras de sangre periférica, la sensibilidad y especificidad del test fue del 87% y del 55%, respectivamente. La sensibilidad como test diagnóstico del ARNm en sangre periférica de ambos genes fue superior a la de los antígenos tumorales CEA y CA 19.9 tanto de forma individual (35% y 12%, respectivamente) como conjunta (37%). En cambio la especificidad fue menor (100% para ambos antígenos tumorales).

Actualmente no se recomienda el uso de los marcadores tumorales CEA y CA 19.9 como método diagnóstico en el CCR debido a la baja sensibilidad y especificidad de su determinación. De hecho, según la literatura solo se observa una elevación del CEA preoperatorio en un tercio de los pacientes diagnosticados de CCR, siendo esta cifra menor en el caso del CA 19.9. A pesar de que más del 90% de los tumores producen el antígeno tumoral CEA, su rápida metabolización en el primer paso hepático se postula como una de las razones por la que su detección en sangre al diagnóstico es tan baja (91-93).

El análisis del ARNm de diferentes genes involucrados en el CCR en sangre, plasma o CTCs, con la intención de identificar nuevos biomarcadores de utilidad en el diagnóstico de CCR ha sido motivo de estudio. En este sentido, la capacidad de detección de ARNm de genes como *CEA*, *CK-20* y *CK-19* en sangre ha sido descrita por varios autores (94-97). A su vez, el uso de la técnica qRT-PCR ha demostrado una alta sensibilidad y utilidad clínica para detectar marcadores tumorales en CTCs (98). En un estudio publicado por Wang y colaboradores con 72 pacientes diagnosticados de CCR y 30 individuos sanos se detectó ARNm

(previamente amplificado mediante el uso de RT-PCR) de *hTERT*, *CK-19*, *CK-20* y *CEA* en el 69,4%, 66,7%, 52,8% y 72,2% de los casos respectivamente. Sin embargo, en los sujetos sanos la expresión de ARNm fue negativa para *hTERT* y *CEA*, y positiva para *CK-19* y *CK-20* solo en el 6% de los casos (99).

Se ha propuesto que el análisis conjunto de múltiples marcadores en sangre puede mejorar la sensibilidad y especificidad de la detección respecto al análisis individual de cada marcador. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Shen y colaboradores en el que se analizaba el ARNm de los marcadores *CK-20*, *CEA* y *survivalina* en 156 pacientes con CCR, 40 voluntarios con enfermedad colorrectal benigna y 40 voluntarios sanos. La sensibilidad del test mejoró significativamente cuando se analizaron los tres marcadores de forma conjunta (60,9%) comparado con la sensibilidad de la detección de *survivalina*, *CK-20* y *CEA* individualmente (57,7%, 47,4% y 39,1%, respectivamente). La especificidad del test de los tres marcadores analizados conjuntamente fue del 76% (90). Otro estudio con un diseño muy similar también observó una mejoría en la sensibilidad de la detección al combinar el análisis de *CEA* y *CK-19* respecto al análisis individual (100). Pese a que los resultados son prometedores, existen varias limitaciones importantes en estos estudios: la falta de un valor de corte establecido, la ausencia de una metodología estandarizada y la variabilidad en cuanto a los marcadores utilizados.

Actualmente el TSOH basado en la detección de hemoglobina por inmunohistoquímica es el método de cribado más ampliamente utilizado. En el estudio español publicado por Parra-Blanco y

colaboradores, la sensibilidad y especificidad obtenida para este test fue del 61% y del 95%, respectivamente (101). Comparado con los datos publicados en la literatura, la sensibilidad como test diagnóstico del análisis de ARNm de *CEA* (tanto en sangre periférica como en CTCs) es alentadora, en cambio la especificidad es baja. Dado que un buen método diagnóstico debe ser sensible y específico, la determinación del ARNm de *CEA* exclusivamente no es útil en este sentido. Sin embargo, su integración en un panel serológico junto con otros marcadores que mejorase la sensibilidad y la especificidad del test podría ser de utilidad como método de cribado en un futuro.

Otro punto a destacar respecto a la biopsia líquida es el valor de la selección de las CTCs mediante el uso de bolas inmunomagnéticas conjugadas con anticuerpos epiteliales, previamente a la determinación del ARNm de los dos genes a estudio. En el caso del gen *KRT19*, no se pudo detectar el ARNm en ninguna de las muestras en las que se realizó la selección previa de CTCs, mientras que sí se pudo analizar en el 83% de las muestras en las que no se realizó esta selección previa. En el caso del gen *CEA*, se pudo analizar el ARNm en un mayor porcentaje de muestras cuando no se realizó la selección previa de CTCs (83% vs 72%). Una de las posibles explicaciones para este fenómeno es que aunque la selección positiva de las células epiteliales permite desechar las células mononucleares que no son células tumorales, también puede repercutir negativamente en la cantidad de ARN tumoral libre que queda en la muestra a analizar.

4.2.3. Estudio descriptivo de los niveles de expresión de ARNm en sangre de los genes *KRT19* y *CEA* en los pacientes intervenidos de CCR antes y después de la cirugía.

Analizamos los niveles de expresión de ARNm de *CEA* y *KRT19* en las muestras de sangre de los 105 pacientes intervenidos de CCR, obtenidas antes y después de la cirugía (análisis de muestras pareadas). Al igual que en el punto anterior, se realizó dicha determinación en sangre periférica y en las muestras de CTCs. De los 105 casos analizados, se pudo detectar ARNm de ambos genes en sangre periférica en 87 casos (83% del total de pacientes incluidos), tanto en el análisis realizado pre como post cirugía. En las muestras de CTCs se detectó ARNm de *CEA* en 73 casos (69% del total) y no se detectó ARNm de *KRT19* en ningún caso. En la **tabla 12** se describen los resultados obtenidos en las muestras prequirúrgicas y postquirúrgicas.

Tabla 12: Niveles expresión relativa de ARNm de *CEA* y *KRT19* en muestras de sangre pre y postquirúrgicas de los casos de CCR.

	ARNm <i>CEA</i> ¹ n = 105	ARNm <i>CEA</i> ² n = 105	ARNm <i>CK-19</i> ¹ n = 105
Muestras prequirúrgicas			
n válidos	87	73	87
Mediana	211,30	12,61	$1,34 \times 10^{-3}$
IC (mediana) 95%	190,50 - 225,17	12,47 - 28,98	$1,22 \times 10^{-3} - 1,85 \times 10^{-3}$
Muestras postquirúrgicas			
Mediana	210,10	12,63	$1,23 \times 10^{-3}$
IC (mediana) 95%	193,82 - 232,82	13,22 - 41,57	$1,22 \times 10^{-3} - 2,06 \times 10^{-3}$

¹ sangre periférica; ² CTCs.

Para llevar a cabo la comparación de los niveles de expresión de ARNm antes y después de la cirugía se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon de suma de rangos de diferencias por pares, como test estadístico. No se observaron diferencias significativas en la expresión de ARNm de *CEA* ni en las muestras de sangre periférica ($p = 0.2773$) ni en las muestras de CTCs ($p = 0,7645$). Tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de ARNm de *KRT19* en sangre periférica ($p = 0,741$).

4.2.4. Correlación de los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes *KRT19* y *CEA* antes y después de la cirugía con las principales características clínico-patológicas y análisis de su valor pronóstico.

Analizamos la posible asociación entre los niveles de expresión de ARNm de los genes *CEA* y *KRT19* en las muestras prequirúrgicas y postquirúrgicas, con las características clínico-patológicas recogidas. Para ello, se dicotomizaron los niveles de expresión de ARNm en 2 grupos, utilizando la mediana como punto de corte: niveles bajos de expresión (\leq mediana) y niveles altos de expresión ($>$ mediana). No se observó ninguna asociación significativa con las características analizadas (**tabla 13**). Algunos autores han sugerido un mayor nivel de expresión de ARNm en estadios tumorales avanzados, bien con 1 sólo marcador como el *CEA* (99) o con la combinación de varios marcadores como *CEA* y *CK-20* (100), resultado que no ha sido corroborado en nuestro estudio.

Tabla 13: Relación entre los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes *CEA* y *KRT19* (tanto prequirúrgicos como postquirúrgicos), y las principales características clínico-patológicas y moleculares.

<i>Característica Clínico- patológica</i>	ARNm <i>CEA</i> (SP)		ARNm <i>KRT19</i>		ARNm <i>CEA</i> (CTCs)	
	PreQx <i>p valor</i>	PostQx <i>p valor</i>	PreQx <i>p valor</i>	PostQx <i>p valor</i>	PreQx <i>p valor</i>	PostQx <i>p valor</i>
Sexo	0,230	0,452	0,299	0,13	0,404	0,412
Edad	0,455	0,891	0,891	0,235	0,188	0,321
Tabaco	0,184	0,109	0,241	0,474	0,711	0,577
Localización tumoral	0,199	0,517	0,829	0,517	0,814	0,814
Estado <i>Kras</i>	0,896	0,149	0,315	0,570	0,926	0,321
Estado <i>Nras</i>	0,570	0,570	0,570	0,241	0,572	0,572
Estado <i>Braf</i>	0,275	0,698	0,275	0,698	0,963	0,711
Expresión MLH 1	0,121	0,344	0,798	0,145	0,085	0,467
Expresión MSH 2	0,402	0,382	0,664	0,202	0,174	0,972
T	0,944	0,083	0,126	0,234	0,902	0,333
N	0,033	0,078	0,304	0,304	0,136	0,051
Estadio tumoral	0,615	0,421	0,909	0,460	0,527	0,302
Grado histológico	0,810	0,810	0,344	0,810	0,414	0,674
IL	0,337	0,141	0,281	0,953	0,727	0,213
IV	0,157	0,157	0,157	0,241	0,307	0,984
IP	0,969	0,526	0,477	0,167	0,266	0,306
Perforación tumoral	0,072	0,698	0,072	0,698	0,375	0,025

SP (sangre periférica); PreQx (prequirúrgico); PostQx (postquirúrgico).

El análisis de supervivencia reveló que no existía una asociación significativa entre la SLE y los niveles de expresión de ARNm de ninguno de los genes analizados tanto prequirúrgicos como postquirúrgicos (tablas 14 y 15) .

Tabla 14: Análisis de supervivencia de niveles de expresión relativa de ARNm de los genes *CEA* y *KRT19* en sangre previo a la cirugía.

Variable	Media SLE (meses)	P valor
Gen <i>KRT19</i> (SP)		0,622
Nivel bajo de expresión	43,213 (IC 38,985-47,442)	
Nivel alto de expresión	34,781 (IC 39,879-47,682)	
Gen <i>CEA</i> (SP)		0,533
Nivel bajo de expresión	42,829 (IC 38,402-47,257)	
Nivel alto de expresión	43,090 (IC 39,522-46,657)	
Gen <i>CEA</i> (CTCs)		0,627
Nivel bajo de expresión	43,503 (IC 40,218-46,789)	
Nivel alto de expresión	44,230 (IC 39,738-48,721)	

Tabla 15: Análisis de supervivencia de niveles de expresión relativa de ARNm de los genes *CEA* y *KRT19* en sangre posterior a la cirugía.

Variable	Media SLE (meses)	P valor
Gen <i>KRT19</i> (SP)		P = 0,967
Nivel bajo de expresión	43,580 (IC 39,312-47,848)	
Nivel alto de expresión	43,159 (39,318-47,001)	
Gen <i>CEA</i> (SP)		P = 0,236
Nivel bajo de expresión	41,907 (IC 37,256-46,559)	
Nivel alto de expresión	40,745 (IC 37,849-43,641)	
Gen <i>CEA</i> (CTCs)		P = 0,492
Nivel bajo de expresión	42,277 (IC 38,149-46,406)	
Nivel alto de expresión	45,536 (IC 41,876-49,195)	

El impacto como factor pronóstico de las CTCs en sangre en pacientes con CCR ha sido ampliamente estudiado y confirmado en un metaanálisis reciente (102). Sin embargo, hasta el momento su uso solamente ha sido validado en la monitorización del CCR metastásico (CCRm) (22,103,104) y la FDA únicamente ha aprobado el método semiautomático “CellSearch system” para su cuantificación.

Los datos acerca del papel de las CTCs como factor pronóstico en CCR en estadios iniciales son más limitados. Diversos autores han estudiado el papel del ARNm de *CEA*, *CK-19*, *CK-20* y otros marcadores como método indirecto de detección de CTCs, sugiriendo una asociación entre niveles elevados de ARNm de estos marcadores con mayor riesgo de recaída tumoral y peor supervivencia(99); (105–108). Sin embargo, se trata de estudios pequeños con diferencias metodológicas importantes como son la combinación de los marcadores utilizados, la medición de la expresión del ARNm y el punto de corte seleccionado para clasificar los niveles de expresión en altos y bajos, la selección de la población a estudio, el tipo de sangre extraído (sangre portal vs sangre periférica) y el momento de la extracción de la muestra. En nuestro estudio, no hemos observado diferencias en la SLE en función de la expresión del ARNm de los dos genes estudiados.

La detección de CTCs mediante PCR no es la única metodología que ha sido utilizada en este contexto. El método “CellSearch system”, ha sido estudiado con resultados dispares. Sotelo y colaboradores no observaron diferencias ni en SLE ni en SG en función del número de CTCs detectadas en 519 pacientes con estadio III (109). Sin embargo, Bork y colaboradores publicaron

un estudio con 239 pacientes en el que la presencia de CTCs (≥ 1) preoperatoriamente fue un factor predictivo independiente de una menor SLE ($p < 0.001$) y SG ($p < 0.001$) en pacientes intervenidos con estadios I-III, (110).

Con todo lo expuesto anteriormente, consideramos que es necesario continuar investigando para poder desarrollar una metodología estandarizada de detección de CTCs que nos permita comparar los resultados de los estudios y esclarecer su valor pronóstico en CCR en estadios iniciales.

4.3. Tejido tumoral: estudio del estado mutacional de los genes RAS y BRAF y de la expresión proteica del sistema de reparación de ADN MMR.

4.3.1. Análisis descriptivo del estado mutacional de los genes de la familia RAS (*KRAS* y *NRAS*) y *BRAF*.

El análisis descriptivo del estado mutacional de los genes de la familia RAS (*KRAS* y *NRAS*) en el tejido tumoral de los 105 pacientes incluidos en el estudio muestra un porcentaje de mutación del 39% de los casos ($n = 41$). Las mutaciones en el codón 12 del exón 2 fueron las más frecuentes ($n = 28$; 68% de las mutaciones), seguidas de las mutaciones en el codón 13 del exón 2 ($n = 7$; 17%) y de las mutaciones en el codón 146 del exón 4 ($n = 6$; 10%). En la **tabla 16** se detallan todas las mutaciones observadas en el gen *KRAS*. En el 4,8% ($n = 5$) de los pacientes se halló alguna mutación en el gen *NRAS* (**tabla 17**). El porcentaje de mutación de ambos genes fue del 43,8% ($n = 46$). También se detectó la mutación V600E en el gen *BRAF* (en más del 5% de las células analizadas) en 12 casos (11,4%). Las mutaciones ES86K y

T599I se observaron en 1 caso cada una de ellas. Dichos resultados concuerdan con los datos publicados en la literatura.

Tabla 16: Mutaciones observadas en el gen *KRAS*.

<i>Total</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
	41	39%
Mutación exón 2 codón 12		
GGT G12D GAT	13	12,4%
GGT G12V GTT	9	8,6%
GGT G12A GCT	1	1%
GGT G12C TGT	1	1%
GGT G12R CGT	1	1%
GGT G12S AGT	3	2,9%
Mutación exón 2 codón 13		
GCG G13D GAC	7	6,7%
Mutación exón 4 codón 146		
GCA A146V GTA	1	1%
GCA A146T ACA	5	4,8%

Tabla 17: Mutaciones observadas en el gen *NRAS*.

<i>Total</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
	5	4,8%
Mutación exón 2 codón 12		
GGT G12D GAT	2	1,8%
Mutación exón 2 codón 13		
GGT G13D GAT	1	1%
Mutación exón 3 codón 61		
CAA Q61R CGA	1	1%
Mutación exón 4 codón 146		
GCC A146T ACC	1	1%

4.3.2. Análisis del estado de expresión de las proteínas del sistema MMR (MLH 1 y MSH 2).

Se realizó el análisis de expresión por IHC de las proteínas del sistema de reparación MMR; MLH 1 y MSH 2. La pérdida de expresión de alguna de las dos proteínas indica una deficiencia en el sistema de reparación MMR (dMMR) y la presencia de expresión de ambas proteínas indica la competencia del sistema (cMMR). El análisis descriptivo de los 105 casos se detallan en la **tabla 18**. Los resultados obtenidos concuerdan con los datos publicados en la literatura.

Tabla 18: Expresión de las proteínas del Sistema de reparación MMR.

Total	N = 105	% = 100
Expresión IHC MLH 1		
MLH 1 +	91	86,7%
MLH 1 -	14	13,3%
Expresión IHC MSH 2		
MSH 2 +	98	93,3%
MSH 2 -	7	6,7%
Estado del Sistema de Reparación MMR		
cMMR	85	81%
dMMR	20	19%

4.4. Correlación de las variables analizadas con las principales características clínico-patológicas.

4.4.1. Correlación entre las características clínicas y patológicas.

De todas las características analizadas obtuvimos las siguientes relaciones:

- Los tumores localizados en el colon derecho presentaron con mayor frecuencia mutaciones en el gen *BRAF* (21% vs 3,5%, $p = 0,006$), deficiencia en la expresión del sistema MMR (35% vs 5,3%, $p 0,000$) y alto grado histológico (19% vs 7%, $p = 0,073$). Dichas asociaciones ponen de manifiesto un comportamiento patológico y molecular diferente entre los tumores localizados en el colon derecho e izquierdo. Se ha postulado que este hecho puede ser debido a un origen embrionario diferente, a diferencias en el comportamiento inmunológico de la mucosa intestinal e incluso a diferencias en la microbiota (111,112).

- El 41% de los pacientes presentaron anemia al diagnóstico ($Hb < 12 \text{ gr/dl}$), siendo más frecuente en los tumores localizados en el lado derecho frente al lado izquierdo (52% vs 30%, $p = 0,013$); **(tabla 19)**. Estos resultados son similares a los publicados por Dunne y colaboradores en un estudio con 311 pacientes en el que la incidencia de anemia preoperatoria fue del 46,1%, siendo también mayor en la localización tumoral derecha (113). En dicho estudio también se observó un aumento de la incidencia de anemia a mayor edad y estadio tumoral más avanzado, resultado que no se pudo corroborar en nuestro estudio. La anemia preoperatoria ha sido asociada con un aumento de la morbimortalidad en CCR y con un aumento de la necesidad de realizar transfusiones sanguíneas (114). Por estas razones, en

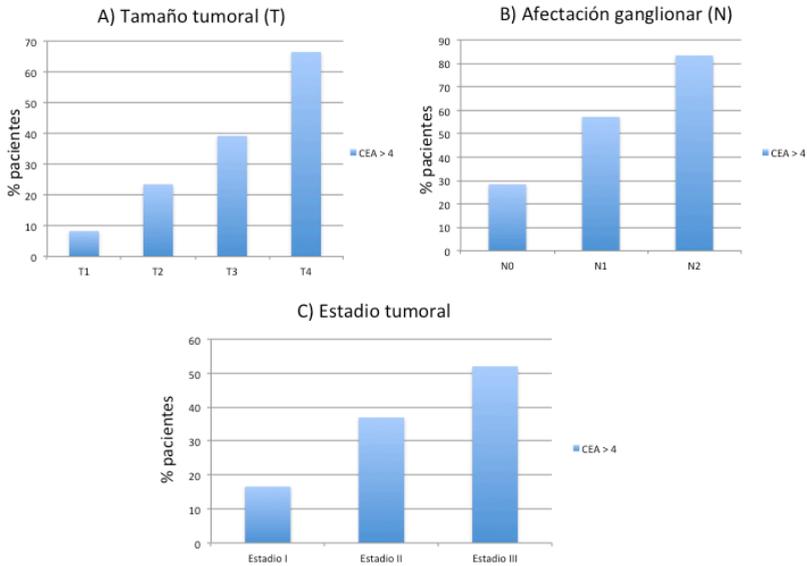
todos los pacientes que van a ser intervenidos de un CCR se debería realizar un estudio completo de la anemia y establecer un protocolo de tratamiento previo a la cirugía (115).

Tabla 19: Distribución de los pacientes en función de la cifra de Hb al diagnóstico y la localización del tumor primario.

Cifra de Hb (g/dl) al diagnóstico	% pacientes con tumor en colon derecho	% pacientes con tumor en colon izquierdo
≥ 12	48%	70%
10 - 11,99	21%	18%
≤ 9,99	31%	12%

- Se observó un aumento progresivo del porcentaje de pacientes con valores del marcador tumoral CEA > 4 ng/ml a medida que aumentaba el tamaño tumoral (T1 8,3%, T2 23,52%, T3 39,28% y T4 66,6%; p = 0,008), la afectación ganglionar (N0 28,37%, N1 57,14% y N2 83,3%; p = 0,08) y el estadio tumoral (estadio I 16,6%, estadio II 36,9% y estadio III 52%; p = 0,021), (**figura 12**). Pese a que continúa siendo un tema controvertido, otros autores han descrito estos resultados (116–120). No se observó ninguna asociación del marcador tumoral CA 19.9 con variables clínico-patológicas analizadas.

Figura 12: Porcentaje de pacientes con niveles de CEA > 4. A) tamaño tumoral, B) afectación ganglionar y C) estadio tumoral.



- Aquellos pacientes intervenidos mediante laparotomía abierta tuvieron mayor porcentaje de complicaciones quirúrgicas con diferencias estadísticamente significativas (36,84% vs 19,40%; $p = 0,049$). El riesgo de presentar una complicación quirúrgica en este grupo fue 2,42 veces superior que en el resto de pacientes (Odds Ratio 2,42 [IC 0,990 – 5,930]). En un estudio publicado por Lacy y colaboradores en el que se comparaban los resultados de la colectomía abierta frente a la laparoscópica en 219 pacientes, también se observó mayor tasa de morbilidad en la rama de cirugía abierta (28,7% vs 10%; $p = 0,01$); (121). Sin embargo, la tasa de complicaciones en ambos tratamientos fue mayor en nuestro estudio. No hubo diferencias significativas entre el

porcentaje de cirugías laparoscópicas realizadas según la localización del tumor primario (65% en el colon derecho vs 59% en el colon izquierdo, $p = 0,55$).

- Por último, observamos una asociación entre el número de nódulos linfáticos obtenidos en la pieza quirúrgica y la localización del tumor primario, siendo mayor en los tumores derechos (58% de los tumores derechos vs 39% de los tumores izquierdos tenían más de 13 nódulos linfáticos evaluados [$p = 0,053$]). Además de la localización tumoral, algunos autores han sugerido que otros factores como la edad, el género y el grado histológico también pueden influir en el número de nódulos linfáticos obtenidos (122,123). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron dicha asociación: edad ($p = 0,406$), sexo ($p = 0,407$) y el grado histológico (0,628). Se ha postulado que la biología del tumor primario puede afectar al número de nódulos linfáticos existentes. En este sentido, la presencia de inestabilidad de microsatélites se ha asociado con una mayor número de nódulos linfáticos, sobre todo cuando no se observa una mutación en ninguno de los genes *RAS* o *BRAF* (124,125). En nuestro estudio no se pudo corroborar dicha hipótesis. Aunque el porcentaje de pacientes con más de 13 nódulos linfáticos evaluados era mayor en el grupo dMMR (IMS) (60% dMMR vs 46% cMMR), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,256$). En el subgrupo de pacientes dMMR, los casos sin mutación en el gen *KRAS* presentaban mayor número de nódulos linfáticos analizados (> 13 en el 66% de los casos sin mutación y en el 40% de los casos con mutación) sin diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el 100% de los pacientes con mutación en el gen *BRAF*

tenían más de 13 nódulos analizados frente al 46% de los pacientes sin mutación ($p = 0,035$).

4.4.2. Estado mutacional de los genes de la familia *RAS* y del gen *BRAF*.

Los resultados obtenidos no mostraron una asociación de las mutaciones en los genes *RAS* y las variables analizadas (**tabla 20**).

Diversos grupos han investigado la correlación de las mutaciones de *KRAS* con las características clínicas e histopatológicas más importantes. En cuanto a la distribución de las mutaciones por sexo los resultados son controvertidos. Un estudio japonés con 813 pacientes intervenidos de CCR resecable observó un mayor porcentaje significativo de mutaciones de este gen en las mujeres (126). Sin embargo, otros grupos han observado lo contrario (127). También se ha sugerido una distribución por sexo diferente en mutaciones específicas del gen en los codones 12 y 13 del exón 2 con resultados contradictorios entre diferentes trabajos (127–129). Por otro lado, algunos autores han descrito una mayor frecuencia de mutaciones de *KRAS* en los tumores localizados en el colon derecho respecto al colon izquierdo (129–131). Ninguno de estos resultados han sido corroborados en nuestro estudio.

Hasta el momento no se ha demostrado una asociación del estado mutacional de *KRAS* con diferentes características histopatológicas tales como subtipo histológico, grado histológico, T, N y estadio tumoral (132–135).

Tabla 20: Correlación del estado mutacional de los genes RAS (*KRAS* y *NRAS*) con las características clínico-patológicas.

<i>Características clínico-patológicas</i>	<i>RAS nativo</i> <i>N = 59 (56%)</i>	<i>RAS mutado</i> <i>N = 46 (44%)</i>	<i>P valor</i>
Sexo			
Mujer	39%	30%	0,363
Hombre	61%	70%	
Edad			
< 65 años	44%	28%	0,096
≥ 65 años	56%	72%	
Localización tumor			
primario	44%	49%	0,625
Derecha	56%	51%	
Izquierda			
T			
T1	13,5%	9%	0,894
T2	20%	21%	
T3	54%	56%	
T4	13,5%	14%	
N			
N0	72%	80%	0,471
N1	17%	9%	
N2	11%	11%	
Estadio tumoral			
I	28%	30%	0,658
II	44%	50%	
III	28%	20%	
Grado histológico			
Bajo grado	84%	91%	0,281
Alto grado	16%	9%	

<i>Características clínico-patológicas</i>	<i>RAS nativo N = 59 (56%)</i>	<i>RAS mutado N = 46 (44%)</i>	<i>P valor</i>
Invasión linfática			
No	80%	74%	0,486
Si	20%	26%	
Invasión venosa			
No	100%	93%	0,081
Sí	0%	7%	
Invasión perineural			
No	90%	82%	0,28
Sí	10%	18%	
Estado Sistema MMR			
cMMR	74,5%	89%	0,060
dMMR	25,5%	11%	

Respecto al estado mutacional del gen *BRAF*, detectamos una mayor frecuencia de la mutación en los tumores originados en el colon derecho (20,83% vs 3,57% en el colon izquierdo, $p = 0,011$; **figura 13**) y en los tumores con dMMR/IMS (25% vs 8,23% en el subgrupo cMMR, $p = 0,034$), siendo este último resultado a expensas de una mayor frecuencia de mutación del gen en el subgrupo con ausencia de expresión de MLH1 (35,71% en MLH1 - vs 7,69% en MLH1 +; $p = 0,022$), (**figura 14**). No observamos diferencias en función de la expresión de la proteína MSH2 (14,28% en MSH2 - vs 11,22% en MSH2 +; $p = 0,584$). Las mutaciones de *BRAF* también fueron más frecuentes en los tumores con estadios más avanzados (II y III) respecto al estadio I (14,28% y 20,8% vs 0%, $p = 0,039$ y 0,012 respectivamente;

[figura 15]) y en los tumores T 3-4 vs T1-2 (17% vs 0%; $p = 0,008$).

Estos datos son acordes a los resultados de un metaanálisis publicado por Chen y colaboradores (136) con 25 estudios y 11,955 pacientes incluidos, que asocian la presencia de mutación de *BRAF* con tumores localizados en el lado derecho, dMMR/IMS, ausencia de expresión de la proteína MLH1 y estadios avanzados de la enfermedad, con frecuencias de la mutación muy similares a las observadas en nuestro estudio. Dicho metaanálisis también muestra una posible asociación con características clínicas tales como la edad (pacientes ≥ 60 años [OR 2,29; IC 95% 1,13-4,61]) y el género (mujeres [OR 1,71; IC 95% 1,42-2,07]), y características patológicas de mal pronóstico como el grado histológico pobremente diferenciado y la histología mucinosa. En la **tabla 21** se detalla la distribución del estado mutacional de *BRAF*^{V600E} en función de las características clínico-patológicas recogidas.

Figura 13: Localización tumoral en función del estado mutacional del gen *BRAF*^{V600E}.

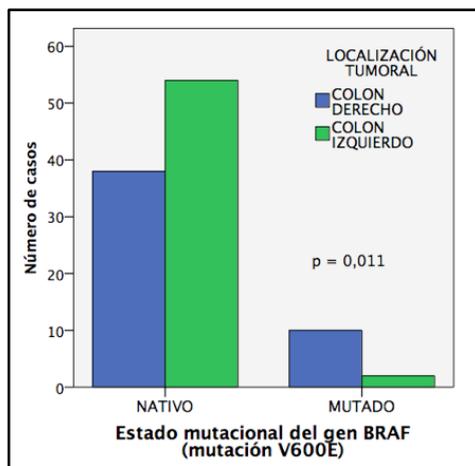


Figura 14: Estado de expresión del Sistema MMR y de la proteína MLH 1 en función del estado mutacional del gen *BRAF*^{V600E}.

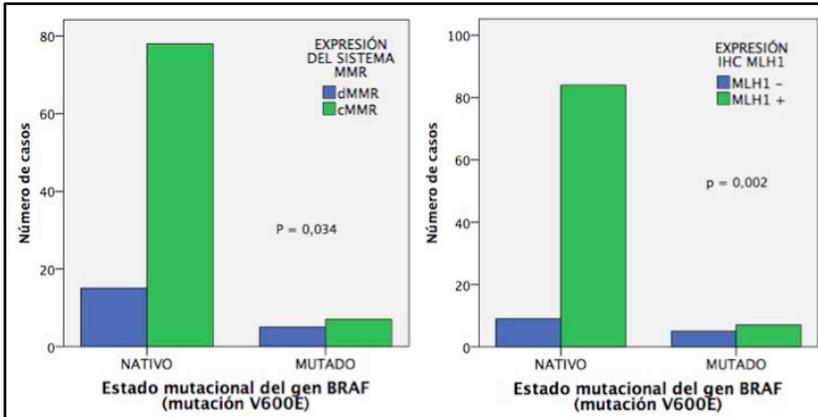


Figura 15: Estado mutacional del gen *BRAF*^{V600E} en función del estadio tumoral.

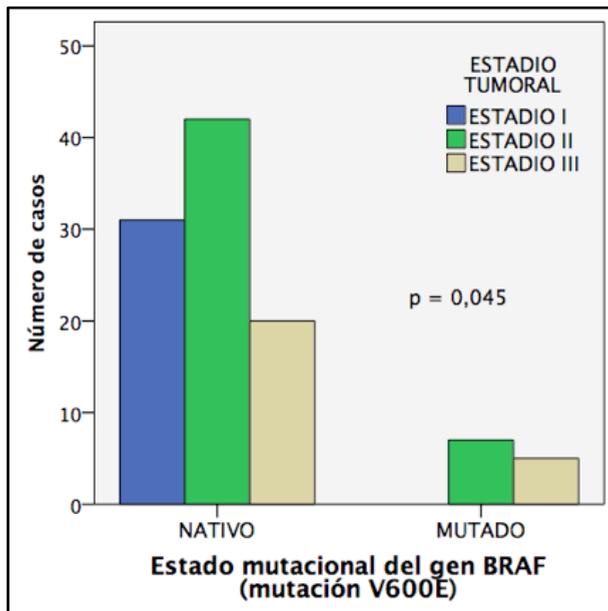


Tabla 21: Distribución del estado mutacional de *BRAF*^{V600E} según las características clínico-patológicas.

<i>Características clínico-patológicas</i>	<i>BRAF</i> ^{V600E} <i>nativo</i> <i>N = 93 (88,5%)</i>	<i>BRAF</i> ^{V600E} <i>mutado</i> <i>N = 12 (11,5%)</i>	<i>P valor</i>
Sexo			
Mujer	34%	42%	0,620
Hombre	66%	58%	
Edad			
< 65 años	39%	25%	0,355
≥ 65 años	61%	75%	
Localización tumor primario			0,006
Derecha	41%	83%	
Izquierda	59%	17%	
T			
T1-2	37%	0%	0,069
T3-4	63%	100%	
N			
N0	78%	58%	0,317
N1	12%	25%	
N2	10%	17%	
Estadio tumoral			
I	33%	0%	0,045
II	45%	58%	
III	22%	42%	
Grado histológico			
Bajo grado	88%	75%	0,557
Alto grado	12%	25%	

Características clínico-patológicas	<i>BRAF</i>^{V600E} nativo N = 93 (88,5%)	<i>BRAF</i>^{V600E} mutado N = 12 (11,5%)	P valor
Invasión linfática			
No	78%	75%	0,557
Sí	22%	25%	
Invasión venosa			
No	97%	100%	0,528
Sí	3%	0%	
Invasión perineural			
No	88%	75%	0,208
Sí	12%	25%	
Estado Sistema MMR			
cMMR	84%	58%	0,034
dMMR	16%	42%	

4.4.3. Análisis de expresión del sistema de reparación de ADN MMR (proteínas MLH1 y MSH2).

Según la literatura, existen diferencias fenotípicas entre los pacientes con dMMR y cMMR (137). La IMS o dMMR se ha asociado a pacientes con mayor edad, sexo femenino y tumores localizados en el colon proximal (138). En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en la edad ($p = 0,419$) y el sexo ($p = 0,620$) entre ambos grupos. Sin embargo, el porcentaje de casos dMMR en los tumores localizados en el colon derecho fue superior a los localizados en el colon izquierdo (35,4% vs 5,3%, $p < 0,001$). El 85% de los tumores dMMR estaban localizados en el colon derecho. La ausencia de expresión de MLH 1 y MSH 2 individualmente también fue más frecuente en los tumores

localizados en el lado derecho que en el izquierdo (MLH 1 - : 25% vs 3,5%, p= 0,001; MSH2 -: 12,5% vs 2%, p = 0,030).

También se ha descrito una asociación entre la IMS y diferentes características patológicas como el alto grado, la histología mucinosa, la infiltración linfocítica intra y peritumoral y el contenido de DNA diploide (139,140). Nuestros resultados confirman la asociación de dMMR con los tumores de alto grado histológico (p = 0,006), a expensas de un mayor porcentaje de tumores de alto grado en los casos con ausencia de expresión de la proteína MLH 1. No se observó ninguna correlación significativa entre el estado de expresión de MMR, MLH 1 y MSH 2 con el resto de características patológicas analizadas. En la **tablas 22 y 23** se detalla la distribución de las proteínas MLH 1 y MSH 2 y de la expresión del sistema MMR, en función de las características clínico-patológicas analizadas.

Tabla 22: Distribución del estado de expresión de MLH 1 y MSH 2 en función las características clínico-patológicas.

<i>Características clínico-patológicas</i>	MLH 1 -	MLH 1 +	P	MSH 2 -	MSH 2 +	P
Sexo						
Mujer	35%	35%	0,968	57%	33%	0,209
Hombre	65%	65%		43%	67%	
Edad						
< 65 años	42%	36%	0,768	42%	37%	0,746
≥ 65 años	58%	64%		58%	63%	
Localización tumor						
Derecha	85%	40%	0,001	85%	43%	0,030
Izquierda	15%	60%		15%	57%	

<i>Características clínico-patológicas</i>	MLH 1 -	MLH 1 +	P	MSH 2 -	MSH 2 +	P
T						
T1-2	14%	35%	0,391	42%	31%	0,38 8
T3-4	86%	65%		58%	69%	
N						
N0	61%	77%	0,276	86%	75%	0,63 6
N1	15%	13%		14%	13,5%	
N2	24%	10%		0%	11,5%	
Estadio tumoral						
I	14%	32%	0,321	42%	28%	0,68 4
II	50%	46%		42%	47%	
III	36%	22%		16%	25%	
Grado histológico						
Bajo grado	54%	92%	0,001	100%	86%	0,33 7
Alto grado	46%	8%		0%	14%	
Invasión linfática						
No	78%	77%	0,891	85%	76%	0,57 6
Sí	28%	23%		15%	24%	
Invasión venosa						
No	100%	97%	0,891	100%	97%	0,63 9
Sí	0%	3%		0%	3%	
Invasión perineural						
No	100%	85%	0,115	85%	87%	0,93 9
Sí	0%	15%		15%	13%	

Tabla 23: Distribución del estado de expresión del sistema MMR en función las características clínico-patológicas.

<i>Características clínico-patológicas</i>	<i>dMMR</i> <i>N = 20 (19%)</i>	<i>cMMR</i> <i>N = 85 (81%)</i>	<i>P valor</i>
Sexo			
Mujer	40%	34%	0,620
Hombre	60%	66%	
Edad			
< 65 años	45%	35%	0,419
≥ 65 años	55%	65%	
Localización tumor primario			
Derecha	85%	36%	< 0,0001
Izquierda	15%	64%	
T			
T1-2	25%	34%	0,801
T3-4	75%	66%	
N			
N0	73%	76%	0,690
N1	10%	14%	
N2	17%	10%	
Estadio tumoral			
I	25%	30%	0,885
II	50%	46%	
III	25%	24%	
Grado histológico			
Bajo grado	68%	91%	0,006
Alto grado	32%	9%	
Invasión linfática			
No	85%	75%	0,352
Sí	15%	25%	

Características clínico-patológicas	dMMR N = 20 (19%)	cMMR N = 85 (81%)	P valor
Invasión venosa			
No	100%	96%	0,394
Sí	0%	4%	
Invasión perineural			
No	95%	85%	0,223
Sí	5%	15%	

4.5. Valor pronóstico.

4.5.1. Características clínicas y patológicas.

La mediana de observación del estudio fue de 35,52 meses (0,84 – 50,4). La mediana de SLE fue de 33,77 meses (0,85 – 50,30) y la de SG de 35,47 meses (0,85 – 50,30). Para realizar el análisis de supervivencia se tuvo en cuenta la SLE y no la SG debido al tiempo de observación del estudio. El análisis de la influencia de las variables analizadas en la SLE se realizó mediante el método *Kaplan-Meier* empleando el estadístico log-rango.

El análisis univariante no mostró una asociación significativa entre la SLE y las siguientes variables clínicas: edad ($p = 0,895$), sexo ($p = 0,132$), hábito tabáquico ($p = 0,544$), consumo de alcohol ($p = 0,826$), localización del tumor primario ($p = 0,822$), cifra de Hb (gr/dl) al diagnóstico ($p = 0,670$), valor de CA 19.9 al diagnóstico ($p = 0,629$), tipo de cirugía ($p = 0,243$), complicaciones postquirúrgicas ($p = 0,805$) y QT adyuvante en los estadios II-III ($p = 0,281$).

Pese a que en nuestra cohorte de pacientes no se observaron diferencias en la SLE en función de la localización del tumor primario, su posible valor pronóstico está emergiendo en los

últimos años debido a las diferencias existentes en las características biológicas entre los tumores localizados en el colon derecho y el colon izquierdo. Recientemente se ha publicado un metaanálisis en el que se analizaba el valor pronóstico de la localización del tumor primario en 66 estudios, de los cuáles 25 incluían sólo pacientes con estadio I-III. Los resultados mostraron que la localización tumoral es un factor pronóstico independiente tanto en enfermedad resecable como avanzada. La localización del tumor primario en el lado izquierdo estaba asociada con una reducción significativa del riesgo de muerte (HR, 0.82; 95%CI, 0.79-0.84; $P < .001$), (141). En un estudio publicado por Missiaglia y colaboradores, aunque el riesgo de recidiva en pacientes con CCR estadio III no difirió en función de la localización tumoral, la supervivencia tras la recaída tumoral fue significativamente peor en los tumores proximales en el análisis multivariante (incluyendo el estado mutacional del gen *BRAF*). Por otro lado, solamente los pacientes con metástasis procedentes de tumores distales respondieron a los IEGFR (142). Todos estos resultados sugieren la importancia de estratificar a los pacientes en función de la localización tumoral para analizar su valor pronóstico y predictivo de respuesta a los tratamientos en estudios futuros.

Los pacientes con un nivel elevado de CEA preoperatorio (>4 ng/ml) tuvieron una menor SLE que los pacientes con un nivel normal ($CEA \leq 4$ ng/ml), siendo la media de 38,35 meses (IC95% 32,93-43,78) vs 46,29 meses (IC95% 43,29-48,87) respectivamente; $p = 0,016$). En el 20% de los casos con un nivel anormal de CEA preoperatorio, el nivel de CEA postoperatorio se

mantuvo elevado. Ningún paciente presentó un nivel de CEA preoperatorio normal y postoperatorio elevado. Los pacientes con niveles de CEA elevados pre y postoperatoriamente presentaron mayor riesgo de recidiva (odds ratio = 8,33) y peor pronóstico (media SLE 22,122 meses IC95% (10,734-33,510) vs 41,587 meses IC95% (36,154-47,019); p = 0,004). La **figura 16** muestra los gráficos de *Kaplan-Meier* según los niveles de CEA.

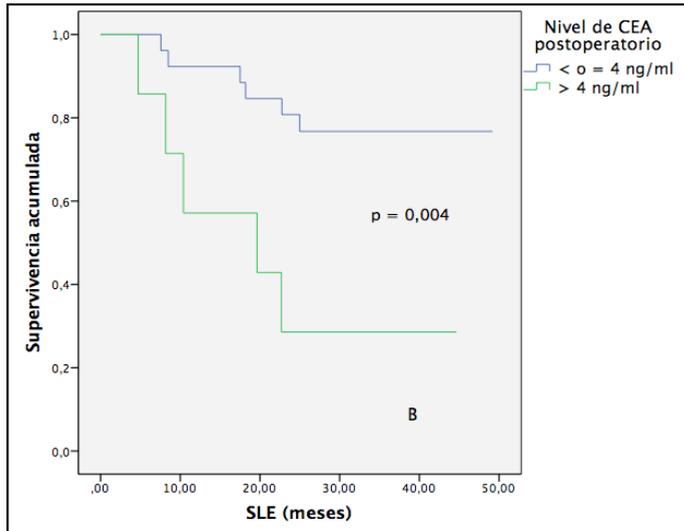
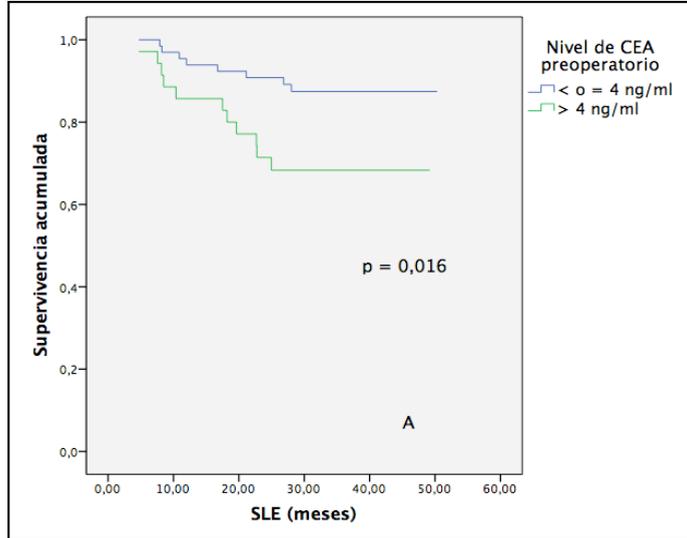
Múltiples estudios publicados en los últimos años han mostrado el valor pronóstico de la determinación de CEA preoperatoriamente, pudiendo identificar un grupo de pacientes con mayor riesgo de recidiva (93,116,117,120,143-145). En este sentido, un estudio retrospectivo publicado recientemente en el que se analizaban 1790 pacientes con CCR, mostró un beneficio en la supervivencia en los pacientes con estadio IIA C0 (CEA < 5 ng/mL) y IIIA C0 vs estadio I C1 (CEA > 5 ng/mL), estadio IIIA C0 vs estadio IIA C1 y estadio IIIB C0 vs estadio II B-C C1, respectivamente (146). Pese a que las guías internacionales de la sociedad americana (ASCO) y europea (ESMO) reconocen el valor pronóstico del marcador tumoral CEA preoperatorio, no incluyen su determinación entre los factores de riesgo a tener en cuenta a la hora de indicar un tratamiento QT adyuvante o neoadyuvante (77,147). De hecho, ningún estudio ha demostrado que la determinación de CEA preoperatorio pueda ser útil para seleccionar aquellos pacientes con estadio II que podrían beneficiarse de un tratamiento QT adyuvante.

Una elevación del nivel de CEA inicial que no se normaliza tras la resección del tumor primario representa según algunos estudios un factor de riesgo relevante (78,148,149). Por otro lado, se ha

descrito una asociación entre niveles elevados de CEA pre y postoperatorios con fases avanzadas de la enfermedad y factores de mal pronóstico (150,151). Ciertas complicaciones quirúrgicas como enfermedades respiratorias, hepatitis tóxica, alteraciones de la función renal y obstrucciones intestinales pueden elevar los niveles de CEA tras la intervención, sin embargo, no se ha demostrado que puedan influir en la aparición de recidivas locales o a distancia.

La relevancia del antígeno tumoral CA 19.9 es más controvertido. Pese a que algunos estudios muestran su posible valor pronóstico en CCR (152-154), parece que su sensibilidad como biomarcador es claramente inferior al CEA. En nuestro estudio su valor preoperatorio no fue un factor pronóstico.

Figura 16: Figuras de Kaplan-Meier según los niveles de CEA.



A: SLE según el nivel de CEA preoperatorio; B: SLE según el nivel de CEA postoperatorio en el grupo de pacientes con CEA preoperatorio elevado.

Respecto a las técnicas quirúrgicas utilizadas en el estudio, el análisis univariante de supervivencia no mostró diferencias significativas en SLE entre la colectomía abierta y la cirugía laparoscópica. Estos resultados concuerdan con los de un metaanálisis publicado en 2013 en el que se evaluaba la tasa de recurrencia y supervivencia tras 5 años de seguimiento entre ambas técnicas quirúrgicas (155). Dicho estudio no observó diferencias en mortalidad (RR = 0,94, IC 95% [0,82-1,09]; $p = 0,23$), tasa de recurrencia (RR = 0,94, IC 95% [0,81-1,10]; $p = 0,24$), tasa de SLE a los 5 años (RR = 1,00; IC 95% [0,94-1,06; $p = 0,96$] y tasa de SG a los 5 años (RR = 1,02; IC 95% [0,97-1,07]; $p = 0,55$).

No se observó un beneficio en la SLE en los pacientes que recibieron QT adyuvante en los estadios II y III. Este hecho podría justificarse por el escaso beneficio de la QT en el estadio II y por el tamaño muestral insuficiente.

En cuanto a las características patológicas analizadas el análisis univariante de supervivencia mostró que la SLE era menor a medida que aumentaba la extensión del tumor primario (T); ($p = 0,023$), el número de nódulos regionales linfáticos afectos (N); ($p < 0,001$) y el estadio tumoral ($p < 0,001$) (**figura 17**). La SLE también fue menor SLE en los subgrupos de tumores que presentaban invasión linfática ($p < 0,001$), invasión venosa ($p < 0,001$), invasión perineural ($< 0,001$) y perforación o abscesificación tumoral ($p = 0,090$). No se observaron diferencias en SLE en función del número de nódulos linfáticos evaluados (< 12 vs ≥ 12), ($p = 0,465$). Sin embargo, aquellos pacientes con una

ratio entre el número de nódulos linfáticos afectos y el número de nódulos analizados (RNL) $< 0,10$ presentaron un beneficio significativo en la SLE ($p < 0,001$), (**figura 18**). En la **tabla 24** se detalla el análisis univariante de todas las variables patológicas incluidas en el estudio.

El Sistema de estadificación tumoral TNM propuesto por los grupos *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e *International Union for Cancer Control (UICC)* permite conocer la extensión de la enfermedad. Es el factor que proporciona mayor información acerca del pronóstico individual de los pacientes y es de gran utilidad para comparar subgrupos de pacientes en ensayos clínicos. Los cambios realizados en la última revisión del TNM publicada en la 7ª edición del Manual de estadiaje de AJCC Cancer (75) respecto a la 6ª edición se basan en los resultados del análisis de supervivencia de 109,953 pacientes incluidos en la base de datos SEER entre 1992 y 2004 y su comparación con 134,206 pacientes incluidos en la base de datos NCDB, proporcionando una clasificación pronóstica más exacta. El análisis univariante de los pacientes incluidos en el estudio clasificados según esta última edición mostró el valor pronóstico individual de la T, la N y el estadio tumoral.

De forma similar a nuestros resultados, la invasión venosa (particularmente la invasión venosa extramural), la invasión linfática, la invasión perineural y la perforación intestinal se han asociado a un peor pronóstico en múltiples estudios retrospectivos (156–160). Aunque también ha sido demostrado el valor pronóstico independiente del grado histológico en nuestra cohorte de pacientes no se ha observado un impacto en la

supervivencia. Según la guía de consenso de la ESMO para el CCR en etapas tempranas (77), se recomienda la inclusión de estas características en el informe anatómico-patológico junto a otros parámetros como son el tipo histológico y el estado del margen de resección.

La 7ª edición del Manual de estadiaje de la AJCC recomienda el examen de un mínimo de 10-14 nódulos linfáticos en la pieza quirúrgica para un correcto estadiaje. Dicha recomendación se basa en la asociación observada entre el número de nódulos linfáticos examinados y la supervivencia de los pacientes en múltiples estudios, estableciendo la mayoría de ellos el punto de corte en 12 nódulos (161-163). La razón por la cual se establece esta asociación no está claramente establecida, aunque una adecuada estadificación tumoral y la calidad de la resección quirúrgica parecen dos de los factores más importantes. En nuestro estudio el número de nódulos analizados no influyó en la supervivencia de los pacientes, pero sí la RNL. Aunque no se ha establecido con claridad cuál es el valor óptimo de dicha ratio (entre 0,10 y 0,25, otros autores han postulado su posible valor pronóstico (84,164).

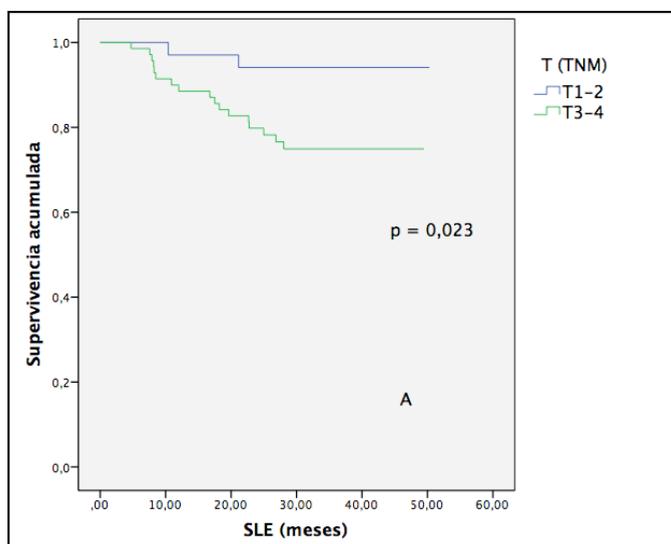
Tabla 24: Análisis univariante de la SLE según las variables patológicas.

Variable patológica	Media SLE en meses [IC95%]	P valor
T T1-2 T3-4	48,26 (46,49-51,03) 41,03 (37,47-44,58)	0,023
N N0 N1 N2	47,34 (45,05-49,64) 36,48 (30,09-42,88) 26,42 (16,53-36,30)	< 0,001
Número nódulos linfáticos evaluados < 12 ≥ 12	42,18 (38,10-46,26) 44,67 (41,23-48,12)	0,465
RNL < 0,10 ≤ 0,10	47,11 (44,81-49,41) 32,343 (25,59-39,09)	< 0,001
Estadio tumoral I II III	48,06 (45,04-51,09) 45,40 (42,02-48,78) 32,58 (26,23-38,93)	< 0,001
Grado histológico Bajo grado Alto grado	43,95 (51,06-46,83) 38,34 (31,48-45,21)	0,594
Invasión linfática No Sí	46,52 (44,00-49,04) 30,91 (25,16-36,65)	< 0,001

Variable patológica	Media SLE en meses [IC95%]	P valor
Invasión venosa		
No	44,65 (42,07-47,24)	< 0,001
Sí	18,13 (6,88-29,37)	
Invasión perineural		
No	45,87 (43,34-48,35)	< 0,001
Sí	26,75 (20,26-33,24)	
Perforación/abscesificación tumoral		
No	44,64 (41,97-47,32)	0,090
Sí	36,86 (26,73-46,99)	

Figura 17: Figuras de Kaplan-Meier de SLE según T, N y estadio tumoral según la clasificación TNM.

A: SLE según T; B: SLE según N; C: SLE según estadio tumoral.



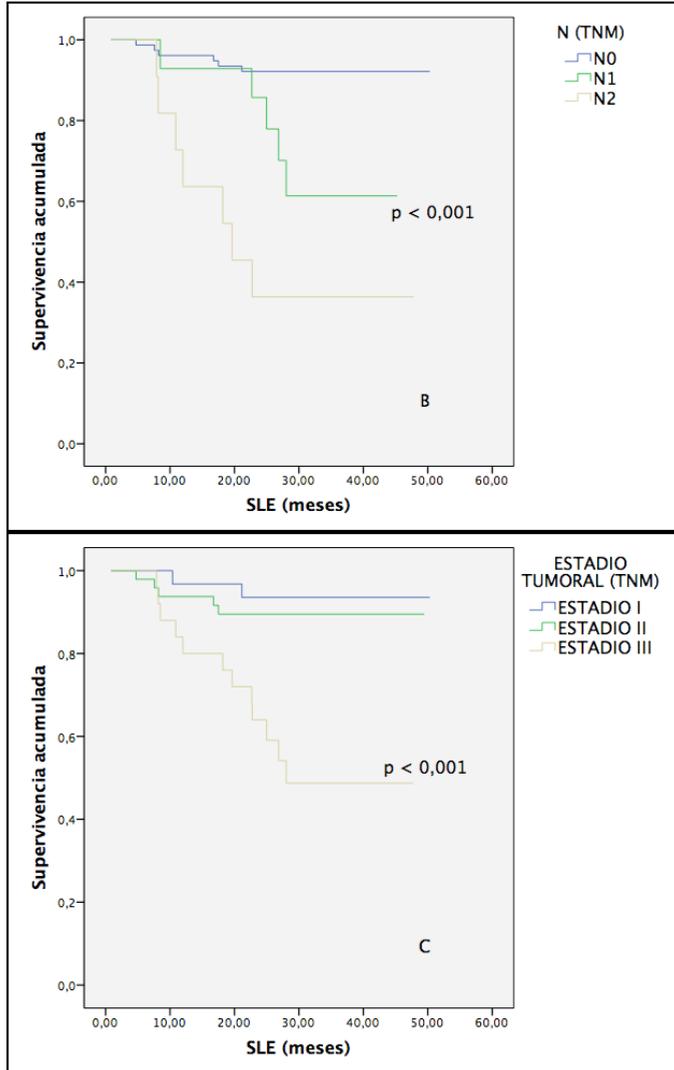
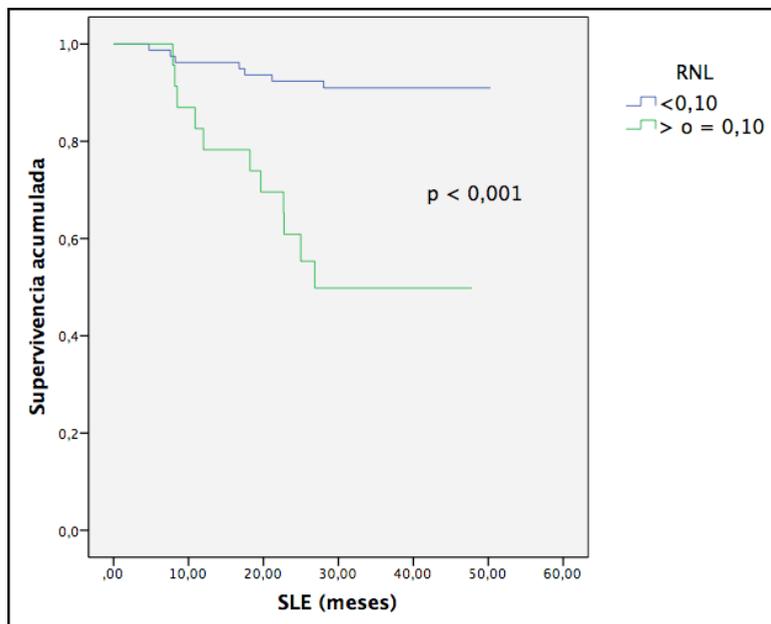


Figura 18: Figuras de Kaplan-Meier de SLE según la RNL.



4.5.2. Estado mutacional de los genes de la familia *RAS* y del gen *BRAF*.

- Análisis del valor pronóstico de los genes *RAS*.

El grupo de pacientes con una mutación en el gen *KRAS* presentó una menor SLE estadísticamente significativa respecto al grupo nativo ($p = 0,011$). Beneficio que se mantuvo al analizar de forma conjunta el estado mutacional de los dos genes de la familia *RAS* ($p = 0,035$), (**figura 19**). No se observaron diferencias en la SLE entre las mutaciones específicas de los codones 12 y 13 del gen *KRAS* ($p = 0,808$).

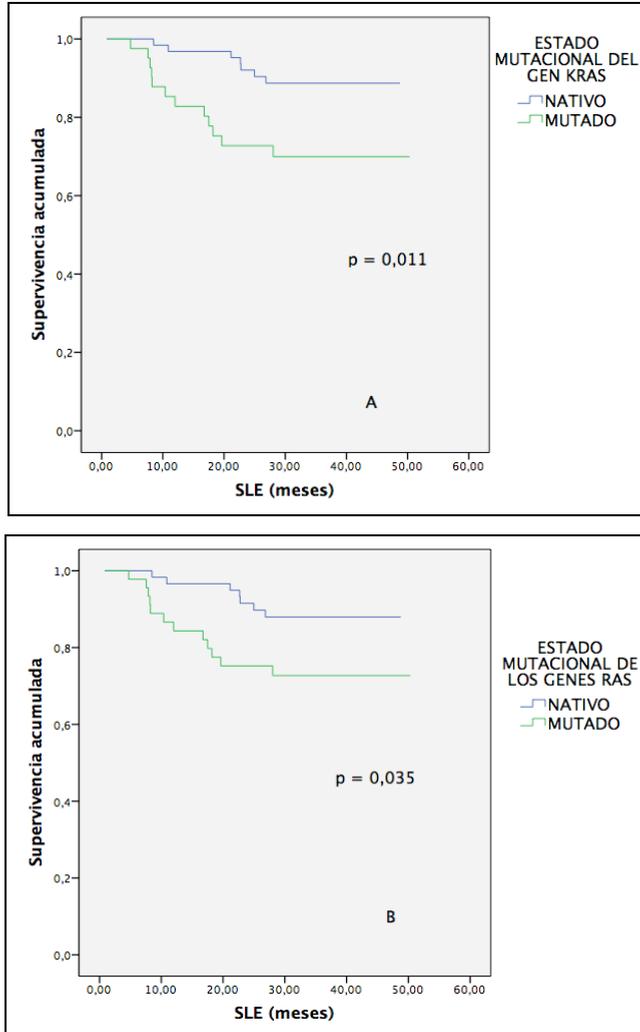
A día de hoy, el papel del estado mutacional de los genes *RAS* (*KRAS* y *NRAS*) como factor predictivo de eficacia a los IEGFR en CCRm, está claramente establecido. La presencia de una mutación

en alguno de estos genes supone un detrimento en la supervivencia de los pacientes tratados con QT en combinación con un IEGFR (165,166). Además de su valor predictivo, las mutaciones en *KRAS* tienen un valor pronóstico independiente asociado a una menor supervivencia (34,9 vs 37,8 meses) en CCRm (167). Sin embargo, el valor del estado mutacional de *RAS* como factor pronóstico en CCR resecable todavía es controvertido. Roth y colaboradores no observaron el valor pronóstico de *KRAS* al analizar la SLE y la SG en pacientes diagnosticados de CCR estadios II y III incluidos en los ensayos clínicos PETACC-3, EORTC40993 y SAKK 60-00 (SLE: HR 1.05, p = 0.66; SG: HR 1.09, p 0.48), (168). Sin embargo, en la línea de nuestros resultados, son varios los autores que han descrito un peor pronóstico en los pacientes con mutación en *KRAS*. En el estudio N0147 que analizaba el potencial beneficio de cetuximab combinado con FOLFOX en pacientes con CCR estadio III resecado, se observó una mejor SLE en los pacientes con *KRAS* nativo vs mutado (HR 0.7, p 0.004), (169). Lee y colaboradores analizaron el estado mutacional de *KRAS* en 437 pacientes con estadio III o estadio II con factores de mal pronóstico, intervenidos y tratados con QT adyuvante (FOLFOX), observando un detrimento en la SLE en los pacientes con mutación (SLE 3 años 79% vs 92%, p 0.006) (170). Kadowaki y colaboradores también han mostrado el impacto negativo de las mutaciones de *KRAS* en la SLE y la SG en pacientes intervenidos con estadios I y II (126). Por último, Osumi y colaboradores han publicado recientemente un estudio con 1,053 pacientes con CCRm tras metastasectomía, cuyos

resultados revelan un beneficio en la SG a los 4 años para el grupo de pacientes *RAS* nativo incluyendo el análisis de *KRAS* y *NRAS* exones 2, 3 y 4 (65,6% vs 81,3%, $p < 0.05$), (171). Nuestros datos revelan un beneficio en la SLE en los pacientes *RAS* nativo en estadios iniciales (I-III).

Estudios preclínicos han sugerido que los tumores con una mutación específica en el codón 12 (exón 2) del gen *KRAS* pueden tener un comportamiento más agresivo que los tumores con una mutación en el codón 13 del mismo exón (172). Diversos autores han intentado confirmar la diferencia en el pronóstico del CCR entre ambas mutaciones en estudios clínicos, siendo los resultados publicados hasta el momento contradictorios (129,173,174). En este sentido, no hemos observado el posible valor pronóstico de estas mutaciones específicas.

Figura 19: Figuras de Kaplan-Meier de SLE según el estado mutacional de los genes de la familia RAS.



A: SLE según el estado mutacional del gen *KRAS*; B: SLE según el estado mutacional de los genes *RAS*.

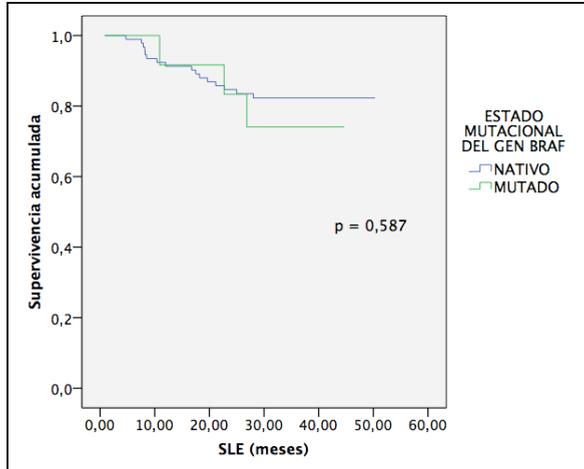
- Análisis del valor pronóstico del gen BRAF.

No se observaron diferencias en la SLE en función del estado mutacional de *BRAF^{V600E}*. La media de SLE en los pacientes nativos fue de 44,035 meses (IC 95% 41,194-46,876) frente a 38,338 meses (IC 95% 31,947-44,729) en los pacientes mutados ($p = 0,587$), (**figura 20**). Al analizar los pacientes con dMMR ($n = 20$), se observaron 2 recaídas en el subgrupo de pacientes *BRAF^{V600E}* nativo y ninguna en el subgrupo *BRAF^{V600E}* mutado. En los pacientes con cMMR, el 18% de los pacientes nativos presentaron una recaída frente al 43% de los pacientes mutados. La media de SLE fue menor en los pacientes mutados (34,131 meses [IC 95% 24,576-43,686] vs 43,846 meses [IC 95% 40,724-46,969] en los nativos), sin alcanzar esta diferencia una significación estadística ($p = 0,152$).

La presencia de la mutación *BRAF^{V600E}* se ha asociado consistentemente con peor pronóstico en CCRm en múltiples estudios retrospectivos y randomizados con diferentes regímenes de QT (175,176). Un ejemplo de ello es el estudio publicado en 2011 por Tran y colaboradores con 524 pacientes, en el que se objetivó una menor SG en el grupo con la mutación respecto al grupo sin la mutación (10,4 meses vs 34,7 meses; HR 10,662, $p < 0,001$); (177). Sin embargo, todavía no hay evidencia suficiente para considerar la mutación un factor predictivo negativo de respuesta a la terapia con IEGFR en enfermedad metastásica (178). El valor pronóstico en enfermedad resecable también es controvertido ya que los estudios que han analizado la influencia de la mutación en la supervivencia en estos pacientes han mostrado resultados dispares. Recientemente, Zhu y

colaboradores han publicado un metaanálisis incluyendo 7 ensayos clínicos con pacientes intervenidos con estadios II y III que han recibido posteriormente QT adyuvante. Los resultados muestran una menor SLE y SG en los pacientes con la mutación vs los pacientes sin la mutación (SLE: HR 1,26, IC 95% [1,07-1,48], p = 0,006; SG: HR 1,42, IC 95% [1,25-1,60, p < 0,00001] (179). Como hemos visto anteriormente, la mutación *BRAF*^{V600E} se ha asociado específicamente a tumores que presentan IMS de forma esporádica. Algunos estudios sugieren que la mutación de *BRAF*^{V600E} está asociada a peor pronóstico salvo en el subgrupo de pacientes con IMS (180,181). Esta última asociación no está claramente establecida, de hecho De Cuba y colaboradores han publicado recientemente un estudio en el que analizaban el efecto de las mutaciones en *KRAS* y *BRAF* en 143 pacientes intervenidos de CCR esadios II y III con IMS, cuyos resultados muestran un beneficio en supervivencia en los pacientes sin ninguna mutación vs los pacientes con una mutación en alguno de los dos genes (SG a los 5 años: 93% vs 76%), (182).

Figura 20: Figuras de Kaplan-Meier de SLE según el estado mutacional del gen BRAF^{V600E}.



4.5.3. Estado de expresión del sistema de reparación de ADN MMR (proteínas MLH1 y MSH2).

El análisis univariante no mostró diferencias significativas en la SLE en función del estado de expresión del sistema MMR ($p = 0,316$) ni de la expresión de las proteínas MLH 1 ($p = 0,719$) y MSH 2 ($p = 0,217$) individualmente. La SLE fue de 43,552 (IC 95% 38,824-48,281) meses en el subgrupo dMMR vs 43,286 (IC 95% 40,237-46,335) meses en el subgrupo cMMR, $p = 0,316$. Numerosos estudios retrospectivos y un metaanálisis, muestran un beneficio en la supervivencia independiente del estadio tumoral del subgrupo de pacientes con dMMR vs los pacientes con cMMR (183,184), beneficio que no ha sido corroborado en nuestro estudio.

4.5.4. Integración de resultados. Análisis multivariante de Cox.

El análisis multivariante se realizó según el método de regresión de Cox, con el fin de revelar cuáles de las variables analizadas eran de pronóstico independiente para nuestra cohorte de pacientes con CCR resecado. En este análisis se incluyeron las variables clínicas, patológicas y moleculares analizadas que fueron significativas para el análisis univariante de *Kaplan-Meier* ($p \leq 0.05$).

De acuerdo con el análisis de regresión de Cox, las variables de pronóstico independiente para la SLE fueron la afectación ganglionar (N), la invasión perineural y el valor de CEA postquirúrgico. Los resultados de este análisis se muestran en la **tabla 25**. Con estos resultados obtenidos realizamos una clasificación de los pacientes en función del número de factores pronósticos negativos independientes presentes, obteniendo 3 categorías (0, 1 y ≥ 2). El análisis de supervivencia realizado según esta clasificación mostró diferencias significativas en la SLE entre los 3 grupos de pacientes ($p < 0,001$), siendo el grupo con 2 o más factores pronósticos asociados el que obtuvo peor SLE. La **tabla 26** muestra el tiempo de SLE en función del número de factores pronósticos y la **figura 21** las curvas de supervivencia de *Kaplan-Meier*.

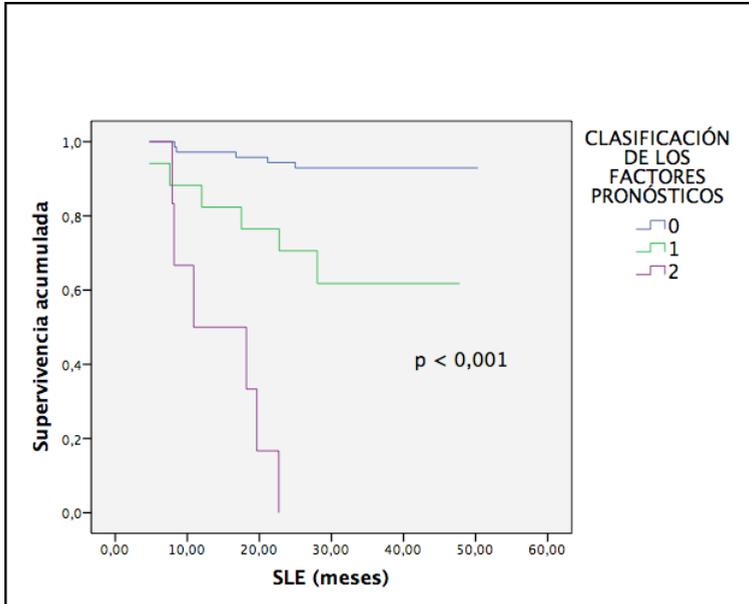
Tabla 25: Análisis de regresión Cox para SLE.

VARIABLES	SLE		
	HR	IC 95%	P
N2	7,141	2,544-20,051	< 0,001
Invasión perineural	5,813	2,160-15,647	< 0,001
CEA post-cirugía	4,95	1,569-15,648	0,006

Tabla 26: Resultado de la SLE en función del número de factores pronósticos independientes.

Número de factores pronóstico	Media del tiempo de SLE			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
0	47,863	1,068	45,770	49,957
1	35,776	4,026	27,885	43,667
≥ 2	14,579	2,607	9,470	19,688
Global	43,913	1,431	41,109	46,717

Figura 21: Figura de Kaplan-Meier de SLE en función del número de factores pronóstico independientes.



0: Ningún factor de mal pronóstico; 1: 1 factor de mal pronóstico; 2: ≥ 2 factores de mal pronóstico.

4.6. Clasificación molecular.

La estadificación patológica continúa siendo clave en la determinación del pronóstico y tratamiento en el CCR. Sin embargo, han surgido diferentes marcadores que influyen en el pronóstico y en la respuesta a los tratamientos independientemente del estadio tumoral, poniendo de manifiesto la heterogeneidad molecular de la enfermedad. A día de hoy, la expresión del sistema MMR se realiza de forma rutinaria en enfermedad resecable, principalmente en estadio II donde tiene valor como factor predictivo de respuesta a las fluoropirimidinas

(185). Por otro lado, la determinación de los genes *RAS* y *BRAF* también se realiza de forma rutinaria en el CCRm en la mayoría de los centros. Como hemos visto anteriormente, tanto el estado de expresión del sistema MMR como el estado mutacional de estos genes están relacionados individualmente con ciertas características clínico-patológicas de la enfermedad y probablemente influyen en el pronóstico de la misma. En los últimos años se han publicado estudios en los que ya no se analiza el valor pronóstico de estos marcadores de forma individual. De hecho, en la enfermedad metastásica, algunos autores recomiendan la clasificación de los pacientes en 3 grupos: *BRAF* mutados, *RAS* mutados o *BRAF/RAS* nativos, tras observar una mayor supervivencia en el último grupo (186–189). En enfermedad resecable, Seppala propone la combinación de la determinación de la IMS y el estado mutacional de *BRAF* para clasificar a los pacientes. En un estudio con 762 pacientes incluidos observaron que el subtipo *IMS/BRAFV600E* tenía un pronóstico favorable respecto al subtipo *EMS* (estabilidad de microsatélites)/*BRAFV600E* nativo (180). Birgisson y colaboradores concluyeron en un estudio con 121 pacientes con estadio II-IV resecado, que el grupo con *IMS* y mutación en el gen *BRAF* tenían menor riesgo de recaída mientras que el grupo con mutación en el gen *KRAS* tenían el riesgo incrementado (190). Sinicrope y colaboradores publicaron en el año 2015 un estudio en el que analizaron la presencia de mutaciones en *KRAS* (codones 12 y 13) y *BRAF* (V600E), así como el estado de expresión del sistema MMR mediante la determinación por IHC de las proteínas *MLH 1*, *MSH 2* y *MSH6*, en 2720 pacientes con estadio III incluidos

en el ensayo NCCTG N0147 que evaluaba la eficacia del esquema de QT FOLFOX \pm cetuximab en adyuvancia. Los autores propusieron 5 subtipos moleculares en función de la expresión de estos 3 marcadores que mostraron diferencias significativas en las características clínicas y patológicas, así como en la SLE (191). Los resultados fueron validados posteriormente en un grupo independiente de 783 pacientes con estadio III.

Basándonos en este trabajo, clasificamos a los 105 pacientes en 5 subtipos moleculares. Los 3 subtipos con el sistema MMR competente (cMMR) incluían tumores sin mutaciones en *RAS* ni *BRAF* (subtipo Tradicional [T]), tumores con alguna mutación en *RAS* (subtipo Alternativo [A]) y tumores con *BRAF* mutado (subtipo Serrado [S]). Los 2 subtipos con deficiencia en el sistema MMR (dMMR) se caracterizaron por ser portadores de la mutación en *BRAF* (subtipo Serrado dMMR [Sd]) o no ser portadores de dicha mutación independientemente del estado mutacional de *RAS* (subtipo Familiar [F]).

En la **tabla 27** se describe la distribución de los pacientes en función de dicha clasificación.

Tabla 27: Clasificación molecular en función de la expresión del sistema MMR y del estado mutacional de *RAS* y *BRAF*.

Total	N 105	% 100
Tradicional (cMMR; <i>BRAF</i> nativo y <i>RAS</i> nativo)	37	35,2%
Alternativo (cMMR; <i>BRAF</i> nativo y <i>RAS</i> mutado)	41	39%
Serrado (cMMR; <i>BRAF</i> mutado y <i>RAS</i> nativo)	7	6,7%
Serrado dMMR (dMMR; <i>BRAF</i> mutado y <i>RAS</i> nativo)	5	4,8%
Familiar (dMMR; <i>BRAF</i> nativo, cualquier estado de <i>RAS</i>)	15	14,3%

4.6.1. Patrón de comportamiento clínico y patológico de los subtipos propuestos.

En la **tabla 28** se detallan las principales características clínico-patológicas en función de los subtipos moleculares.

Tabla 28: Distribución de las características clínico-patológicas en función de los subtipos moleculares.

Características	Subtipos moleculares				
	<i>Tradition al</i> N = 37 (%)	<i>Alternativo</i> N = 41 (%)	<i>Serrado</i> N = 7 (%)	<i>Serrado dMMR</i> N = (%)	<i>Familiar</i> N = 15 (%)
Edad					
≤ 65 años	16 (43%)	11 (27%)	3 (43%)	0	9 (60%)
> 65 años	21 (57%)	30 (73%)	4 (57%)	5 (100%)	6 (40%)
Gender					
Hombre	23 (62%)	29 (70%)	4 (57%)	3 (60%)	9 (60%)
Mujer	14 (38%)	12 (30%)	3 (43%)	2 (40%)	6 (40%)
Localización tumor					
Lado derecho	8 (25%)	18 (44%)	5 (71%)	5 (100%)	12 (80%)
Lado izquierdo	29 (75%)	22 (54%)	2 (29%)	0	3 (20%)
T (TNM 7th ed)					
T 1-2	17 (46%)	12 (28%)	0	0	5 (33%)
T 3-4	20 (54%)	29 (72%)	7 (100%)	5 (100%)	10 (67%)
N (TNM 7th ed)					
N0	27 (73%)	33 (80%)	4 (57%)	3 (60%)	11(73%)
N1	6 (16%)	4 (10%)	2 (29%)	1 (20%)	1 (7%)
N2	3 (11%)	4 (10%)	1 (14%)	1 (20%)	2 (13%)
Estadio (TNM7th)					
I	14 (38%)	12 (29%)	0	0	5 (33%)
II	14 (38%)	21 (51%)	4 (57%)	3 (60%)	7 (47%)
III	9 (24%)	8 (20%)	3 (43%)	2 (40%)	3 (20%)

Características	Subtipos moleculares				
	Traditional N = 37 (%)	Alternativo N = 41 (%)	Serrado N = 7 (%)	Serrado dMMR N = (%)	Familiar N = 15 (%)
Grado histológico					
Alto grado	3 (8%)	3 (7%)	1 (14%)	1 (20%)	5 (33%)
Bajo grado	33 (92%)	38 (93%)	6 (86%)	3 (60%)	10 (67%)
Invasión linfática					
Sí	8 (22%)	11 (27%)	2 (29%)	1 (20%)	2 (13%)
No	29 (78%)	30 (73%)	5 (71%)	4 (80%)	13 (87%)
Invasión venosa					
Sí	0	3 (7%)	0	0	0
No	37 (100%)	38 (93%)	7 (100%)	5 (100%)	15 (100%)
Invasión perineural					
Sí	3 (8%)	7 (17%)	3 (43%)	0	1 (7%)
No	34 (92%)	34 (83%)	4 (57%)	5 (100%)	14 (93%)

Al comparar los patrones clínicos y patológicos de los distintos

subtipos moleculares obtuvimos los siguientes resultados:

- En el subtipo Tradicional se observó un porcentaje de tumores localizados en el colon izquierdo significativamente mayor que en los otros subtipos: Tradicional 78,38% vs Alternativo 55%, $p = 0,030$; vs Serrado 28,57%, $p = 0,017$; vs Serrado dMMR 0%, $p = 0,002$; vs Familiar 20%, $p < 0.001$).
- En los subtipos Serrado dMMR y Familiar el porcentaje de tumores derechos vs el subtipo Alternativo fue significativamente mayor (100% vs 45%, $p = 0,049$; y 80% vs 45%, $p = 0.032$).
- En el subtipo Familiar los pacientes eran más jóvenes que en el subtipo Alternativo (40% mayores de 65 años vs 73,17%, $p =$

0,022) y que en el subtipo Serrado dMMR (40% mayores de 65 años vs 100%, $p = 0,038$), y se observó un mayor porcentaje de tumores de alto grado histológico respecto al subtipo Alternativo (33,33% vs 7,31%, $p = 0,026$) y al Tradicional (33,3% vs 8,3%, $p = 0,039$).

- En el subtipo Serrado se observó un mayor porcentaje de invasión perineural que en el Tradicional (42,85% vs 8,10%, $p = 0,042$).

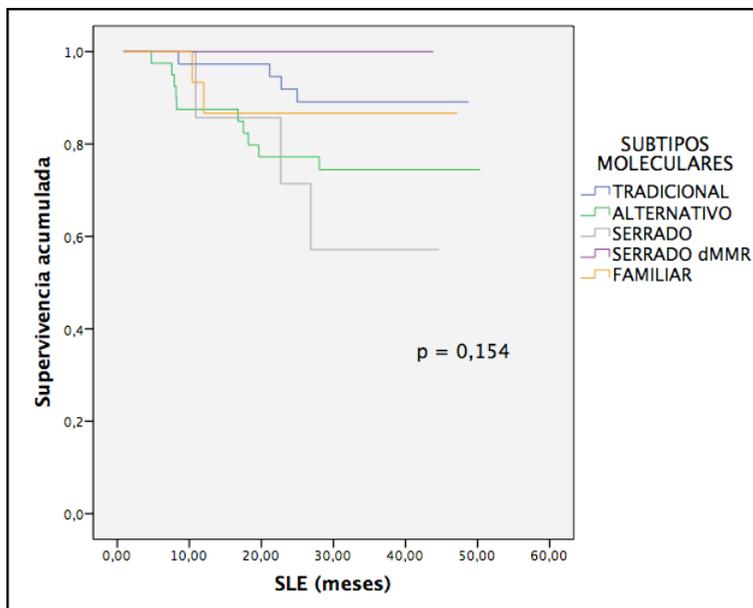
4.6.2. Valor pronóstico de la clasificación propuesta.

En la **tabla 29** se describe el resumen del procesamiento del análisis de supervivencia de los 5 subtipos moleculares, y la **figura 22** muestra las curvas de Kaplan-Meier con la distribución de la SLE.

Tabla 29: Análisis univariante de supervivencia (SLE) de los 5 subtipos moleculares.

Subclasificación molecular	Nº total	Nº de eventos (Recaídas)	Censurados Nº (%)
Tradicional	37	4	33 (89,2%)
Alternativo	41	10	31 (75,6%)
Serrado	7	3	4 (57,1%)
Serrado dMMR	5	0	5 (100%)
Familiar	15	2	13 (86,7%)
Total	105	19	86 (81,9%)
Log Rank p valor = 0,154			

Figura 22: Figuras de Kaplan-Meier de SLE entre los 5 subtipos moleculares propuestos.



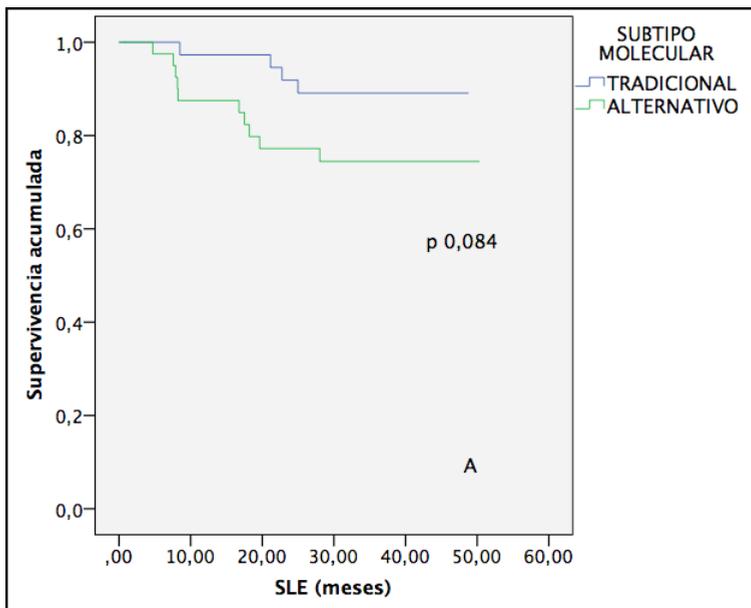
Dentro de los 3 tres subtipos con cMMR, se observó un beneficio en la supervivencia en los pacientes sin ninguna mutación (subtipo Tradicional) comparado con los pacientes con alguna mutación en *RAS* (media de SLE de 45,55 meses, IC 95% 42,521-48,589 vs 40,98 meses, IC 95% 40,724-46,969; p valor = 0,084), o comparado con los pacientes con *BRAF* mutado (media de SLE media de SLE de 45,55 meses, IC 95% 42,521-48,589 vs 34,13 meses, IC 95% 24,576-43,68; p valor = 0,031); (**figura 23**). No se observaron diferencias significativas entre el subtipo Tradicional y los pacientes con dMMR (media de SLE de 45,5 meses [CI 95% 42,52 - 48,58] vs 43,55 meses [CI 95% 38,82 - 48,28]; p = 0,964). Por último, la SLE fue similar entre los pacientes cMMR y alguna

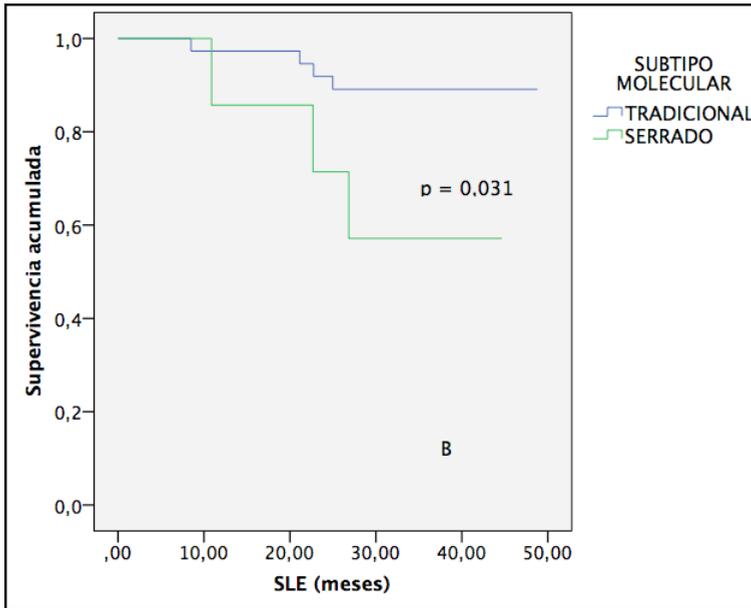
mutación de RAS o BRAF comparado con los pacientes dMMR (SLE media de 40,39 meses [CI 95% 35,705 – 45,080] vs 43,55 meses [CI 95% 38,82 – 48,28]; $p = 0,129$).

Entre los dos subtipos dMMR, no se pudo utilizar el método de Kaplan-Meier para comparar diferencias en supervivencia debido a la falta de eventos (recaídas) en el subtipo Serrado (mutación *BRAF*).

Figura 23: Figuras de Kaplan-Meier de SLE entre los subtipos cMMR.

Comparación de la SLE del subtipo Tradicional con el subtipo Alternativo (A) y con el subtipo Serrado (B).





4.6.3. Integración de resultados.

Después de la resección quirúrgica en el CCR, se necesitan biomarcadores pronóstico precisos más allá del sistema de estadificación TNM. En este sentido, múltiples factores han sido estudiados individualmente sin mucho éxito. El estado mutacional de *RAS* (*KRAS* o *NRAS*) como biomarcador predictivo de la respuesta a los IEGFR y como biomarcador pronóstico en los estadios iniciales no está bien establecido. En consonancia con los datos publicados por otros autores, las mutaciones en *KRAS* o *RAS* se asociaron en nuestro estudio con una peor SLE. Del mismo modo, la presencia de una mutación *BRAF*^{V600E} en etapas tempranas de la enfermedad continúa debatiéndose. Algunos estudios han sugerido que esta mutación es un biomarcador de mal pronóstico excepto en pacientes con dMMR/IMS. Por último,

varios estudios retrospectivos y un metanálisis han mostrado un pronóstico favorable de los pacientes con dMMR/IMS. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio no confirman diferencias en supervivencia en función del estado mutacional de *BRAF* o la expresión del sistema MMR.

Se han propuesto múltiples clasificaciones del CCR teniendo en cuenta la inestabilidad cromosómica, la IMS, la metilación de *MLH1*, el fenotipo metilador de las islas CpG y las mutaciones de *KRAS* y *BRAF*, reflejando la existencia de grupos de tumores con una patogénesis y un comportamiento clínico-patológico diferenciado. Sin embargo, la mayoría son clasificaciones complejas que no han sido implementadas en la práctica diaria. En nuestro estudio se propone una clasificación sencilla en 5 subtipos moleculares utilizando una combinación de 3 biomarcadores cuyo análisis es factible y generalizado, observando algunas diferencias en las principales características clínico-patológicas y en el pronóstico entre ellos.

El subtipo tradicional (pMMR, *BRAF*^{V600E} y RAS nativos) fue el segundo grupo más prevalente (35,2%) y tuvo mejor SLE que los otros subtipos pMMR. El 78% de estos tumores se localizaron en el colon izquierdo. La SLE fue similar entre este subtipo y los tumores dMMR. Todos estos hallazgos están en línea con los resultados obtenidos por Sinicrope y colaboradores en un estudio con 2.720 pacientes con estadio III.

La prevalencia de tumores dMMR/IMS en nuestro estudio (19%) fue similar a la descrita en literatura (15%). Se observó una mayor prevalencia de tumores localizados en el lado derecho del colon (85%), tumores de alto grado (32%) y mutaciones *BRAF*^{V600E}

(25%) en el grupo dMMR en comparación con el grupo pMMR, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Los pacientes incluidos en el subtipo Familiar (dMMR/*BRAF*^{FV600E} nativo) eran más jóvenes y la presencia de invasión perineural fue más frecuente que en el subtipo de Serrado (dMMR/*BRAF*^{FV600E} mutado). De un total de 20 pacientes, 15 fueron clasificados como subtipo Familiar y 5 como Serrado. Se identificaron 2 recaídas en el primer subtipo y ninguna en el segundo. Debido a la falta de eventos en el subtipo Serrado no pudimos estimar las diferencias de supervivencia entre los dos grupos dMMR. Durante el seguimiento ocurrieron 13 recaídas en pacientes con pMMR y cualquier mutación (*BRAF*^{FV600E} o *RAS*) vs 2 en los pacientes dMMR. Este hecho no se reflejó en una supervivencia diferente posiblemente debido a un poder estadístico insuficiente. Sin embargo, otros autores han informado de una mejor supervivencia en pacientes con tumores dMMR, particularmente en el subtipo Serrado.

Con todo, consideramos que la clasificación propuesta es sencilla y fácilmente implementable en la práctica diaria y podría ser de gran utilidad a la hora de estratificar a los pacientes dentro de los ensayos clínicos o intensificar el tratamiento adyuvante en el futuro.

5. CONCLUSIONES FINALES .

1. La determinación de ARNm en sangre periférica de los genes *CEA* y *KRT19* es más sensible como test diagnóstico que la determinación de los antígenos tumorales CEA y CA 19.9, pero menos específica.
2. Dada la sensibilidad y especificidad del análisis de ARNm (en sangre periférica o CTCs) del gen *CEA* en el diagnóstico del CCR, su inclusión en una firma serológica junto con otros marcadores podría ser de utilidad como método de cribado.
3. La determinación de ARNm de los genes *CEA* y *KRT19* antes y/o después de la cirugía no parece ser de utilidad como factor pronóstico en el CCR resecable.
4. El análisis univariante de supervivencia mostró el valor pronóstico de los siguientes factores: antígeno CEA prequirúrgico y postquirúrgico, la extensión del tumor primario (T), la afectación ganglionar (N), el estadio tumoral, la ratio entre el número de nódulos linfáticos afectados y evaluados, la invasión venosa, la invasión linfática, la invasión perineural, el gen *KRAS* y los genes *RAS*.
5. El análisis multivariante de supervivencia mostró el valor pronóstico independiente de la afectación ganglionar (N), la invasión perineural y el valor del marcador tumoral CEA postquirúrgico.
6. La clasificación propuesta en función del número de factores pronósticos parece ser un mejor predictor de SLE que el análisis individual de las variables.
7. La clasificación molecular de los pacientes en función de la expresión del sistema MMR y del estado mutacional de los genes *RAS* y *BRAF* identificó 5 subtipos moleculares con características

clínico-patológicas diferenciadas.

8. El subtipo molecular Tradicional (cMMR, *RAS/BRAF* nativos) mostró un beneficio significativo en la SLE respecto a los otros dos subtipos cMMR sin observar diferencias con los subtipos dMMR.

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Boveri T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci* [Internet]. 2008;121 Suppl(Supplement 1):1–84.
2. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Vol. 30, Carcinogenesis*. 2009. p. 1073–81.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Vol. 144, Cell*. 2011. p. 646–74.
4. R.C Pezo P. B. Definition: Translational and personalised medicine, biomarkers, pharmacodynamics. In: Giampaolo Tortosa, Cristiana Sessa, Aldo Scarpa SB, editor. *ESMO handbook of translational research*. 2^a. Switzerland: ESMO; 2015. p. 1–10.
5. Simon RM, Paik S HD. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:1445–52.
6. Gonzalez Baron M. Importancia de los factores pronósticos en oncología. Visión general. In: Barón G, editor. *Importancia de los factores pronósticos en Oncología*. 2^a edición. McGraw-Hill/Interamericana; 2005. p. 43–55.
7. George S. Identification and assessment of prognostic factors. *Semin Oncol*. 1998;15:462–71.
8. Yamashita K, Watanabe M. Clinical significance of tumor markers and an emerging perspective on colorectal cancer. *Vol. 100, Cancer Science*. 2009. p. 195–9.
9. Tsai HL, Chu KS, Huang YH, Su YC, Wu JY, Kuo CH, et al. Predictive factors of early relapse in UICC stage I-III colorectal cancer patients after curative resection. *J Surg Oncol*. 2009;100(8):736–43.
10. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL.6):64–72.
11. NCCN. *NCCN Guidelines, Versión 1.2017. Colon Cancer*. <http://www.nccn.org>. 2017.
12. Gazzaniga P, Raimondi C, Nicolazzo C, Carletti R, di Gioia C, Gradilone A, et al. The rationale for liquid biopsy in colorectal cancer: a focus on circulating tumor cells. *Expert*

- Rev Mol Diagn. 2015;15(7):925–32.
13. Goto T, Hirotsu Y, Oyama T, Amemiya K, Omata M. Analysis of tumor-derived DNA in plasma and bone marrow fluid in lung cancer patients. *Med Oncol*. 2016;33(3):1–5.
 14. Thierry AR. A targeted Q-PCR-based method for point mutation testing by analyzing circulating DNA for cancer management care. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2016. p. 1–16.
 15. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2008;8(5):329–40.
 16. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XHF, Norton L, et al. Tumor Self-Seeding by Circulating Cancer Cells. *Cell*. 2009;139(7):1315–26.
 17. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. Vol. 147, *Cell*. 2011. p. 275–92.
 18. Nelson N. Circulating tumor cells: will they be clinically useful? *J Natl Cancer Inst*. 2010;3(102):146–8.
 19. Andree KC, van Dalum G, Terstappen LWMM. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. Vol. 10, *Molecular Oncology*. 2016. p. 395–407.
 20. Parkinson DR, Dracopoli N, Gumbs Petty B, Compton C, Cristofanilli M, Deisseroth A, et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med* [Internet]. 2012;10(1):138.
 21. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897–904.
 22. Cohen SJ, Punt CJ a, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008;26(19):3213–21.
 23. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin*

- Cancer Res. 2006;12(14 Pt 1):4218–24.
24. Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(23):7053–8.
 25. Harouaka R, Kang Z, Zheng S-Y, Cao L. Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2014;141(2):209–21.
 26. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, Van Der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(1):61–6.
 27. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *supple. Science* [Internet]. 2013;339(6119):580–4.
 28. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* [Internet]. 1988;319(9):525–32.
 30. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics , 2015 . *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2015;65(1):29.
 31. Bailey, CE, Hu,CY, You N et al. Increasing Disparities in Age-Related Incidence of Colon and Rectal Cancer in the United States, 1975-2010. *JAMA Surg* 2015. 2015;6(2):356–72.
 32. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. Vol. 11, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013. p. <http://globocan.iarc.fr>.
 33. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2001;96(10):2992–3003.
 34. Cottet V, Pariente A, Nalet B, Lafon J, Milan C, Olschwang S, et al. Colonoscopic screening of first-degree relatives of patients with large adenomas: increased risk of colorectal tumors.[see comment]. *Gastroenterology.* 2007;133(4):1086–92.
 35. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch

- syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5783–8.
36. Alexander DD, Weed DL, Cushing CA, Lowe KA. Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev [Internet]*. 2011;20(4):293–307.
 37. Gonzalez CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer*. 2010;46(14):2555–62.
 38. Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ [Internet]*. 2011;343:d6617.
 39. Zhu B, Sun Y, Qi L, Zhong R, Miao X. Dietary legume consumption reduces risk of colorectal cancer: evidence from a meta-analysis of cohort studies. *Sci Rep*. 2015;5:8797.
 40. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer*. 2009;125(1):171–80.
 41. Walter V, Jansen L, Hoffmeister M, Ulrich A, Chang-Claude J, Brenner H. Smoking and survival of colorectal cancer patients: Population-based study from Germany. *Int J Cancer*. 2015;137(6):1433–45.
 42. Fedewa SA, Sauer AG, Siegel RL, Jemal A. Prevalence of major risk factors and use of screening tests for cancer in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev [Internet]*. 2015;24(4):637–52.
 43. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera E V, et al. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin [Internet]*. 2012;62(1):30–67.
 44. Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(3):556–65.

45. Edwards BK, Ward E, Kohler B a, Zauber AG, Anderson RN, Jemal A, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2006, Featuring Colorectal Trends and Impact of Interventions (Risk Factors, Screening, and Treatment) to Reduce Future Rates. 2010;116(3):544–73.
46. El Zoghbi M, Cummings LC. New era of colorectal cancer screening. *World J Gastrointest Endosc* [Internet]. 2016;8(5):252–8.
47. Warren JL, Klabunde CN, Mariotto AB, Meekins A, Topor M, Brown ML, et al. Adverse events after outpatient colonoscopy in the Medicare population. *Ann Intern Med*. 2009;150(12):849–57.
48. Baxter NN, Goldwasser MA, Paszat LF, Saskin R, Urbach DR, Rabeneck L. Association of colonoscopy and death from colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2009;150(1):1–8.
49. Baxter NN, Warren JL, Barrett MJ et al. Association between colonoscopy and colorectal cancer mortality in a US cohort according to site of cancer and colonoscopist specialty. *J Clin Oncol*. 2012;30:2664–9.
50. Brenner H, Chang-Claude J, Seiler CM, Rickert A, Hoffmeister M. Protection from colorectal cancer after colonoscopy: A population-based, case-control study. *Ann Intern Med*. 2011;154(1):22–30.
51. Adler A, Geiger S, Keil A, Bias H, Schatz P, deVos T, et al. Improving compliance to colorectal cancer screening using blood and stool based tests in patients refusing screening colonoscopy in Germany. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2014;14(1):183.
52. Fletcher RH. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med* [Internet]. 1986;104(1):66–73.
53. Chen H, Werner S, Butt J, Zörnig I, Knebel P, Michel A, et al. Prospective evaluation of 64 serum autoantibodies as biomarkers for early detection of colorectal cancer in a true screening setting. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(13).
54. Butvilovskaya VI, Popletaeva SB, Chechetkin VR, Zubtsova ZI, Tsybul'skaya M V., Samokhina LO, et al. Multiplex determination of serological signatures in the sera of colorectal cancer patients using hydrogel biochips. *Cancer Med* [Internet]. 2016;5(7):1361–72.
55. De Maio G, Rengucci C, Zoli W, Calistri D. Circulating and stool nucleic acid analysis for colorectal cancer diagnosis.

- World J Gastroenterol. 2014;20(4):957-67.
56. Blanco-Calvo M, Concha A, Figueroa A GF and V-AM. Colorectal cancer classification and cell heterogeneity: A systems oncology approach. Vol. 16, International Journal of Molecular Sciences. 2015. p. 13610-32.
 57. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;362(13):1246; author reply 1246-1247.
 58. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol.* 2002;20(4):1043-8.
 59. Rodríguez-Moranta F, Castells A, Andreu M, Piñol V et al. Clinical performance of original and revised Bethesda guidelines for the identification of MSH2/MLH1 gene carriers in patients with newly diagnosed colorectal cancer: proposal of a new and simpler set of recommendations. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(5):1104-11.
 60. Lanza G, Gafà R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006;24(15):2359-67.
 61. Issa J-P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(12):988-93.
 62. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov [Internet].* 2008;7(12):979-87.
 63. Grady WM, Rajput A, Myeroff L, Liu DF, Kwon K, Willis J MS. Mutation of the type II transforming growth factor- β receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res.* 1998;58:3101-4.
 64. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature.* 1987;327(6120):293-7.
 65. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature [Internet].* 2002;417(6892):949-54.
 66. Silvia Benvenuti, Andrea Sartore-Bianchi, Federica Di

- Nicolantonio, Carlo Zanon, Mauro Moroni, Silvio Veronese SS and AB. Oncogenic Activation of the RAS/RAF Signaling Pathway Impairs the Response of Metastatic Colorectal Cancers to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Therapies. *Cancer Res.* 2007;67(6):2643-8.
67. Han C-B, Li F, Ma J-T, Zou H-W. Concordant KRAS mutations in primary and metastatic colorectal cancer tissue specimens: a meta-analysis and systematic review. *Cancer Invest [Internet]*. 2012;30(10):741-7.
 68. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol [Internet]*. 2011;8(12):686-700.
 69. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. Vol. 101, *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007. p. 805-15.
 70. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature [Internet]*. 2012;487(7407):330-7.
 71. De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LPMH, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med [Internet]*. 2013;19(5):614-8.
 72. Sadanandam a, Lyssiotis C a, Homicsko K, Collisson E a, Gibb WJ, Wullschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med [Internet]*. 2013;19(5):619-25.
 73. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350-6.
 74. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol*. 2010;28(2):264-71.
 75. Edge T. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL TA, editor. New York: Springer; 2010.
 76. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*

- [Internet]. 2009;27(19):3109–16.
77. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL.6).
 78. O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G, Paik S, Clark-Langone KM, Lopatin M, et al. Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol*. 2010;28(25):3937–44.
 79. Gray RG, Quirke P, Handley K, Lopatin M, Magill L, Baehner FL, et al. Validation Study of a Quantitative Multigene Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay for Assessment of Recurrence Risk in Patients With Stage II Colon Cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(35):4611–9.
 80. Yothers G, O'Connell MJ, Lee M, Lopatin M, Clark-Langone KM, Millward C, et al. Validation of the 12-gene colon cancer Recurrence Score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. *J Clin Oncol*. 2013;31(36):4512–9.
 81. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(1):17–24.
 82. Salazar R, Tabernero J M V. Validation of genomic classifier (ColoPrint) for predicting outcome in the T3-MSS subgroup of stage II colon cancer patients [abstract]. In: *ASCO Meeting Abstracts*. 2012. p. 3510.
 83. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):979–94.
 84. Sabbagh C, Mauvais F, Cosse C, Rebibo L, Joly J-P, Dromer D, et al. A lymph node ratio of 10% is predictive of survival in stage III colon cancer: a French regional study. *Int Surg* [Internet]. 2014;99(4):344–53.
 85. Mary Kay Washington, MD, PhD, Jordan Berlin, MD, Philip Branton, MD. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and

- Rectum. Arch Pathol Lab Med. 2009;133(10):1539–51.
86. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res [Internet]. 2001;29(9):e45.
 87. Stephen A. Bustin, Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellems, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, Tania Nolan, Michael W. Pfaffl, Gregory L. Shipley, Jo Vandesompele and CTW. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611–22.
 88. Machin, D; Campbell, MJ; Tan, SB; Tan S. Sample Size Tables for Clinical Studies. Third edit. Sons JW&, editor. Chichester: Wiley-Blackwell; 2009. 253 p.
 89. Blanc B, Finch CA HL et al. Nutritional anaemias. Report of a WHO Scientific Group. WHO Tech Rep Ser. 1968;(405):1–40.
 90. Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. Quantitative Real-time RT – PCR Detection for Survivin , CK20 and CEA in Peripheral Blood of Colorectal Cancer Patients. J Clin Oncol. 2008;38(11):770–6.
 91. Ogata Y, Murakami H, Sasatomi T, Ishibashi N, Mori S, Ushijima M, et al. Elevated preoperative serum carcinoembryonic antigen level may be an effective indicator for needing adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of stage II colon cancer. J Surg Oncol. 2009;99(1):65–70.
 92. Kim JY, Kim NK. Prognostic value of postoperative CEA clearance in rectal cancer patients with high preoperative CEA levels. Vol. 53, Diseases of the Colon and Rectum. 2010. p. 1102.
 93. Huh JW, Kim CH, Lim SW, Kim HR, Kim YJ. Factors predicting long-term survival in colorectal cancer patients with a normal preoperative serum level of carcinoembryonic antigen. J Cancer Res Clin Oncol. 2013;139(9):1449–55.
 94. Wyld DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J, et al. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. Int J Cancer [Internet]. 1998;79(3):288–93.
 95. Holdenrieder S, Holubec L, Topolcan O, Finek J, Stieber P.

- Circulating nucleosomes and cytokeratin 19-fragments in patients with colorectal cancer during chemotherapy. In: *Anticancer Research*. 2005. p. 1795–801.
96. Kijima M, Togo S, Ichikawa Y, Miura M, Yamagishi S, Matsuo K, et al. Clinical significance of serum CEA protein and CEA mRNA after resection of colorectal liver metastases. *Anticancer Res*. 2005;25(2 B):1327–32.
 97. Miura M, Ichikawa Y, Tanaka K, Kamiyama M, Hamaguchi Y, Ishikawa T, et al. Real-time PCR (TaqMan PCR) quantification of carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Anticancer Res*. 2003;23(2 B):1271–6.
 98. Schuster R, Max N, Mann B, Heufelder K, Thilo F, Grone J, et al. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int J cancer*. 2004;108(2):219–27.
 99. Wang J-Y, Wu C-H, Lu C-Y, Hsieh J-S, Wu D-C, Huang S-Y, et al. Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis. *World J Surg* [Internet]. 2006;30(6):1007–13.
 100. Dong XU, Xu-fen LI, Shu Z, Wen-zhi J. Quantitative real-time RT-PCR detection for CEA , CK20 and CK19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients *. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006;7(6):445–51.
 101. Parra-Blanco A, Gimeno-García AZ, Quintero E, Nicolás D, Moreno SG, Jiménez A, et al. Diagnostic accuracy of immunochemical versus guaiac faecal occult blood tests for colorectal cancer screening. *J Gastroenterol*. 2010;45(7):703–12.
 102. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, et al. Meta-analysis Shows That Detection of Circulating Tumor Cells Indicates Poor Prognosis in Patients With Colorectal Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2010;138(5):1714–1726.e13.
 103. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LW, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Color Cancer* [Internet]. 2006;6(2):125–32.

104. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2009;20(7):1223–9.
105. Iinuma H, Okinaga K, Egami H, Mimori K, Hayashi N, Nishida K, et al. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2006;28(2):297–306.
106. Allen-Mersh TG, McCullough TK, Patel H, Wharton RQ, Glover C, Jonas SK. Role of circulating tumour cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma. *Br J Surg [Internet].* 2007;94(1):96–105.
107. Lu C-Y, Uen Y-H, Tsai H-L, Chuang S-C, Hou M-F, Wu D-C, et al. Molecular detection of persistent postoperative circulating tumour cells in stages II and III colon cancer patients via multiple blood sampling: prognostic significance of detection for early relapse. *Br J Cancer [Internet].* 2011 Mar 29;104(7):1178–84.
108. UEN Y-H, Lu C-Y TH-L et al. Persistent presence of postoperative circulating tumor cells is a poor prognostic factor for patients with stage I-III colorectal cancer after curative resection. *Ann Surg Oncol.* 2008;15:2120–8.
109. Sotelo MJ, Sastre J, Maestro ML, Veganzones S, Viñuales JM, Alonso V, et al. Role of circulating tumor cells as prognostic marker in resected stage III colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2015;26(3):535–41.
110. Bork U, Rahbari NN, Schölch S, Reissfelder C, Kahlert C, Büchler MW, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *Br J Cancer [Internet].* 2015;112(8):1306–13.
111. Ito M, Kanno S, Nosho K, Sukawa Y, Mitsuhashi K, Kurihara H, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer.* 2015;137(6):1258–68.
112. Mima K, Cao Y, Chan AT, Qian ZR, Nowak JA, Masugi Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location. *Clin Transl Gastroenterol [Internet].* 2016;7(11):e200.
113. Dunne JR, Cannon CJ, Osborn TM, Taylor MD, Malone DL,

- Napolitano LM. Preoperative anemia in colon cancer: Assessment of risk factors. *Am Surg*. 2002;68(6):582-7.
114. Benoist S, Panis Y, Pannegeon V, AA and VP. Predictive factors for perioperative blood transfusions in rectal resection for cancer: A multivariate analysis of a group of 212 patients. *Surgery*. 2001;129(4):433-9.
 115. Durán L, Moral V, Basora M, José Colomina M, Vicente Llau J, Andrés Sánchez C, et al. Estudio epidemiológico de la anemia preoperatoria en pacientes sometidos a cirugía oncológica en España. Estudio RECIRON. *Cirugía española*. 2009;85(1):45-52.
 116. Saleh EA, Lithy R, Morshed M, Khafagy W, Abd MH, Waleed O, et al. Utility of serum preoperative carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients. *Hepatogastroenterology*. 2009;56(90):361-6.
 117. K. Sreide JS and HK. Prognostic role of carcinoembryonic antigen is influenced by microsatellite instability genotype and stage in locally advanced colorectal cancers. *World J Surg*. 2011;35(4):888-94.
 118. Huh JW, Oh BR, Kim HR, Kim YJ. Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in potentially curative colon cancer. *J Surg Oncol*. 2010;101(5):396-400.
 119. Lin JK, Lin CC, Yang SH, Wang HS, Jiang JK, Lan YT, et al. Early postoperative CEA level is a better prognostic indicator than is preoperative CEA level in predicting prognosis of patients with curable colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26(9):1135-41.
 120. Li Destri G, Rubino AS, Latino R, Giannone F, Lanteri R, Scilletta B, et al. Preoperative Carcinoembryonic Antigen and Prognosis of Colorectal Cancer. An Independent Prognostic Factor Still Reliable. *Int Surg [Internet]*. 2015;100(4):617-25.
 121. Lacy AM, García-Valdecasas JC, Delgado S, Castells A, Taurá P, Piqué JM, et al. Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: A randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9325):2224-9.
 122. Sarli L, Bader G, Iusco D, Salvemini C, Di Mauro D, Mazzeo A, et al. Number of lymph nodes examined and prognosis of TNM stage II colorectal cancer. *Eur J Cancer*.

- 2005;41(2):272-9.
123. Nedrebo B, Soreide K, Nesbakken a, Eriksen M, Soreide J, Korner H. Risk factors associated with poor lymph node harvest after colon cancer surgery in a national cohort. *Colorectal Dis* [Internet]. 2013;15(6):e301-8.
 124. Berg M, Guriby M, Nordgard O, Nedrebo BS, Ahlquist TC, Smaaland R, et al. Influence of microsatellite instability and KRAS and BRAF mutations on lymph node harvest in stage I-III colon cancers. *Mol Med*. 2013;19:286-93.
 125. Belt EJT, te Velde EA, Krijgsman O, Brosens RPM, Tijssen M, van Essen HF, et al. High lymph node yield is related to microsatellite instability in colon cancer. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2012;19(4):1222-30.
 126. Kadowaki S, Kakuta M, Takahashi S, Takahashi A, Arai Y, Nishimura Y, et al. Prognostic value of KRAS and BRAF mutations in curatively resected colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2015;21(4):1275-83.
 127. Samara M, Kapatou K, Ioannou M, Kostopoulou, Papamichali R, Papandreou C, et al. Mutation profile of KRAS and BRAF genes in patients with colorectal cancer: Association with morphological and prognostic criteria. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):16793-802.
 128. Uetake H, Watanabe T, Yoshino T, Yamazaki K et al. Clinicopathological features of patients with colorectal cancer among KRAS wild type p.G13D and other mutations: results from a multicenter, cross-sectional study by the Japan Study Group of KRAS mutation in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:3605.
 129. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M et al. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: A population based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:1193-7.
 130. Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Walters RJ, Pearson S, et al. Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. *Mod Pathol* [Internet]. 2013;26(6):825-34.
 131. Elnatan J, Goh HS, Smith DR. C-KI-RAS activation and the biological behaviour of proximal and distal colonic adenocarcinomas. *Eur J Cancer*. 1996;32(3):491-7.
 132. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke

- PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter 'RASCAL' study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(9):675–84.
133. Kressner U, Bjørheim J, Westring S, Wahlberg SS, Pålman L, Glimelius B, et al. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1998;34(4):518–21.
 134. Bures J, Palicka V, Jandik P, Langr F, Nejedla E. A relationship between K-ras gene mutations and some clinical and histologic variables in patients with primary colorectal carcinoma. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 1999;37(7):723–7.
 135. Hardingham JE, Butler WJ, Roder D, Dobrovic a, Dymock RB, Sage RE, et al. Somatic mutations, acetylator status, and prognosis in colorectal cancer. *Gut* [Internet]. 1998;42(5):669–72.
 136. Chen D, Huang J-F, Liu K, Zhang L-Q, Yang Z, Chuai Z-R, et al. BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(3):e90607.
 137. Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G CS. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev.* 2016;51:19–26.
 138. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: Molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. In: *Familial Cancer.* 2008. p. 27–39.
 139. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI et al. Genomic instability in colorectal cancer: Relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res.* 1993;53:5849–52.
 140. Kim H, Jen J, Vogelstein B et al. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* 1994;145(148–156).
 141. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer. *JAMA Oncol* [Internet].
 142. Missiaglia E, Jacobs B, D'Ario G, Di Narzo AF, Sonesson C, Budinska E, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Oncol.* 2014;25(10):1995–2001.

143. Mehrkhani F, Nasiri S, Donboli K, Meysamie a, Hedayat a. Prognostic factors in survival of colorectal cancer patients after surgery. *Colorectal Dis* [Internet]. 2009;11(2):157–61.
144. Jeon BG, Shin R, Chung JK, Jung IM, Heo SC. Individualized cutoff value of the preoperative carcinoembryonic antigen level is necessary for optimal use as a prognostic marker. *Ann Coloproctol*. 2013;29(3):106–14.
145. Quah H-M, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* [Internet]. 2008;51(5):503–7.
146. Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiah M, Mahan M, Pragatheeshwar KD, Pingpank JF, et al. C-stage in colon cancer: Implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(8):689–97.
147. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. Vol. 24, *Journal of Clinical Oncology*. 2006. p. 5313–27.
148. Slentz K, Senagore A, Hibbert J, Mazier WP, Talbott TM. Can preoperative and postoperative CEA predict survival after colon cancer resection? *Am Surg* [Internet]. 1994;60(7):522–8.
149. Kwan Mo Yang, In Ja Park, Chan Wook Kim, Seon Ae Roh, Dong-Hyung Cho JCK. The prognostic significance and treatment modality for elevated pre- and postoperative serum CEA in colorectal cancer patients. *Ann Surg Treat Res*. 2016;91(4):165–71.
150. Wang JY, Lu CY, Chu KS, Ma CJ WD, HL T. Prognostic significance of pre- and postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with colorectal cancer. *Eur Surg Res*. 2007;39:245–50.
151. Filiz AI, Sucullu I, Kurt Y, Karakas DO Gulec B AM. Persistent high postoperative carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients: is it important? *Clinics*. 2009;64:287–94.
152. Nicolini A, Ferrari P, Duffy MJ, Antonelli A, Rossi G, Metelli MR, et al. Intensive risk-adjusted follow-up with the CEA, TPA, CA19.9, and CA72.4 tumor marker panel and abdominal ultrasonography to diagnose operable

- colorectal cancer recurrences: effect on survival. *Arch Surg* [Internet]. 2010;145(12):1177–83.
153. Carpelan-Holmström M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Järvinen H, Haglund C. CEA, CA 242, CA 19-9, CA 72-4 and hCGβ in the diagnosis of recurrent colorectal cancer. *Tumor Biol*. 2004;25(5–6):228–34.
 154. Lumachi F, Marino F, Orlando R, Chiara GB, Basso SMM. Simultaneous multianalyte immunoassay measurement of five serum tumor markers in the detection of colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2012;32(3):985–8.
 155. Di B, Li Y, Wei K, Xiao X, Shi J, Zhang Y, et al. Laparoscopic versus open surgery for colon cancer: A meta-analysis of 5-year follow-up outcomes. Vol. 22, *Surgical Oncology*. 2013.
 156. Greene F. *AJCC Cancer Staging Atlas*. Greene FL, Compton CC, Fritz AG, Shah JWD, editor. New York: Springer; 2006.
 157. Blenkinsopp WK, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G, Fielding LP. Histopathology reporting in large bowel cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 1981;34(5):509–13.
 158. Di Fabio F, Nascimbeni R, Villanacci V, Baronchelli C, Bianchi D, Fabbretti G, et al. Prognostic variables for cancer-related survival in node-negative colorectal carcinomas. *Dig Surg*. 2004;21(2):128–33.
 159. Fujita S, Shimoda T, Yoshimura K, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y. Prospective Evaluation of Prognostic Factors in Patients With Colorectal Cancer Undergoing Curative Resection. Vol. 84, *Journal of Surgical Oncology*. 2003. p. 127–31.
 160. Anwar MA, D'Souza F, Coulter R, Memon B, Khan IM, Memon MA. Outcome of acutely perforated colorectal cancers: Experience of a single district general hospital. *Surg Oncol*. 2006;15(2):91–6.
 161. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: A secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol*. 2003;21(15):2912–9.
 162. Bilimoria KY, Palis B, Stewart AK, Bentrem DJ, Freel AC, Sigurdson ER, et al. Impact of tumor location on nodal evaluation for colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(2):154–61.
 163. Lykke J, Roikjaer O, Jess P. The relation between lymph

- node status and survival in Stage I-III colon cancer: results from a prospective nationwide cohort study. *Colorectal Dis* [Internet]. 2013;15(5):559–65.
164. Ramos-Esquivel, Juárez M, González I, Porrás J RL. Prognosis impact of the lymph node ratio in patients with colon adenocarcinoma: a single-centre experience. *J Gastrointest Cancer*. 2014;45(2):133–6.
 165. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2013;369(11):1023–34.
 166. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol* [Internet]. 2015;26(1):13–21.
 167. Hesham M. Hassabo, Ibrahim Halil Sahin, Syed Mohammad Ali Kazmi, Salwan S. Al Mutar, Diogo Bugano Diniz Gomes, Tunghi May Pini, Eduardo Vilar Sanchez, Arvind Dasari, Scott Kopetz, Michael J. Overman, Cathy Eng, Bryan K Kee, Jean-Nicolas Vauthey, Manal Has CRG. Associations between patient (pt) colorectal cancer (CRC) tumor KRAS and BRAF mutation (mut) status and overall survival (OS) [Internet]. Vol. 32, *Journal of Clinical Oncology*. 2014. p. no pagination.
 168. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, 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*. 2010;28(3):466–74.
 169. S. R. Alberts, D. J. Sargent, T. C. Smyrk, A. F. Shields, E. Chan, R. M. Goldberg, S. Gill, M. S. Kahlenberg, S. N. Thibodeau SN. Adjuvant mFOLFOX6 with or without cetuximab (Cmab) in KRAS wild-type (WT) patients (pts) with resected stage III colon cancer (CC):results from NCCTG Intergroup phase III Trial N0147. *J Clin Oncol*. 2010;28(18s).
 170. Lee D-W, Kim KJ, Han S-W, Lee HJ, Rhee YY, Bae JM, et al. KRAS Mutation is Associated with Worse Prognosis in Stage III or High-risk Stage II Colon Cancer Patients Treated with Adjuvant FOLFOX. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2014;187–94.

171. Osumi H, Shinozaki E, Suenaga M, Matsusaka S, Konishi T, Akiyoshi T, et al. RAS mutation is a prognostic biomarker in colorectal cancer patients with metastasectomy. *Int J Cancer*. 2016;139(4):803–11.
172. Sílvia Guerrero, Isolda Casanova, Lourdes Farré, Adela Mazo GC and RM. K-ras Codon 12 Mutation Induces Higher Level of Resistance to Apoptosis and Predisposition to Anchorage-independent Growth Than Codon 13 Mutation or Proto-Oncogene Overexpression. *Cancer Res*. 2000;60(23):6750–6.
173. Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, Oates J DB. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer*. 2001;85(5):692–6.
174. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, Alberts SR, Mahoney MR, Nelson GD, et al. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res*. 2014;20(11):3033–43.
175. Venderbosch S, Nagtegaal ID MT et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res*. 2014;20:5322–5330.
176. Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):2011–9.
177. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, Agarwal A, Maru DM, Sieber O DJ. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011;117(20):4623–32.
178. Rowland a, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon R a, Karapetis CS, et al. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer [Internet]*. 2015;112(12):1888–94.
179. Zhu L, Dong C, Cao Y, Fang X, Zhong C, Li D YY. Prognostic

- role of BRAF mutation in stage II/III colorectal cancer receiving curative resection and adjuvant chemotherapy: a meta-analysis based on randomized clinical trials. *PLoS One*. 2016;11(5):1–12.
180. Seppälä TT, Böhm JP, Friman M, Lahtinen L, Väyrynen VMJ, Liipo TKE, et al. Combination of microsatellite instability and BRAF mutation status for subtyping colorectal cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2015;112(12):1966–75.
 181. Chen KH, Lin YL, Liao JY, Tsai JH, Tseng LH, Lin LI, et al. BRAF mutation may have different prognostic implications in early- and late-stage colorectal cancer. *Med Oncol*. 2016;33(5).
 182. De Cuba EM V, Snaebjornsson P, Heideman DAM, Van Grieken NCT, Bosch LJW, Fijneman RJA, et al. Prognostic value of BRAF and KRAS mutation status in stage II and III microsatellite instable colon cancers. *Int J Cancer*. 2016;138(5):1139–45.
 183. Kakar S, Aksoy S, Burgart LJ, Smyrk TC. Mucinous carcinoma of the colon: correlation of loss of mismatch repair enzymes with clinicopathologic features and survival. *Mod Pathol*. 2004;17(6):696–700.
 184. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005;23(3):609–18.
 185. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3219–26.
 186. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2011;377(9783):2103–14.
 187. Morris VK, Lucas FAS, Overman MJ, Eng C, Morelli MP, Jiang ZQ, et al. Clinicopathologic characteristics and gene expression analyses of non-KRAS 12/13, RAS-mutated metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(10):2008–14.
 188. Saridaki Z, Tzardi M, Sfakianaki M, Papadaki C, Voutsina A, Kalykaki A, et al. BRAFV600E mutation analysis in patients

- with metastatic colorectal cancer (mCRC) in daily clinical practice: Correlations with clinical characteristics, and its impact on patients' outcome. *PLoS One*. 2013;8(12).
189. Sorbye H, Dragomir A, Sundström M, Pfeiffer P, Thunberg U, Bergfors M, et al. High BRAF mutation frequency and marked survival differences in subgroups according to KRAS/BRAF mutation status and tumor tissue availability in a prospective population-based metastatic colorectal cancer cohort. *PLoS One*. 2015;10(6).
 190. Birgisson H, Edlund K, Wallin U, Pählman L, Kultima H, Mayrhofer M, et al. Microsatellite instability and mutations in BRAF and KRAS are significant predictors of disseminated disease in colon cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2015;15(1):125.
 191. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology* [Internet]. 2015;148(1):88–99.

7. ANEXOS.

7.1. Dictámen de la Comisión de Investigación.



CONSELLERIA DE SANITAT I CONSUM

HOSPITAL DE SAGUNT I C.E.

Avd. Ramón y Cajal, s/n
46520 PUERTO SAGUNTO (Valencia)
Tfno. 265 94 00. Fax 265 94 40

INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN

D. JOSÉ ANTONIO QUEIPO ZARAGOZÁ, Secretario de la Comisión de Investigación del Hospital de Sagunto,

CERTIFICA QUE:

El Proyecto de Investigación titulado:

“Detección de células tumorales circulantes en cáncer colorrectal en estadios II-III mediante un panel de genes seleccionados: utilidad como factor pronóstico”, con número de expediente CI 08.2010 ha sido valorado favorablemente por esta Comisión en su reunión celebrada el pasado 23 de noviembre del 2010. El equipo investigador tiene amplia experiencia en el tema y dispone de los medios y recursos necesarios para llevarlo a cabo en nuestro Centro, por lo que se considera viable en todos sus términos.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, se expide el presente informe en el Hospital de Sagunto, a 23 de noviembre del 2010.



Fdo.: José Antonio Queipo Zaragoza
SECRETARIO COMISIÓN INVESTIGACIÓN

7.2. Resolución de las ayudas para proyectos de grupos emergentes en centros asistenciales concedidas por la Conselleria de Sanidad en 2011.

Num. 6607 / 13.09.2011



31975

Conselleria de Sanitat

RESOLUCIÓ de 30 d'agost de 2011, del conseller de Sanitat, per la qual es concedixen ajudes per al desenvolupament de projectes de grups emergents en centres assistencials, a desenvolupar durant l'any 2011 (annex III). [2011/9336]

Per l'Orde de 22 de desembre de 2010 de la Conselleria de Sanitat (*Diari Oficial de la Comunitat Valenciana* núm. 6428, de 30.12.2010), es van establir les bases reguladores i es van convocar en l'annex III ajudes per al desenvolupament de projectes de grups emergents en centres assistencials, a desenvolupar durant l'any 2011.

En els pressupostos de la Generalitat Valenciana per a l'exercici 2011 hi ha una dotació de 100.000 euros (cent mil euros) en el programa pressupostari 10.01.62.0000.411.50.4, corresponents als codis de línia T6667000, destinada al finançament d'ajudes per a fomentar la investigació sanitària i biomèdica.

Vist que les entitats representades pel personal investigador que al final es relaciona, han sol·licitat ajudes per a finançar el desenvolupament de projectes d'investigació de grups emergents en centres assistencials, en els termes que preveu l'Orde de referència.

Atesa la normativa d'aplicació general i examinats els projectes d'investigació objecte de la convocatòria:

Vista la proposta formulada per la comissió avaluadora de les ajudes, prenent en consideració l'avaluació individualitzada de les sol·licituds feta per l'Agència Valenciana d'Avaluació i Prospectiva (AVAP) en els aspectes científicotècnics, corresponent a un 85% de la nota total, i per l'òrgan gestor de les ajudes el restant 15%, corresponent a l'adequació de les temàtiques dels projectes als objectius de la convocatòria, tal com s'establix en l'annex III de l'esmentada orde, s'ha procurat garantir l'eficàcia i eficiència de les actuacions i s'ha ajustat les possibles ajudes als recursos previstos per al 2011, resolc:

El següent sobre els expedients de sol·licitud d'ajudes presentats:

Primer

Concedir les ajudes per a finançar el desenvolupament de projectes de grups emergents en centres assistencials durant l'any 2011 que es mencionen en l'annex, a les entitats representades pel personal investigador, per un import total de 100.000 euros (cent mil euros), a càrrec de la línia T6667000.

Segon

La justificació econòmica de les despeses corrents derivades de l'execució dels projectes conclourà el 12 de novembre de 2011.

Els beneficiaris que no presenten la documentació justificativa abans del 12 de novembre de 2011 perdran el dret a percebre l'ajuda concedida.

Els beneficiaris de les ajudes han de remetre durant el primer semestre de 2012, a l'Oficina d'Investigació Sanitària, una memòria científica final del projecte d'investigació realitzat.

En la publicació de treballs científics, presentació de comunicacions a congressos i reunions científiques, etc., com a resultat d'esta ajuda, es farà constar expressament que s'han dut a terme amb finançament de la Conselleria de Sanitat fent referència al número d'expedient del projecte i s'adjuntarà un exemplar a la memòria científica final del projecte. Així mateix, es remetràn les publicacions que es produïsquen com a conseqüència de l'ajuda després de la presentació de la memòria.

Tercer

Els projectes no concedits podran ser arrellegats pels interessats o per una persona degudament autoritzada, a l'Oficina d'Investigació Sanitària de la Conselleria de Sanitat (carrer Misser Mascó, números 31-33 de València) durant els tres mesos següents a la publicació en el *Diari Oficial de la Comunitat Valenciana* de la resolució de la convocatòria. Transcorregut eixe termini es procedirà a destruir-les.

Conselleria de Sanidad

RESOLUCIÓN de 30 de agosto de 2011, del conseller de Sanidad, por la que se conceden ayudas para proyectos de grupos emergentes en centros asistenciales, a desarrollar durante el año 2011 (anexo III). [2011/9336]

Por Orden de 22 de diciembre de 2010 de la Conselleria de Sanidad (*Diari Oficial de la Comunitat Valenciana* núm. 6.428, de 30.12.2010), se establecieron las bases reguladoras y se convocaron en el anexo III ayudas para proyectos de grupos emergentes en centros asistenciales, a desarrollar durante el año 2011.

En los presupuestos de la Generalitat Valenciana para el ejercicio 2011 existe una dotación de 100.000 euros (cien mil euros) en el programa presupuestario 10.01.62.0000.411.50.4, correspondientes al código de línea T6667000, destinada a ayudas para el fomento de la investigación sanitaria y biomédica.

Resultando que las entidades representadas por el personal investigador que al final se relaciona, han solicitado ayudas para financiar el desarrollo de proyectos de investigación de grupos emergentes en centros asistenciales en los términos previstos en la Orden de referència.

Considerando la normativa de general aplicación y examinados los proyectos de investigación objeto de la convocatòria:

Vista la propuesta formulada por la Comisión Evaluadora de dichas ayudas, tomando en consideración la evaluación individualizada de las solicitudes realizada por la Agencia Valenciana d'Avaluació i Prospectiva (AVAP) en los aspectos científico-técnicos, correspondiente a un 85% de la nota total, y por el órgano gestor de las ayudas el restante 15%, correspondiente a la adecuación de las temáticas de los proyectos a los objetivos de la convocatòria, tal y como se establece en el anexo III de la citada Orden, procurándose garantizar la eficacia y eficiencia de las actuaciones y habiéndose ajustado las posibles ayudas a los recursos previstos para 2011, resuelvo

Sobre los expedientes de solicitud de ayudas presentados:

Primero

Conceder las ayudas para financiar el desarrollo de proyectos de grupos emergentes en centros asistenciales durante el año 2011 que en el Anexo se relacionan, a las entidades representadas por el personal investigador, por un importe total de 100.000 euros (cien mil euros), con cargo a la línea T6667000.

Segundo

La justificación económica de los gastos corrientes derivados de la ejecución de los proyectos concluirá el 12 de noviembre del 2011.

Los beneficiarios que no presenten la documentación justificativa antes del 12 de noviembre de 2011 perderán el derecho a percibir la ayuda concedida.

Los beneficiarios de las ayudas deberán remitir durante el primer semestre de 2012, a la Oficina de Investigación Sanitaria, la memoria científica final del proyecto desarrollado.

En la publicación de trabajos científicos, presentación de comunicaciones a congresos y reuniones científicas etc., como resultado de esta ayuda, se hará constar expresamente que se han desarrollado con financiación de la Conselleria de Sanidad haciendo referencia al número de expediente del proyecto y se adjuntará un ejemplar a la memoria científica final del proyecto. Así mismo, se remitirán las publicaciones que se produzcan como consecuencia de la ayuda con posterioridad a la presentación de dicha memoria.

Tercero

Los proyectos no concedidos podrán ser recogidos por los interesados o por una persona debidamente autorizada, en la Oficina de Investigación Sanitaria de la Conselleria de Sanidad (calle Misser Mascó, números 31-33 de València) durante los tres meses siguientes a la publicación en el *Diari Oficial de la Comunitat Valenciana* de la resolución de la convocatòria. Transcurrido dicho plazo se procederá a su destrucción.

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 Justicia 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 Eduard Rosado Bretón.

ANNEX

Llista 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: coriо-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: coriо-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 €.

7.3. Comunicación al congreso internacional ASCO 2016.



Published on *Meeting Library* (<http://meetinglibrary.asco.org>)

[Home](#) > 169385-176

Molecular subtyping of colon cancer (CC) based on mutational status of RAS, BRAF, and DNA mismatch repair (MMR) proteins. Prognostic value.
Meeting:

2016 ASCO Annual Meeting

Category:

Gastrointestinal (Colorectal) Cancer

Subcategory:

Biomarkers/Epidemiology/Outcomes

Session Type and Session Title:

This abstract will not be presented at the 2016 ASCO Annual Meeting but has been published in conjunction with the meeting.

Abstract Number:

e15094

Citation:

J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr e15094)

Author(s):

Gil Raga Mireia, Sandra Gallach, Eloisa Jantus-Lewintre, Maria Jose Safont, Garcia Martinez Maria Luisa, Javier Garde-Noguera, Ruiz Carmona Maria Dolores, Sara Blasco, Vicent Giner-Bosch, Carlos Camps; Hospital de Sagunto, Valencia, Spain; Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain; Molecular Oncology Laboratory, Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia / Department of Biotechnology, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain; Hospital General de Valencia, Valencia, Spain; Study Coordinator in CLinical Trials. Sagunto Hospital, Valencia, Spain; Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain; Surgery Department. Sagunto Hospital, Valencia, Spain; Hospital de Sagunto. Valencia, Valencia, Spain; Centre for Quality and Change Management, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain; Consorcio Hospital

Background: CC is a heterogeneous disease with clinical, pathological and biological variability. Molecular classification could identify prognostic subtypes. **Methods:** 105 patients with stage I-III were included in the study. KRAS, NRAS (Exons 2,3,4) and BRAFV600E mutations were analyzed by a PCR-based assay. MMR (MLH1 and MSH2) proteins expression were analyzed by immunohistochemistry; loss of expression of any indicated deficient (dMMR) vs proficient MMR (pMMR). CC was categorized into 5 subtypes: Traditional (T) (pMMR; wt BRAF and RAS); Alternate (A) (pMMR; wt BRAF and mutant RAS); Serrated (S) (pMMR; mutant BRAF and wt RAS); Serrated dMMR (Sd) (dMMR; mutant BRAF and wt RAS) and Familial (F) (dMMR; wt BRAF, any RAS). Non-parametric tests were used for correlation with clinico-pathological variables and Cox models for association with Disease Free Survival (DFS). **Results:** Mutational status: 41% KRAS, 5% NRAS and 11% BRAF mutations. MMR status: dMMR 19%; pMMR 81%. Molecular subtypes: T 35%, A 39%, S 7%, Sd 5% and F 14%. Right-sided CC 46%; high grade (HG) CC 12%. Right-sided and dMMR CC showed higher rate of BRAF mutations (21% vs 4% $p = .011$ and 25% vs 8% $p = .034$). Stage II and III CC showed higher rate of BRAF mutations vs stage I (14% and 21% vs 0%, respectively; $p < .005$). dMMR CC was more often right-sided (85% vs 37%, $p < .001$) and had more HG histology (31% vs 8%, $p = .006$). T subtype vs others was more likely left-sided (78% vs A 55% vs S 28% vs Sd 0% vs F 20%; $p < 0.005$). S dMMR and F vs A were more likely right-sided (100% and 80% vs 45%; $p < .05$). F vs T and vs A CC had more HG (33% vs 8%, $p = .039$; vs 7%, $p = .026$). Risk of progression is higher in mutated KRAS CC (Odds ratio (OR) 3,36; CI: 1,19-9,47 $p = .017$). RAS mutated CC showed higher risk of death (OR 5,11; CI: 1,00-25,43 $p = .040$). Wt KRAS and wt RAS CC showed better DFS (HR 0,31 CI 0,12-0,79 $p = .015$ and HR 0,39 CI 0,15-1,00 $p = .051$). T vs S showed better DFS (HR 0,21 IC 0,04 - 0,95 $p = .044$). S and A together compared to T, showed a tendency to a worse DFS (HR 2,86 IC 0,93-0,78 $p = .066$). **Conclusions:** This molecular classification identifies prognostic groups with different clinical and pathological features in early-stage CC.

Source URL: <http://meetinglibrary.asco.org/content/169385-176>