

UNIVERSIDAD DE GRANADA



DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y SUS ESPECIALIDADES

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Javier Martín Cano
D.L.: GR 1554-2012
ISBN: 978-84-9028-001-0

TESIS DOCTORAL

**“FIRMAS DE EXPRESIÓN
GÉNICA COMO FACTOR
PREDICTIVO
DE RESPUESTA AL
TRATAMIENTO
NEOADYUVANTE EN
EL CÁNCER DE RECTO”**

**JAVIER MARTIN CANO
SERVICIO CIRUGÍA GENERAL Y DEL APARATO
DIGESTIVO
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES**

Granada, OCTUBRE 2011

**Trabajo presentado por D. JAVIER MARTÍN CANO,
Licenciado en Medicina y Cirugía, para la obtención del Grado
de Doctor por la Universidad de Granada.**

La Tesis Doctoral que se presenta para la obtención del Grado de Doctor ha sido realizada en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Sección de Cirugía Colorrectal del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, y Unidad de Investigación en Cirugía Experimental); la misma se ha realizado en el marco de un proyecto de investigación de excelencia financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía así como por la Fundación de Investigación Mutua Madrileña, a través del Departamento de Cirugía y sus Especialidades de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

**A MI MUJER, ALMUDENA
A MIS PADRES**

“En el arte como en la ciencia toda gran obra es el resultado de la pasión puesta al servicio de una idea”

Reglas y Consejos sobre la Investigación Científica
Santiago Ramón y Cajal.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo nunca hubiese visto la luz sin la dirección, estímulo, consejos y desinteresada colaboración de las personas a las que deseo dejar constancia y mi más profundo agradecimiento.

A mis directores de tesis:

Dr J.Antonio Ferrón: Como Jefe de un Servicio de Cirugía estructurado tanto para la labor asistencial como de investigación y docente.

Dr Pablo Palma: Como Jefe Sección de Cirugía Colorrectal e investigador principal del proyecto de cáncer de recto en el que he podido colaborar y desarrollar este trabajo.

Dr Pablo Bueno: Como responsable del área de investigación quirúrgica, por sus enseñanzas y estímulo hacia la investigación.

Al Prof. Armando Blanco y al Dr. Carlos Cano, así como a la Dra. Marta Cuadros por el asesoramiento metodológico en el campo de los microarrays, su ayuda en la elaboración del análisis y validación de los datos incluidos en la presente Tesis Doctoral ha sido simplemente indispensable.

A la Escuela Andaluza de Salud Pública, en especial a la Dra María José Sánchez por su ayuda en la obtención de datos del Registro de Tumores de Granada.

A todo el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, por facilitarme siempre los pasos necesarios para mi formación como especialista así como en el desarrollo y culminación de esta Tesis Doctoral.

A mis compañeros de trabajo y amigos del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada por todo lo que me han enseñado durante mi formación y lo que continúo aprendiendo día a día a su lado, a todos sin excepción y con especial

afectividad por la cercanía profesional y personal a los Dres: Segura Jiménez, Conde-Muñoz, Cabrera, Delgado, Álvarez, Segura Reyes, García Navarro, Arcelus, Villar, Muñoz, Mansilla, Torres, Carrasco, Villegas, Becerra, Granero, Garrote, Jiménez, Serradilla, Olmos, Moreno, Rodríguez, Jorge, Paz, Turiño, Gil, Zambudio y en especial a mi amigo el Dr. Don Cecilio García García por enseñarme el verdadero significado de “Ser Cirujano”.

A las Lcdas. Carmen Olmedo Martín y Ana María Comino Pardo, Técnico de la Unidad de Investigación y Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada por su ayuda inestimable y colaboración en el procesado de las muestras biológicas y en la realización de las técnicas de laboratorio, incluidas en estas Tesis Doctoral.

Al personal de quirófano del HUVN, muy especialmente a Eugenio Coll por su inestimable ayuda en la recogida de muestras séricas.

A todos mis amigos por creer en mí.

A mi mujer, Almudena, sin ella este proyecto no hubiera sido posible.

A mis padres y hermana porque siempre me han apoyado en todos mis proyectos e ilusiones.

CERTIFICACIONES

D. J. ANTONIO FERRON ORIHUELA, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada y Jefe de Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

CERTIFICA:

Que D. Javier Martín Cano, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección su Trabajo de Investigación para la confección de la Memoria de **TESIS DOCTORAL** sobre el tema: “**FIRMAS DE EXPRESIÓN GÉNICA COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CÁNCER DE RECTO**” y que reúne las cualidades necesarias para su presentación y defensa.

Prof. Dr. J.A. Ferrón Orihuela
Granada, Octubre 2011

D. PABLO PALMA CARAZO Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada y Jefe de Sección de Cirugía Colorrectal del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada

CERTIFICA:

Que D. Javier Martín Cano, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección su Trabajo de Investigación para la confección de la Memoria de **TESIS DOCTORAL** sobre el tema: “**FIRMAS DE EXPRESIÓN GÉNICA COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CÁNCER DE RECTO**” y que reúne las cualidades necesarias para su presentación y defensa.

Dr. P. Palma Carazo
Granada, Octubre 2011

D. PABLO BUENO LARAÑO, Doctor en Farmacia e investigador de la Unidad de Investigación y Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

CERTIFICA:

Que D. Javier Martín Cano, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección su Trabajo de Investigación para la confección de la Memoria de **TESIS DOCTORAL** sobre el tema: “**FIRMAS DE EXPRESIÓN GÉNICA COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CÁNCER DE RECTO**” y que reúne las cualidades necesarias para su presentación y defensa.

Dr. P. Bueno Laraño
En Granada, Octubre 2011

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	41
I.1.CÁNCER COLORRECTAL.....	41
I.1.1.EPIDEMIOLOGÍA DEL CANCER COLORRECTAL.....	41
I.1.2.INCIDENCIA DE CÁNCER DE COLON Y RECTO EN ESPAÑA.....	43
I.1.2.1.Cáncer de colon.....	43
I.1.2.2.Cáncer de recto.....	44
I.1.3.REGISTRO DE TUMORES DE GRANADA.....	45
I.1.3.1.Incidencia de Cáncer de colon y recto en Granada.....	46
I.1.3.1.1.Cáncer de colon.....	47
I.1.3.1.2.Cáncer de recto	48
I.2.ETIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL	49
I.2.1.FACTORES GENÉTICOS.....	49
I.2.2 FACTORES AMBIENTALES	49
I.2.2.1. Dieta.....	49
I.2.2.1.1.Carne, Grasa y Proteínas.....	50
I.2.2.1.2.Fibra.....	51
I.2.2.1.3.Hortalizas y Frutas.....	51
I.2.2.2. Estilo de vida.....	52
I.2.2.3. Antiinflamatorios no Esteroideos.....	53
I.3.BIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL: FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS.....	54
I.3.1.SÍNDROMES DE CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO.....	54
I.3.1.1.Síndromes de poliposis.....	54
I.3.1.1.1.Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF).....	54
I.3.1.1.2.Poliposis hamartomatosa.....	55
I.3.1.1.3.Síndrome de Peutz-Jeghers.....	55
I.3.1.1.4.Poliposis Juvenil.....	56
I.3.1.1.5.Enfermedad de Cowden.....	56

I.3.1.2.Cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) o síndrome de Lynch.....	56
I.3.2.CÁNCER COLORRECTAL FAMILIAR.....	57
I.3.3.CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO	57
I.4.DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER RECTAL	60
I.4.1.CUADRO CLÍNICO.....	60
I.4.2.ESTADIFICACIÓN.....	61
I.4.3.DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO.....	69
I.4.3.1.Pólipos.....	69
I.4.3.2.Carcinoma.....	70
I.5.FACTORES PRONÓSTICO EN CÁNCER COLORRECTAL.....	72
I.6.TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE RECTO.....	77
I.6.1.TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL CÁNCER RECTAL	77
I.6.2.TRATAMIENTO NEOADYUVANTE.....	81
I.6.2.1 RADIOTERAPIA.....	81
I.6.2.1.1.Tratamiento neoadyuvante radioterápico preoperatorio.	81
I.6.2.1.2.Tratamiento adyuvante radioterápico postoperatorio....	84
I.6.2.2 QUIMIOTERAPIA.....	85
I.6.3.TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE RECTO METASTÁSICO.....	86
I.7.VALORACION DE LA RESPUESTA A LA NEOADYUVANCIA.....	90
I.7.1.VALORACIÓN CLÍNICA, METABÓLICA Y MOLECULAR.....	90
I.7.2.ESTADIAJE ANATOMOPATOLÓGICO.....	92
I.8.APLICACIÓN DE LOS MICROARRAYS.....	97
I.8.1.INTRODUCCIÓN.....	97
I.8.1.1.Fundamento de la tecnología empleada en microarrays.....	98
I.8.1.2.Componentes de un experimento de microarrays.....	100
I.8.1.3.Muestras biológicas.....	101
I.8.1.4.Diseño experimental en experimentos de microarrays.....	102

I.8.1.5.Tipos de microarrays.....	103
I.8.1.6.Consideraciones técnicas del uso de microarrays.....	106
I.8.2.MICROARRAYS DE EXPRESIÓN Y SU EMPLEO EN LA TAXONOMÍA MOLECULAR DEL CÁNCER.....	113
I.8.3.PATRONES DE EXPRESIÓN COMO HERRAMIENTA DE PRONÓSTICO Y PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	115
I.8.4.PERSPECTIVAS DE LA UTILIZACIÓN DE MICROARRAYS.....	117
II.HIPÓTESIS.....	123
III.OBJETIVOS.....	127
IV.PACIENTES Y MÉTODOS.....	131
IV.1.METODOLOGÍA.....	131
IV.1.1.DISEÑO.....	131
IV.1.2.ÁMBITO.....	131
IV.1.2.1.Geográfico.....	131
IV.1.2.2.Temporal.....	131
IV.1.3.POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	131
IV.1.3.1.Criterios de inclusión.....	131
IV.1.3.2.Criterios de exclusión.....	132
IV.1.3.3.Población diana.....	132
IV.1.3.4.Población accesible.....	132
IV.1.4.MUESTRA DE ESTUDIO.....	132
IV.1.4.1.Estimación del tamaño muestral.....	133
IV.1.5 PROTOCOLO DE ESTUDIO.....	133
IV.1.5.1.Flujo de pacientes.....	133
IV.1.5.2.Procedimiento diagnóstico-estadificación convencional.....	134
IV.1.5.3.Estadificación de la enfermedad local (TxNx).....	134
IV.1.5.4.Estadificación a distancia (Mx).....	135
IV.1.5.5.Toma de muestra pre-tratamiento neoadyuvante.....	138

IV.1.5.6.Tratamiento neoadyuvante.....	138
IV.1.5.7.Tratamiento quirúrgico.....	139
IV.1.5.8.Estadificación anatomopatológica post-quirúrgica.....	139
IV.1.5.9.Valoración de la respuesta al tratamiento neoadyuvante.....	140
IV.2.TAMAÑO MUESTRAL.....	141
IV.3.RECOGIDA Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA.....	141
IV.3.1.AISLAMIENTO, PRECIPITACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ARN.....	142
IV.3.1.1.Aislamiento del ARN.....	142
IV.3.1.2.Precipitación del ARN.....	145
IV.3.1.3.Cuantificación y pureza del ARN.....	146
IV.3.1.4.Determinación de la calidad del ARN.....	147
IV.4.PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA HIBRIDAR LOS MICROARRAYS.....	149
IV.4.1.ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA POR MICROARRAYS.....	150
IV.4.2.HIBRIDACIÓN DE LOS MICROARRAYS.....	152
IV.4.3.POST-HIBRIDACIÓN DEL ARRAY.....	153
IV.5.ANÁLISIS DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN DE MICROARRAYS.....	154
IV.5.1.NORMALIZACIÓN.....	154
IV.5.2.ANÁLISIS DE SIGNIFICACIÓN DE MICROARAYS (SAM).....	156
IV.5.3.AGRUPAMIENTO (CLUSTERING)	159
IV.6.VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS MICROARRAYS.....	161

V.RESULTADOS	173
V.1.ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	173
V.1.1.SEXO Y EDAD.....	174
V.1.2.PRESENTACIÓN CLÍNICA.....	175
V.1.3.FÓRMULA LEUCOCITARIA.....	175
V.1.4.VALORES DE LA SERIE ROJA.....	175
V.1.5.DETERMINACIÓN GENERAL DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS.....	176
V.2.TIPIFICACIÓN Y ESTADIFICACIÓN PREQUIRÚRGICA.....	177
V.3.TERAPIA NEOADYUVANTE.....	178
V.3.1.TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO.....	178
V.3.2.TRATAMIENTO RADIOTERÁPICO.....	178
V.4.TRATAMIENTO QUIRÚRGICO.....	178
V.5.VALORACIÓN DE LA RESPUESTA A LA NEOADYUVANCIA.....	179
V.6.RESULTADOS DEL ESTUDIO DE EXPRESION GENICA MEDIANTE MICROARRAYS EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	181
V.6.1.DESCRIPCIÓN DE LOS GENES SOBRE-EXPRESADOS EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE LOS PACIENTES PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO.....	183
V.7.VALIDACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS GENES SOBRE-EXPRESADOS MEDIANTE qRT-PCR.....	197

VI. DISCUSIÓN.....	205
VI.1.CÁNCER DE RECTO Y TRATAMIENTO ACTUAL.....	205
VI.1.1.ESTADIFICACIÓN CLÍNICA.....	206
VI.1.2.TRATAMIENTO NEOADYUVANTE.....	207
VI.1.3.TRATAMIENTO QUIRÚRGICO.....	208
VI.1.4.CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	209
VI.2.TECNOLOGÍA APLICADA. UTILIDAD DE LOS ARRAYS.....	210
VI.3.GENÓMICA EN LA MEDICINA INDIVIDUALIZADA. EJEMPLOS EN MAMMAPRINT® Y COLOPRINT®.....	212
VI.3.1.Mammaprint®.....	212
VI.3.2.Coloprint®.....	214
VI.4.CÁNCER DE RECTO Y GENÓMICA.....	215
VI.5.COMPARACIÓN ENTRE EL GRUPO DE PACIENTES RESPONDEDORES Y NO RESPONDEDORES AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE.....	218
VI.5.1 FALZ (BPTF).....	220
VI.5.2 ZFP36 (TTP).....	220
VI.5.3 CIR.....	222
VI.5.4 PRDM2 (RIZ1).....	222
VI.5.5 CAPG.....	223
VI.5.6 NUPL2.....	223
VII.CONCLUSIONES.....	233
VIII.BIBLIOGRAFÍA.....	237
IX.ANEXOS.....	271

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Incidencia de cáncer de colon y recto en el conjunto de 11 Registros de Cáncer de Población españoles, 1998-2002.....	44
TABLA 2: Incidencia de cáncer de colon en la provincia de Granada 2001-2005.....	47
TABLA 3: Factores ambientales que influyen en la etiología del cáncer de colon.....	53
TABLA 4: Agrupación por estadíos TNM (AJCC/UICC).....	67
TABLA 5: Correspondencia Estadificación/TNM/Astler-Coller/Dukes.....	68
TABLA 6: Puntos importantes en cada paso de un experimento de <i>microarrays</i>	102
TABLA 7: Preparación mezcla de reacción del protocolo PCR.....	166
TABLA 8: Genes analizados mediante técnica RT-PCR cuantitativa.....	166
TABLA 9: Secuencia de los cebadores o primers y sondas.....	167
TABLA 10: Distribución de los pacientes por grupos de estudio.....	174
TABLA 11: Fórmula leucocitaria de los pacientes del estudio.....	175
TABLA 12: Serie roja en los pacientes del estudio.....	176
TABLA 13: Principales determinaciones de analítica sérica de los pacientes incluidos en el estudio.....	176

TABLA 14: Características generales de los 27 pacientes incluidos en el estudio.....179

TABLA 15: Genes identificados en el estudio sobre-expresados en pacientes respondedores.....183

TABLA 16: Genes sobre-expresados en pacientes respondedores.....186

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Estadíos tumorales cáncer colorrectal	67
FIGURA 2: Resección Mesorrectal Total (RMT)	80
FIGURA 3: Tratamiento complementario del Cáncer de Recto por estadíos ..	88
FIGURA 4: Grados de Regresión Tumoral de Mandard	95
FIGURA 5: Dogma central de la biología molecular	98
FIGURA 6: Experimentos de microarrays con dos colorantes.....	107
FIGURA 7: Experimentos de microarrays con un colorante.....	108
FIGURA 8: Cálculo del SUV.....	137
FIGURA 9: Descripción del método utilizado para la extracción de ARN total (PAXgene ®Blood RNA Kit).....	145
FIGURA 10: NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.....	146
FIGURA 11: Equipo Experion (BioRad).....	148
FIGURA 12: Calidad del ARN purificado en imagen obtenida del equipo Experion (BioRad).....	148
FIGURA 13: Escáner GenePix4000B y equipo de análisis de microarrays utilizado en la presente Tesis Doctoral.....	150
FIGURA 14: Microarrays del sistema CodeLink (Applied Microarrays).....	151

FIGURA 15: Esquema general del proceso de extracción del ARN, marcaje, hibridación del microarray y posterior escaneo de los cristales.....	152
FIGURA 16: Agitador orbital Innova 4080 y centrífuga Sigma para microarrays utilizados en la presente Tesis Doctoral	153
FIGURA 17: Gráfica MA para 8 arrays del estudio realizado	155
FIGURA 18: Diagramas de cajas del \log_2 (Intensidades)	156
FIGURA 19: Ejemplo gráfico del análisis de significación de los microarrays (SAM)	159
FIGURA 20: Dendograma correspondiente a la agrupación jerárquica de los patrones de expresión de los genes	160
FIGURA 21: Equipo Mx3005P para qRT-PCR utilizado en la presente Tesis Doctoral.....	161
FIGURA 22: Cinética de las reacciones de PCR.....	163
FIGURA 23: Gráfico de los resultados de la RT-PCR cuantitativa.....	169
FIGURA 24: Agrupamiento (clustering) de las muestras tumorales analizadas.....	185
FIGURA 25: Análisis mediante qRT-PCR de los genes sobre-expresados diferencialmente entre el grupo de pacientes respondedores y los no respondedores.....	198

INTRODUCCIÓN

I.INTRODUCCIÓN

I.1.CÁNCER COLORRECTAL

I.1.1.EPIDEMIOLOGÍA DEL CANCER COLORRECTAL

El cáncer de localización colorrectal (CCR) representa la segunda causa de muerte oncológica en los países occidentales después del cáncer de pulmón en los hombres y el de mama en las mujeres.

En todo el mundo se ha estimado que existen 450.000 casos nuevos de cáncer colorrectal cada año. Los datos de la SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results Program) (1) predicen una supervivencia relativa a los cinco años del 63% entre la población blanca de EE.UU. y del 53% en la raza negra con cáncer colorrectal. Los registros de tumores europeos hablan de una supervivencia a los 5 años significativamente menor, del 41% y 42%, respectivamente (2).

En los últimos diez años, Estados Unidos ha asistido a una reducción de la incidencia anual de cáncer de colon en un 0,6% y de la mortalidad anual en un 1,7%. Esta disminución de la incidencia del cáncer colorrectal y la mejoría de la supervivencia son consecuencia de una combinación de factores. Por un lado, el mayor “despistaje” (colonoscopias) y el uso de polipectomía endoscópica han sido muy importantes, así como también han contribuido los cambios en el estilo de vida, la dieta, el uso de bajas dosis de ácido acetilsalicílico y la reducción del hábito tabáquico (3).

Tanto la incidencia como la mortalidad del cáncer colorrectal varían considerablemente en todo el mundo e incluso a escala regional en los Estados Unidos. Esta variación geográfica en la incidencia demuestra en gran medida la importancia de los factores ambientales. Se postula que el estilo de vida occidental unido a factores genéticos subyacentes, así como el aumento de longevidad en determinados grupos de población, podrían ser variables importantes a la hora de explicar la disparidad en la incidencia entre las

regiones geográficas. (2) En términos generales, la incidencia de cáncer colorrectal y las tasas de mortalidad son mayores en países desarrollados. Existen diversos estudios que afirman que aquellas personas que migran desde una zona de baja incidencia a otra de alta incidencia de cáncer colorrectal, tienden a adoptar la incidencia del país de acogida (4,5).

En general, existe acuerdo en que el 80% de los casos de cáncer colorrectal son esporádicos y no se asocian a ninguna mutación hereditaria conocida. Aunque el cáncer puede desarrollarse a una edad precoz, su diagnóstico antes de los 40 años de edad supone menos de un 5%.

La edad es el factor que más impacta sobre la incidencia de cáncer colorrectal. La incidencia de cáncer colorrectal esporádico aumenta de forma importante por encima de los 45 ó 50 años para todos los grupos de población. El 90% de los casos de cáncer colorrectal esporádico aparece después de los 50 años de edad. En la mayoría de los países, las tasas de incidencia normalizadas por edad son menores en las mujeres. La distribución por sexos de las neoplasias malignas colorrectales es prácticamente igual entre varones y mujeres. Sin embargo, el riesgo de mortalidad por cáncer colorrectal es más elevado para la mujer (2,7%) que para el hombre (2,6%) (6).

La raza es también un factor que influye en la incidencia del cáncer de colon, siendo más elevada en personas de raza negra (1).

Así mismo, se ha producido un desplazamiento aparente en la distribución anatómica del cáncer colorrectal, con menos lesiones izquierdas y más cánceres localizados en el lado derecho (7, 8 ,9).

Tanto en Europa como en los EEUU, el cáncer de localización específica rectal representa, con un total de 50 a 75 casos por 100.000 habitantes al año, un grave problema tanto desde el punto de vista sanitario como del socioeconómico. Actualmente el porcentaje de recidivas quirúrgicas en tumores de recto localmente avanzados varía entre un 4 y 40%. Más aún,

la agresividad del mismo queda implícita en el hecho de que más de la mitad de estos pacientes fallecen como resultado de la progresión de la enfermedad tumoral.(1).

I.1.2. INCIDENCIA DE CÁNCER DE COLON Y RECTO EN ESPAÑA (1998-2002)

La información sobre incidencia de cáncer en España procede de 11 registros de cáncer de población, cuyos datos están incluidos en el último volumen (IX) de *Cancer Incidence in Five Continents*.

En la tabla 1, se presentan la incidencia de cáncer de colon (C18) y de recto (C19-C20), según la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE, 10ª Edición).

I.1.2.1. Cáncer de colon

En el conjunto de los 11 registros de cáncer de población españoles incluidos en la publicación antes mencionada (Albacete, Asturias, Canarias, Cuenca, Gerona, Granada, Murcia, Navarra, País Vasco, Tarragona y Zaragoza) se observó una tasa de incidencia bruta media anual de cáncer de colon de 40,1 y 30,5 por 100.000 hombres y mujeres, respectivamente.

Para el conjunto de los registros españoles las tasas acumulativas de 0 a 74 años fueron de 2,6% en hombres y de 1,6% en mujeres. Es decir, si las tendencias no se modificaran, el riesgo de presentar un cáncer de colon antes de los 75 años se cifraría en 1 de cada 38 hombres y en 1 de cada 62 mujeres.

I.1.2.2. Cáncer de recto

En el conjunto de los 11 registros de cáncer de población españoles incluidos en la publicación antes mencionada (Albacete, Asturias, Canarias, Cuenca, Gerona, Granada, Murcia, Navarra, País Vasco, Tarragona y Zaragoza) se observó una tasa de incidencia bruta media anual de cáncer de recto de 24,1 y 14,2 por 100.000 hombres y mujeres, respectivamente.

Para el conjunto de los registros españoles las tasas acumulativas de 0- a 74 años fueron de 1,7% en hombres y de 0,8% en mujeres. Es decir, si las tendencias no se modificaran, el riesgo de presentar un cáncer de colon antes de los 75 años se cifraría en 1 de cada 59 hombres y en 1 de cada 125 mujeres.

TABLA 1: Incidencia de cáncer de colon y recto (C18 y C19-C20, según la CIE-10) en el conjunto de 11 Registros de Cáncer de Población españoles, 1998-2002, según sexo, número total de casos nuevos diagnosticados en el período, tasas brutas y estandarizadas (población mundial) por 100.000 habitantes y tasas acumulativas (0-74 años) por 100 habitantes (6).

	Nº. casos	T.bruta	T. estandarizada (pobl. Europea)	T. acumulativa (0-74)
COLON				
Hombres	8.949	40.1	22.4	2.62
Mujeres	7.023	30.5	14.2	1.63
RECTO				
Hombres	5.370	24.1	13.8	1.66
Mujeres	3.282	14.2	6.9	0.79

1.1.3. REGISTRO DE TUMORES DE GRANADA

El estudio que constituye la presente Tesis Doctoral se centra en la población ubicada en la provincia de Granada, por tanto se ha recurrido al registro de tumores existente en la misma.

El Registro de Cáncer de Granada (RCG), cuya actividad se inició en 1985, es un proyecto de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, adscrito para su desarrollo a la Escuela Andaluza de Salud Pública (EASP).

La misión del RCG es aportar información de calidad sobre la magnitud y características de los pacientes con cáncer en la provincia de Granada, para contribuir al conocimiento de la etiología e historia natural de la enfermedad, así como la planificación y evaluación de la atención sanitaria, todo ello para promover la equidad en el acceso a los servicios preventivos y asistenciales de los enfermos de cáncer.

El objetivo básico del RCG es determinar la incidencia y tendencias temporales de cáncer en la provincia de Granada, cuya población es próxima a los 880.000 habitantes, así como estimar la supervivencia de los cánceres más frecuentes en la mencionada provincia.

El RCG está integrado y participa en las actividades de la *European Network of Cancer Registries* (ENCR), coordinadas por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC). La información sobre cáncer generada por el RCG se ha publicado en las sucesivas ediciones de: a) *Cancer Incidence in Five Continents* vol. VI (1992), vol. VII (1997), vol VIII (2002) y vol. IX (2007), b) *International Incidence of Childhood Cancer* (1999) y c) *Survival of CancerPatients in Europe: the EURO CARE Study* (1995, 1999), editadas por la IARC. Además, la información se encuentra incorporada en las publicaciones electrónicas: *European Cancer Incidence and Mortality Database* (EUROCIM, 2001) y *Automated Childhood Cancer Information System* (ACCIS)

Es un requisito esencial el que todos los casos diagnosticados por primera vez de un cáncer y residentes en la provincia de Granada estén registrados. Por este motivo, en el RCG se rastrean todas las fuentes posibles en las que pueda existir información sobre casos diagnosticados y/o tratados de cáncer. Se recoge información de los centros sanitarios públicos y privados de la provincia de Granada.

En el Registro se utilizan criterios y normas de trabajo homogéneas e internacionalmente aceptadas, que facilitan la comparación de los datos entre los registros de cáncer de distintos países.

Actualmente, el RCG dispone de datos sobre 68.761 casos incidentes de cáncer en la provincia de Granada, desde el año 1985. Basándose en esta información, regularmente se realizan análisis de datos, respondiendo a consultas formuladas al RCG por profesionales, o bien destinadas a la preparación de artículos, ponencias y/o comunicaciones en Reuniones Científicas o para su utilización como material docente.

I.1.3.1. Incidencia de cáncer de colon y recto en Granada 2001-2005

La información se presenta en la tabla 2 como número de casos, tasas brutas, estandarizadas (población estándar mundial) y tasas acumulativas (0-74 años), según sexo.

En la provincia de Granada, en el período 2001-2005, en hombres los cánceres de colon y recto ocupan la posición 5ª y 6ª en orden de frecuencia respectivamente y la posición 4ª y 5ª en mujeres.

TABLA 2: Incidencia de cáncer de colon (C18, según la CIE 10) y recto (C19-C20, según la CIE 10) en la provincia de Granada 2001-2005). Según sexo. Número total de casos nuevos diagnosticados en el período, tasas brutas y estandarizadas (población europea) por 100.000 habitantes y tasas acumulativas (0-74 años) por 100 habitantes.

	Nº. casos	T.bruta	T. estandarizada (pobl. Europea)	T. acumulativa (0-74)
COLON				
Hombres	677	33.1	28.7	2.3
Mujeres	532	24.9	18.6	1.5
RECTO				
Hombres	446	21.8	19.4	1.6
Mujeres	297	13.9	10.8	0.9

I.1.3.1.1 Cáncer de colon

En el periodo 2001-2005 se registraron 1.209 casos, correspondientes a los sujetos residentes en la provincia de Granada, diagnosticados por primera vez de cáncer de colon durante esos años, lo que representó una media de 242 casos nuevos anuales.

En el mencionado periodo la incidencia media anual de cáncer de colon en Granada presentó unas tasas brutas de 33,1 y 24,9 por 100.00 hombres y

mujeres respectivamente. La incidencia fue más elevada en los hombres que en las mujeres, con una razón de tasas estandarizadas hombre/ mujer de 1,5.

Por otro lado, las tasas acumulativas, calculadas hasta los 74 años, fueron de 2,3% y 1,5% para los hombres y mujeres respectivamente, lo que significa que si las tendencias no se modifican, y en ausencia de otra causa de muerte, 1 de cada 43 hombres y 1 de cada 67 mujeres, residentes en la provincia de Granada, desarrollará un cáncer de colon antes de los 75 años.

I.1.3.1.2. Cáncer de recto

En el periodo 2001-2005 se registraron 743 casos, correspondientes a los sujetos residentes en la provincia de Granada, diagnosticados por primera vez de cáncer de recto durante esos años, lo que representó una media de 149 casos nuevos anuales.

En el mencionado periodo, la incidencia media anual de cáncer de recto en Granada presentó unas tasas brutas de 21,8 y 13,9 por 100.000 hombres y mujeres respectivamente. La incidencia fue más elevada en los hombres que en las mujeres, con una razón de tasas estandarizadas hombre/ mujer de 1,8.

Por otro lado las tasas acumulativas, calculadas hasta los 74 años, fueron del 1,6% y 0,9% para hombres y mujeres respectivamente, lo que significa que si las tendencias no se modifican, y en ausencia de otra causa de muerte, 1 de cada 62 hombres y 1 de cada 111 mujeres, residentes en la provincia de Granada, desarrollará un cáncer de recto antes de los 75 años.

1.2. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL

1.2.1. FACTORES GENÉTICOS

Los antecedentes familiares de cáncer colorrectal confieren un mayor riesgo de desarrollar esta patología, si bien el incremento del riesgo varía en función de las características de dicha historia familiar.

El riesgo de padecer cáncer colorrectal en personas con antecedentes familiares de esta neoplasia varía en función del grado del familiar afectado y la edad media en la que dicho familiar desarrolló la enfermedad. Así, cuando se trata de un familiar de primer grado el riesgo de cáncer colorrectal se duplica. También parece existir un mayor riesgo cuando el familiar afecto desarrolla la enfermedad antes de los 60 años (8-10).

La mayoría de estudios sobre grupos de población sugieren una susceptibilidad heredada de forma dominante a padecer adenomas y cáncer colorrectal, que explicaría la mayoría de casos del cáncer colorrectal esporádico, sin embargo, esta susceptibilidad puede ser variable en función del grado de exposición a factores ambientales (11).

1.2.2 FACTORES AMBIENTALES

1.2.2.1. Dieta

La obesidad y la ingesta calórica total son factores de riesgo independientes en el cáncer colorrectal. En los últimos años, las distintas investigaciones sugieren que este riesgo podría ser consecuencia del equilibrio energético. Si bien la determinación exacta de la diferencia entre el aporte y el consumo de energía no es práctica en grandes estudios de población, existen medidas indirectas que pueden determinarse, como el peso corporal, los cambios de peso con el tiempo, la masa corporal magra y la

actividad física. A partir de estos estudios, parece existir una correlación directa entre el aumento de peso corporal y el cáncer colorrectal (12,13).

Estas pruebas experimentales hacen pensar que el exceso de energía en forma de un aumento de peso significativo da lugar al desarrollo de una resistencia a la insulina, con aumento de las concentraciones circulantes de insulina, triglicéridos y ácidos grasos no esterificados. Estos cambios suponen un estímulo proliferativo para las células epiteliales del colon y exponen al mayor número de células en división a productos intermediarios reactivos del oxígeno (especies reactivas de oxígeno) (14,15).

Las concentraciones excesivas de factores estimulantes del crecimiento posiblemente favorecerían la proliferación de células epiteliales del colon que ya presentan un control defectuoso del ciclo celular. Además de la estimulación de la proliferación celular, parece existir una pérdida focal de la función de barrera normal de las células epiteliales. Esta pérdida focal de la barrera causa una inflamación local y la liberación de especies reactivas de oxígeno. El resultado de estos efectos focales es la generación de focos aberrantes de células en proliferación en las criptas. Estas células empiezan a apilarse en la superficie luminal de la cripta, llegando finalmente a convertirse en un adenoma. Los pasos en la formación de un adenoma y la posible transformación de adenoma a cáncer dependen de la activación progresiva de oncogenes específicos y una pérdida concomitante de genes supresores específicos (15).

I.2.2.1.1. Carne, Grasa y Proteínas

La ingestión de carnes rojas se ha asociado a un incremento del riesgo de cáncer colorrectal (16-18). Sin embargo, el hecho de que la abstinencia de ingerir este tipo de carne conduzca a una disminución de la incidencia de cáncer colorrectal, es una cuestión que aún no se ha aclarado ya que los

distintos estudios realizados hasta el momento muestran resultados contradictorios (19).

En términos generales, una dieta rica en proteínas se asocia a una proliferación epitelial acelerada. Si bien no se ha demostrado que una ingesta elevada de proteínas pueda aumentar la carcinogénesis (20).

Los componentes grasos de la carne roja podrían ser promotores de la carcinogénesis, ya que estas grasas son metabolizadas por bacterias intraluminales a agentes carcinógenos (21,22), lo que resulta en una proliferación anormal del epitelio colónico. Existe controversia en cuanto a si el tipo de grasa es importante. Algunos estudios sugieren que las grasas animales saturadas pueden determinar un riesgo especialmente alto (16-21), sin embargo, otras investigaciones apuntan a que no existe evidencia de un mayor riesgo para ninguna grasa específica después del ajuste del consumo total de energía (23).

I.2.2.1.2. Fibra

Clásicamente, el consumo elevado de fibra en la dieta se ha asociado a una baja incidencia de cáncer colorrectal. Se pensaba que el consumo de la misma diluía los carcinógenos fecales, disminuía el tiempo de tránsito colónico y generaba un entorno luminal favorable. Sin embargo, estudios recientes, con casuística de mayor tamaño y bien controlados, no han encontrado esa relación inversa entre el cáncer colorrectal y el consumo de fibra (18-24).

I.2.2.1.3. Hortalizas y Frutas

El consumo de vegetales en general, y de verduras en particular, parece asociarse constantemente a una reducción del riesgo de padecer cáncer colorrectal (25). La posible función de las vitaminas antioxidantes, como captadoras de radicales libres de oxígeno para reducir el riesgo de

cáncer, también ha sido estudiada, si bien, los resultados no son concluyentes (25).

Varias líneas de investigación indican que una ingestión más elevada de ácido fólico podría ser beneficiosa para reducir el riesgo de cáncer colorrectal. El ácido fólico proporciona un grupo metilo que se requiere en la síntesis de metionina, empleada en la metilación del ADN y en la regulación de la expresión génica. El ácido fólico también proporciona un grupo metilo para la conversión de uracilo en timina. La deficiencia de ácido fólico puede hacer que el uracilo remplace a la timina en la síntesis de ADN (26).

Estudios epidemiológicos y experimentales han indicado que los suplementos de calcio podrían tener un efecto protector, en tanto reduce los cambios de hiperproliferación subyacentes a la transformación maligna. Una revisión de estos estudios casos-control no ha refutado dicho concepto (27-30).

I.2.2.2. Estilo de vida

La inactividad física se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer colorrectal (16, 21, 31), aunque más para el cáncer de colon que para el cáncer de recto, no obstante, el mecanismo de por qué una vida sedentaria condiciona este aumento no está claro.

La mayoría de los estudios existentes han demostrado un mínimo efecto positivo del alcohol sobre el riesgo de padecer cáncer colorrectal. Esta asociación es más fuerte entre el consumo de alcohol en los varones y el riesgo de cáncer de recto, posiblemente por la interferencia con el metabolismo del ácido fólico a través del acetaldehído (32).

El hábito de fumar también se ha asociado a un mayor riesgo de cáncer colorrectal (16, 21,33).

El consumo crónico de café ó té no se ha asociado a un mayor riesgo de cáncer colorrectal (34,35).

I.2.2.3. Antiinflamatorios no esteroideos

Distintos estudios poblacionales apoyan fuertemente la asociación inversa entre el consumo de aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos y la incidencia de cáncer colorrectal y adenomas (36-39). Como resultado de estos estudios, la administración de antiinflamatorios no esteroideos e inhibidores de la ciclooxigenasa-2 en la poliposis adenomatosa familiar y el cáncer colorrectal esporádico está siendo investigada de manera intensiva.

En la tabla 3 se muestran de modo resumido los factores que participan en la etiología del cáncer colorrectal.

TABLA 3: Factores ambientales que participan en la etiología del cáncer colorrectal.

AUMENTAN LA INCIDENCIA	DISMINUYEN LA INCIDENCIA
Dieta Hipercalórica	Consumo de vitaminas antioxidantes
Elevado consumo de carne roja	Consumo de verduras y fruta fresca
Consumo de carne roja a la parrilla	Uso AINES
Elevado consumo de grasas saturadas	Dieta rica en calcio
Alcohol y Tabaco	
Sedentarismo	
Obesidad	

I.3.BIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL: FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS

El desarrollo de un carcinoma se produce a lo largo de múltiples fenómenos que han sido descritos por Vogelstein y col. (40) y otros autores en el modelo ahora bien reconocido de la carcinogénesis colorrectal (41-44), el cual describe una vía de activación mutacional de oncogenes y de inactivación de genes supresores tumorales. Se cree que para la formación de un carcinoma se alteran más de nueve genes. La mutación inicial probablemente ocurre en el gen APC (adenomatous polyposis coli) del cromosoma 5q, e implica la inactivación del gen APC. La secuencia adenoma-cáncer se activa posteriormente mediante el oncogén K-ras. El paso final implica la pérdida o mutación del gen supresor tumoral p53 del cromosoma 17p. Las múltiples vías desde la mucosa normal hasta el carcinoma no son necesariamente secuenciales sino que más bien son una asociación de mutaciones características del cáncer colorrectal esporádico y hereditario.

I.3.1.SÍNDROMES DE CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO

I.3.1.1.Síndromes de poliposis

I.3.1.1.1.Poliposis adenomatosa familiar (PAF)

Supone del 1-2% de todos los cánceres colorrectales y se asocia al gen APC (45). Se manifiesta primariamente como múltiples pólipos (más de cien) en cualquier localización del tracto intestinal y de tamaño variable. La degeneración carcinomatosa de una o más de estas formaciones se considera inevitable si se deja a la enfermedad seguir su evolución natural (46).

Las manifestaciones extracolónicas tales como pólipos gástricos, duodenales e intestinales, osteomas, tumores desmoides, quistes epidermoides, tumores del SNC, fibromatosis difusa, hipertrofia del epitelio pigmentario de la retina y tumores malignos, que fueran descritos por distintos

investigadores como síndromes individuales, conocidos con el nombre de quien los describiese (Sd. Turcot, Gardner...), son debidos al crecimiento desordenado de otros tejidos, a causa de que la mutación es heredada (47,48). La poliposis adenomatosa familiar (PAF) se trata de un trastorno autosómico dominante, con una penetrancia cercana al 100%. Los miembros de la familia heredan el alelo mutante del gen APC. Esta mutación no altera la función del gen APC, pero en cambio, deja al paciente en riesgo para una segunda mutación que altere la función de este gen (45). El alelo APC normal sufre una mutación en las células epiteliales del colon precozmente en la infancia, iniciando el proceso canceroso. Para la progresión a un cáncer invasor se requieren una serie de años y múltiples alteraciones genéticas adicionales en otros genes diana. Los cánceres invasores en pacientes con síndrome de PAF aparecen a una edad media de 42 años.

I.3.1.1.2. Poliposis hamartomatosa

Los síndromes de poliposis hamartomatosas son raros, se transmiten con herencia autosómica dominante, representan menos del 1% de nuevos casos de cáncer colorrectal cada año. Afecta fundamentalmente a la población pediátrica y a la adolescente (49).

I.3.1.1.3. Síndrome de Peutz-Jeghers

Se trasmite con herencia autosómica dominante y asocia pigmentación mucocutánea y poliposis gastrointestinal. Los pólipos son de gran tamaño, aunque en escaso número, localizados en colon y de forma más frecuente en intestino delgado. Pueden manifestarse como hemorragia digestiva u obstrucción, con un aumento del riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (49).

I.3.1.1.4. Poliposis juvenil

Se caracteriza por la existencia de pólipos generalmente limitados a colon, si bien se han descrito casos a nivel gástrico y de intestino delgado. Se asocia a mutaciones en la línea germinal PTEN, SMAD4 y BMPR1 (49).

I.3.1.1.5. Enfermedad de Cowden

Se caracteriza por la existencia de pólipos hamartomatosos en cualquier localización del tracto gastrointestinal. Sorprendentemente, en este caso no existe un mayor riesgo de cáncer colorrectal. Sin embargo, en un 10% de los pacientes pueden desarrollar cáncer de tiroides y casi el 50% de mama. Se ha asociado a mutaciones en la línea germinal PTEN (49).

I.3.1.2. CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO O SÍNDROME DE LYNCH

Es la forma más común de cáncer de colon hereditario (5-8% de todas las neoplasias de colon) siguiendo un modo de herencia autosómico dominante con una penetrancia aproximada del 80%. El cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) se asocia a mutaciones en los genes de reparación de ADN, fundamentalmente MLH1 y MLH2. Los errores de replicación pueden ocurrir de forma espontánea o por la exposición a un agente exógeno. A diferencia de los pacientes con PAF, los pacientes con HNPCC no presentan alelos anormales para el gen APC por lo que no desarrollan poliposis extensas, haciendo más difícil su identificación. Por tanto, estos pacientes desarrollan pólipos con una frecuencia similar a la población normal, sin embargo, una vez desarrollado el pólipo la progresión a cáncer es mucho más rápida debido a esos defectos génicos hereditarios de la reparación heterogénea.

De acuerdo con los criterios internacionales de diagnóstico (Criterios de Amsterdam I) al menos tres familiares cercanos de dos generaciones sucesivas deben estar afectados por esta patología, siendo la edad de diagnóstico menor de 50 años en al menos uno de los casos. No obstante, estos criterios presentan limitaciones por el hecho de que estos pacientes, además de estar afectados por cáncer colorrectal (CCR), a menudo se ven afectados por otros tumores extracolónicos. Por este motivo, los criterios diagnósticos fueron revisados para contemplar la presencia de estos otros tipos de cáncer (Criterios de Amsterdam II) (50,51).

I.3.2. CÁNCER COLORRECTAL FAMILIAR

Se estima que un 20-30% de los cánceres colorrectales son compatibles con una predisposición genética de manera independiente a los síndromes conocidos (52). La identificación de otros posibles genes implicados tendría un gran impacto clínico.

I.3.3. CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO

Los conocimientos adquiridos del estudio del cáncer colorrectal hereditario han sido fundamentales para explicar las alteraciones genéticas en el desarrollo de los casos esporádicos, los cuales suponen el 90% de los cánceres colorrectales (52).

En el desarrollo del cáncer colorrectal se observan al menos dos tipos de inestabilidad genética. La inestabilidad cromosómica, vía por la cual se desarrolla la mayor parte de los cánceres colorrectales (60%) y caracterizada por aneuploidia, reorganizaciones cromosómicas múltiples y heterogeneidad clonal (42), y la vía de defectos en el sistema de reparación del ADN. De un 15% a un 20% de los cánceres colorrectales, sin embargo, se desarrollan a través de esta última vía, en la que existe un sistema defectuoso de

reparación de la replicación errónea del ADN. Esta vía se caracteriza por la inestabilidad de las secuencias repetitivas y por tanto se conoce como vía de la inestabilidad de microsatélites (IMS) (43).

Los estudios de adenomas de colon benignos precoces, sin embargo, no han conseguido revelar pruebas de inestabilidad cromosómica o de microsatélites generalizada en estos estadios precoces de la vía oncogénica (53). Esta ausencia de pruebas lleva a la conclusión de que ninguna de estas formas de inestabilidad genómica es necesaria para la formación de focos crípticos aberrantes y adenomas precoces (54).

El gen supresor tumoral APC es defectuoso en más del 80% de los pólipos adenomatosos y cánceres colorrectales. Es el defecto más frecuente y el único que aparece más precozmente en la secuencia de alteraciones genéticas acumuladas. En los cánceres colorrectales, la mayoría de las mutaciones del gen supresor tumoral APC causan un truncamiento de la proteína APC y por tanto su pérdida de función. La proteína APC normal tiene como función la degradación de la β -catenina citoplásmica, y su ausencia produce acumulación de la misma en el citoplasma y su translocación hacia el núcleo. Los resultados de la acumulación nuclear de β -catenina, y el incremento de la transcripción inducida por la misma, son la estimulación de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis (55).

Se han descrito deleciones de 18q21 y se ha identificado un gen supresor tumoral DCC, en esta localización cromosómica. Además, los genes SMAD2 y SMAD4 implicados en el cáncer colorrectal también se localizan en 18q21 [41, 55-57]. Parece que la función de SMAD2 en el cáncer colorrectal es un fenómeno tardío, actuando para acelerar la progresión en estadios tardíos de la carcinogénesis invasora (58).

El gen supresor tumoral p53 localizado en el cromosoma 17 es el supresor tumoral más frecuentemente inactivado en las neoplasias malignas del ser humano. La proteína p53 normal reconoce el ADN dañado y actúa

bloqueando la progresión del ciclo celular para permitir la reparación del ADN. Además, esta proteína p53 también puede desencadenar apoptosis.

En la PAF y otros síndromes de poliposis, existe una diferencia significativa en el número de pólipos que presenta cada individuo, incluso dentro de la misma familia. Dietrich y col. (59) fueron capaces de identificar un gen modificador denominado MOM1 que codifica fosfolipasa A2 la cual actúa inhibiendo el número de pólipos.

Aunque las investigaciones se han centrado en identificar las alteraciones genéticas presentes en la secuencia adenoma-carcinoma del cáncer colorrectal, los estudios recientes indican una vía alternativa, probablemente secundaria, para el desarrollo del cáncer. Esta vía se desarrolla desde los pólipos hiperplásicos a través de los adenomas serrados y se caracteriza por mutaciones en el gen BRAF quinasa. Los estudios indican que entre el 3% y 10% de los adenomas tienen mutaciones BRAF en comparación con el 30% a 60% con mutaciones KRAS. El término adenoma serrado hace referencia a pólipos hiperplásicos con morfología dentada que muestran displasia en la lesión (60-62).

Lo que parece quedar claro, es que el cáncer colorrectal es una enfermedad heterogénea, formada por varios subgrupos genéticamente diferentes, cada uno de los cuales se desarrolla a través de vías de alteraciones genéticas bastante distintas. Cada uno de estos subgrupos, requerirá un estudio considerable antes de poder alcanzar finalmente el entendimiento del cáncer colorrectal como enfermedad. Esto puede resultar esencial en el futuro para elaborar tratamientos racionales orientados a nivel molecular y sobre todo tratamientos personalizados orientados hacia una medicina individualizada.

I.4. DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER RECTAL

I.4.1. CUADRO CLÍNICO

Los pacientes con cáncer rectal pueden presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Los síntomas que con mayor frecuencia se asocian son la rectorragia, cambios del hábito intestinal, dolor abdominal, pérdida de peso y síntomas obstructivos (63). Esta sintomatología, excepto en el caso de la clínica obstructiva, no se correlacionan con el estadio de la enfermedad (64).

La rectorragia o sangre rectal a menudo está mezclada con las heces o puede cubrir la superficie de las mismas. Puede ser de sangre roja brillante independiente de la defecación, por lo que, con frecuencia, se atribuye de forma errónea a la existencia de hemorroides. La presencia de sangre roja brillante sólo en el papel higiénico puede valorarse en una persona joven mediante una proctosigmoidoscopia. Todos los demás tipos de hemorragia, incluida la presencia de sangre oculta en heces durante la exploración física rutinaria o la presencia de anemia ferropénica, son indicaciones para la realización de un estudio endoscópico más exhaustivo (65).

El aumento de la frecuencia o la disminución del volumen de las heces, la presencia de moco en las heces o la diarrea mucosa (asociada a grandes adenomas vellosos) son bastante frecuentes. Cuando el tumor está avanzado puede inducir una sensación de plenitud constante, tenesmo y un aumento del esfuerzo para la defecación. Cuando el tumor invade sacro y el plexo nervioso sacro, da lugar a dolor pélvico profundo que en ocasiones se irradia a periné y miembros inferiores. Igualmente, puede aparecer dolor anal por invasión del conducto anal o incontinencia por afectación del aparato esfinteriano (65).

Una detallada anamnesis y una exploración física completa son de vital importancia y nunca deben infravalorarse. La existencia de enfermedades concomitantes puede determinar que el paciente no sea candidato a

tratamiento quirúrgico, e influir en la decisión de realizar tratamiento neoadyuvante o paliativo.

La exploración física debe incluir siempre un tacto rectal para valorar la presencia de masas, y en dicho caso, determinar su localización, movilidad, la presencia de adenopatías extrarrectales (con aproximadamente un 50% de precisión), la invasión en profundidad y si el tumor está adherido o fijo con una precisión del 67% al 84% (66,67). Es esencial la exploración pélvica cuidadosa en las mujeres y la evaluación prostática en los varones.

I.4.2. ESTADIFICACIÓN

La estadificación clínico-patológica, incluido el estado del margen circunferencial de la fascia mesorrectal, es el mejor indicador pronóstico en pacientes con cáncer de recto (68). Es vital la estadificación clínica a la hora de decidir la necesidad o no de tratamiento neoadyuvante con radioterapia y quimioterapia. Por este motivo, es de suma importancia la exactitud de dicha estadificación de la que dependerá el manejo y pronóstico de los pacientes. Si bien se ha estudiado el posible papel pronóstico de otros factores, patológicos, socioeconómicos, moleculares, etc., éstos no son utilizados de forma rutinaria ya sea por la falta de protocolos estandarizados o por el elevado número de pruebas que se requerirían. El marcador molecular más ampliamente estudiado ha sido la supresión de 18q (DCC) (69).

Una de las primeras exploraciones que se realiza es la rectoscopia rígida. Mediante esta prueba se debe determinar:

- Distancia a margen anal.
- Posición anterior/lateral/posterior.
- Tamaño.
- Configuración morfológica.

-Extensión de la afectación circunferencial.

-Confirmar movilidad de tumor y adherencia a estructuras adyacentes (criterios de Masson).

Si los pacientes no están obstruidos, deben someterse a una colonoscopia a fin de descartar la existencia de tumores sincrónicos, lo cual ocurre en el 2% al 9% de los casos.

Otro dato a tener en cuenta en la evaluación del cáncer de recto es la valoración subjetiva y objetiva de la función del esfínter anal del paciente. Un esfínter débil o incompetente puede ser indicativo de colostomía.

Las pruebas de imagen más utilizadas para la estadificación preoperatoria de la enfermedad localizada son la ecografía endorrectal y la resonancia magnética pélvica. La ecografía endorrectal es teóricamente superior a la resonancia magnética al diferenciar un total de 5 capas de la pared rectal, siempre que la realice un operador con experiencia, en cuyo caso muestra una precisión en la valoración de la profundidad de la invasión de la pared del 89 al 92%, sensibilidad del 96%, especificidad del 90% y valor predictivo negativo del 96% (73) y una sensibilidad del 79%, valor predictivo positivo del 74% y valor predictivo negativo del 84% en la detección de adenopatías (74). Esta información será de vital importancia a la hora de plantearse el tratamiento local de la enfermedad precoz, y la posibilidad de neoadyuvancia en enfermedad localmente avanzada.

En tumores localmente avanzados la ecografía endorrectal como la resonancia magnética presentan una precisión similar, siendo ambas superiores a la tomografía computarizada convencional en la evaluación preoperatoria de la invasión en profundidad y la de órganos adyacentes (75). La gran ventaja de la resonancia radica en poder estudiar tumores estenosantes donde la sonda endorrectal no es posible de emplazar, además de ser la única que informa sobre el margen circunferencial.

En la actualidad se acepta que la ecografía debe reservarse para la evaluación de neoplasias precoces (T1 y T2), realizándose siempre una resonancia pélvica complementaria que será fundamental en los estadios localmente avanzados.

En la detección de enfermedad metastásica a distancia son de utilidad la tomografía computarizada y la tomografía por emisión de positrones (PET). La tomografía computarizada con contraste se recomienda en todos los pacientes con cáncer rectal, salvo sujetos muy ancianos o con un cáncer muy precoz. La PET tiene la limitación de no estar disponible en todos los centros hospitalarios, siendo su principal ventaja el poder rastrear todo el cuerpo del paciente. La radiología simple de tórax es una técnica útil y económica para la detección selectiva de metástasis pulmonares así como la ecografía abdominal para las de localización hepática (65).

Como ya se ha mencionado anteriormente antes de la cirugía es preciso identificar la infiltración tumoral local, la existencia de afectación ganglionar y la extensión a otros órganos. Una estadificación correcta permite planificar de forma adecuada la cirugía, así como, plantear las posibilidades reales de otras alternativas terapéuticas como la quimioterapia y/o radioterapia neoadyuvante (76, 77).

La 18F-FDG-PET ha demostrado ser más sensible que la TAC en la detección de afectación metastásica (78), por tanto, mejora la estadificación inicial repercutiendo de manera considerable en la actitud terapéutica a seguir.

Al igual que en otros cánceres, una de las limitaciones de la 18F-FDG-PET en el cáncer colorrectal es la detección de lesiones de pequeño tamaño, subcentimétricas, o de lesiones necróticas con sólo un anillo delgado de tejido viable (79). También ha demostrado una baja sensibilidad en la detección de carcinoma mucinoso (58%), en comparación con las lesiones no mucinosas (92%), probablemente debido a una relativa hipocelularidad. Otra causa de falsos negativos es la actividad fisiológica del trazador a nivel colorrectal, que en ocasiones puede enmascarar lesiones subyacentes.

Los resultados falsos positivos ocurren hasta en un 4% de los casos y pueden deberse a la dificultad en diferenciar la captación normal en tracto gastrointestinal con una lesión maligna y al incremento de captación de 18F-FDG en los adenomas colónicos, considerados como lesiones premalignas. Se ha descrito que alrededor del 90% de los adenomas con tamaño superior a 1,3 cm captan 18F-FDG (80).

El uso combinado de 18F-FDG-PET/TC mejora la localización y caracterización de la lesiones, así en un estudio de Cohade y col. (81) estos autores concluyen en que se eleva la exactitud en la estadificación del 78 al 89%.

La determinación de las concentraciones de antígeno carcinoembrionario (CEA) puede ser útil junto con pruebas de imagen para afinar la precisión de la evaluación preoperatoria. Hasta un 95% de los pacientes que presentan metástasis hepáticas tienen niveles de CEA por encima de 20 ng/ml (82) Además es útil si se plantea un control postoperatorio del CEA, no beneficiándose de esta posibilidad aquellos pacientes con niveles de CEA preoperatorios normales. En los varones debe determinarse la concentración de antígeno prostático específico (PSA), especialmente cuando la glándula se encuentre aumentada de tamaño (65).

La estadificación clínico-patológica del cáncer de recto debe realizarse utilizando el actual sistema de clasificación por estadios (TNM) del American Joint Committee on Cancer (AJCC) y Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) (70) La clasificación de Dukes desarrollada en la década de 1930 por Cuthbert Dukes (tabla 5), patólogo escocés, así como las múltiples modificaciones que se han ido realizando de la misma por distintos investigadores (71), aportan menor información.

La clasificación TNM cataloga los tumores colorrectales en función de la invasión (no del tamaño) del tumor primario (T), el número (no el tamaño o ubicación) de los ganglios locales o regionales metastásicos (N), y la presencia o no de enfermedad metastásica a distancia (M).

TUMOR PRIMARIO (T)

Tx: El tumor primario no puede ser valorado.

T0: No hay signos de tumor primario.

Tis Carcinoma in situ: Incluye las células cancerosas limitadas a la membrana basal glandular (intraepitelial) o lámina propia (intramucosa) sin extensión a la muscular de la mucosa hasta la submucosa.

T1: El tumor invade la submucosa.

T2: El tumor invade la muscular propia.

T3: El tumor invade a través de la muscular propia hasta la subserosa, o hasta tejidos pericólicos o perirrectales no peritoneales.

T4: El tumor invade directamente otros órganos o estructuras o perfora el peritoneo visceral. La invasión directa en T4 incluye otros segmentos colorrectales a través de serosa; por ejemplo, invasión del colon sigmoide desde un carcinoma de ciego.

GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)

Nx: Los ganglios regionales no pueden ser valorados.

N0: Ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales.

N1: Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales.

N2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.

METÁSTASIS A DISTANCIA (M)

Mx: las metástasis no pueden ser valoradas.

M0: No existen metástasis a distancia.

M1: Metástasis a distancia.

El Estadio I de la enfermedad se define como T1 ó 2 sin afectación metastásica ni ganglionar ni a distancia.

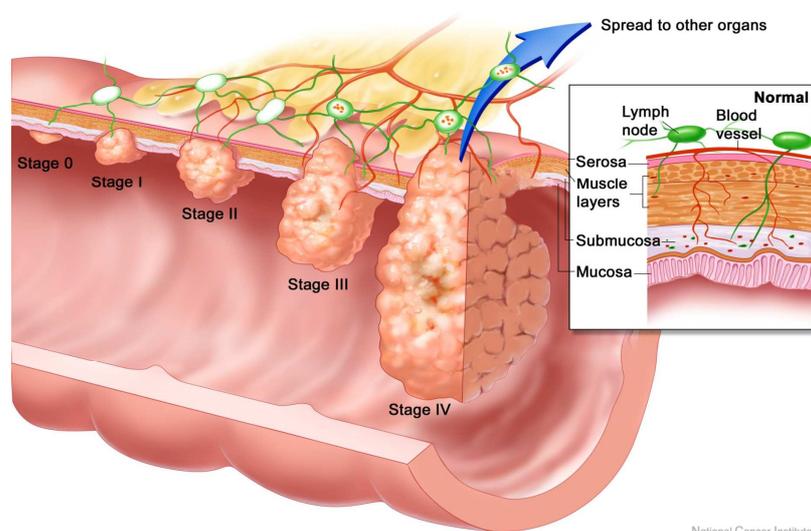
El Estadio II de la enfermedad se define como T3 ó T4 sin afectación metastásica ganglionar ni a distancia. En este estadio el “T” es factor pronóstico por lo que subdivide en IIa (T3N0) y IIb (T4N0).

El Estadio III de la enfermedad se caracteriza por afectación ganglionar metastásica. En una reciente modificación de la clasificación TNM se tiene en cuenta la importancia pronóstica de la afectación ganglionar de manera independiente del “T” en esta fase de la enfermedad, por lo que estratifica este estadio en IIIa (T1 ó 2, N1), IIIb (T3 ó T4, N1) y IIIc (cualquier T, N2). Debido a dicha importancia pronóstica, el sistema de clasificación TNM pide que sean analizados al menos entre 12 ganglios (excepto si el tumor está radiado).

El Estadio IV de la enfermedad se define por la existencia de metástasis a distancia.

La figura 1 muestra los estadios tumorales en cáncer colorrectal.

FIGURA 1: Estadíos tumorales cáncer colorrectal,



La tabla 4 muestra la agrupación por estadios tumorales.

TABLA 4: AGRUPACIÓN POR ESTADÍOS TNM (AJCC/UICC) (70).

ESTADIO	T	N	M
0	TIS	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
IIIA	T1-2	N1	M0
IIIB	T3-4	N1	M0
IIIC	Cualquier T	N2	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

La tabla 5 muestra la correspondencia entre estadios, TNM , Astler-Coller y Dukes.

TABLA 5: Correspondencia Estadificación/TNM/Astler-Coller/Dukes (70,71)

ESTADIO	TNM	ASTLER-COLLER	DUKES
0	TIS N0 M0	-	-
I	T1 N0 M0	A	A
	T2 N0 M0	B1	A
II	T3 N0 M0	B2	B
	T4 N0 M0	B3	B
III	T1 N1-2 M0	C1	C
	T3 N1-3 M0	C2	C
	T4 N1-3 M0	C3	C
IV	T1-4 N1-2 M1	D	D

La supervivencia a los cinco años tras una resección quirúrgica aislada sufre notables modificaciones en función del estadio, siendo del 85-95% para el Estadio I, del 60-80% para el Estadio II, del 30-60% para el Estadio III y menor del 5% para el Estadio IV (72).

I.4.3. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

Las neoplasias rectales más frecuentes son los adenomas y los adenocarcinomas. Otros tumores malignos más raros son los linfomas, los sarcomas, los melanomas, los carcinomas de células pequeñas y carcinoides.

I.4.3.1. Pólipos

Los pólipos rectales pueden ser hiperplásicos o adenomatosos. Los tipos histológicos de los pólipos adenomatosos son tubular, vellosa (> 50% de componente vellosa) y tubulovellosa (20-25% al 50% de componente vellosa). Los niveles de invasión de Haggitt (83) se utilizan para determinar el nivel de infiltración de un carcinoma en un adenoma. Se basan en la morfología macroscópica del adenoma (pediculado, sesil, plano o deprimido) y en el nivel de invasión profunda del carcinoma.

En un adenoma pediculado se distinguen niveles "0, 1, 2, 3, 4". En un adenoma sésil, plano o deprimido, sólo son posibles los niveles "0" y "4".

Niveles de invasión profunda del carcinoma: *Niveles de Haggitt*

a) Carcinoma no invasor

Nivel 0: carcinoma confinado en la mucosa del citopólipo (displasia de alto grado, "carcinoma in situ", carcinoma intramucoso).

b) Carcinoma invasor precoz

Nivel 1: invasión de la cabeza del pólipo (submucosa de la cabeza del pólipo invadida).

Nivel 2: invasión del cuello del pólipo (submucosa del cuello del pólipo invadida).

Nivel 3: invasión del tallo del pólipo (submucosa del tallo del pólipo invadida).

c) Carcinoma invasor

Nivel 4: invasión de la submucosa de la pared colónica.

Nivel desconocido: en algunos pólipos no resulta posible aislar la base de resección quirúrgica. Puede establecerse el diagnóstico histopatológico de invasión de la submucosa pero no es posible valorar la profundidad de la invasión, es decir, se desconoce si está o no infiltrada la pared colónica.

I.4.3.2.Carcinoma

Más del 95% de las neoplasias malignas colorrectales son adenocarcinomas. Dependiendo de sus características histológicas, se clasifican en:

a) Adenocarcinoma (convencional)

Se refiere a la forma habitual de la neoplasia maligna del epitelio glandular colónico.

b) Adenocarcinoma mucinoso (= coloide)

Más del 50% de la lesión está formada por lagos de mucina extracelular, que contienen epitelio maligno formando acinos, tiras epiteliales o células sueltas. Se asocia con frecuencia a inestabilidad de microsatélites.

c) Adenocarcinoma de células en anillo de sello

Más del 50% de las células neoplásicas muestran abundante mucina intracelular (células “en anillo de sello”) independientemente de que pueda también haber lagos de mucina extracelular. Algunos muestran inestabilidad de microsatélites.

d) Carcinoma adenoescamoso

Posee características de carcinoma epidermoide y de adenocarcinoma, bien en áreas separadas del mismo tumor o bien entremezcladas. Se requiere más de un foco ocasional de diferenciación escamosa.

e) Carcinoma medular

Se caracteriza por una sábana de células malignas con núcleo vesicular, nucleolo prominente y citoplasma eosinófilo abundante, rodeadas por un infiltrado linfocitario intenso. Es una variante rara que se asocia invariablemente a inestabilidad de microsatélites y que tiene mejor pronóstico que el carcinoma pobremente diferenciado e indiferenciado.

f) Carcinoma indiferenciado

Tumor maligno epitelial sin ninguna evidencia de diferenciación más allá de la propiamente epitelial (sin diferenciación glandular, escamosa, ni neuroendocrina). Estos tumores son genéticamente distintos y se asocian típicamente con inestabilidad de microsatélites.

Los grados de diferenciación histológica del adenocarcinoma son: bien diferenciado (G1; > 95% del tumor forma glándulas), moderadamente diferenciado (G2; 50-95% del tumor forma glándulas) y pobremente diferenciado (G3; < 50% del tumor forma glándulas) (84), si bien en la actualidad se tiende a clasificarlos en bien o pobremente diferenciados.

1.5. FACTORES PRONÓSTICO EN CÁNCER RECTAL

El Colegio Americano de Patólogos (85) ha evaluado los factores pronósticos (factores ligados al resultado final) del cáncer colorrectal y ha establecido cuatro categorías en función de la evidencia demostrada por cada uno de ellos.

Categoría I incluye aquellos factores que definitivamente probaron tener una importancia pronóstica basada en la evidencia de múltiples ensayos estadísticamente relevantes y que son utilizados en el manejo del paciente.

Extensión local del tumor (Categoría pT) según la clasificación de la AJCC/UICC.

La profundidad de la invasión del tumor en el interior de la pared intestinal, además de la presencia o ausencia de la afectación de los ganglios linfáticos son, con mucho, los indicadores pronóstico más exactos. La tasa de supervivencia a los cinco años en los pacientes con carcinoma *in situ* es de, aproximadamente, el 100%, mientras que la invasión de la muscular propia (pT2) disminuye la supervivencia al 85%. El grado de invasión tumoral se correlaciona positivamente con la incidencia de recidiva local después del tratamiento.

Metástasis ganglionares (Categoría pN):

El Colegio Americano de Patólogos recomienda examinar al menos 15 ganglios linfáticos para afirmar la ausencia de metástasis ganglionares. Aquellos casos donde el número nodos evaluados sea menor, deben considerarse como factor de riesgo en términos de pronóstico y tenerse en cuenta a la hora de decidir la necesidad de terapia adyuvante (86,87).

Invasión Vascular o Linfática.

La afectación de la vascularización de la submucosa y extramural por el tumor se ha asociado con un mayor riesgo de metástasis ganglionares y hepáticas respectivamente (85).

Tumor residual (Clasificación R).

- Resección 0 (R0): Cuando el tumor es resecado de manera completa y presenta márgenes (proximal, distal, circunferencial radial) histológicamente negativos.

- Resección 1 (R1): Infiltración microscópica de los márgenes.

- Resección 2 (R2): Resecciones incompletas con márgenes infiltrados macroscópicamente.

Elevación preoperatoria de los niveles de antígeno carcinoembrionario (CEA).

Un CEA preoperatorio elevado por encima de 5 ng/ml es un factor de mal pronóstico (C0: no elevado, C1: elevado, Cx: desconocido) (88).

Categoría IIA incluye aquellos factores ampliamente estudiados desde el punto de vista biológico y/o clínico y que de manera repetida han demostrado tener un papel pronóstico ya sea en términos de resultado o de respuesta a la terapia, pero que deben ser confirmados con estudios clínicos de mayor potencia metodológica.

Grado Histológico.

La mayoría de sistemas de estadificación establecen cuatro grados histológicos: Grado I (GI) bien diferenciado, Grado II (GII) moderadamente diferenciado, Grado III (GIII) pobremente diferenciado, y Grado IV (GIV) indiferenciado. Se ha demostrado que el grado de diferenciación de un tumor se relaciona con la supervivencia, una mala diferenciación, tumores de alto grado (GIII y GIV), confiere un peor pronóstico en comparación con unos tumores de bajo grado (GI y GII) (68). En la actualidad la escuela de Leeds (68) sugiere clasificar el grado de diferenciación en solo dos clases: bien y mal diferenciados.

Margen Radial Circunferencial (MRC).

También defendido por la escuela de Leeds en el Reino Unido, el margen radial se define como el margen de tejidos blandos adventiciales o perineales más próximos al punto de penetración máxima del tumor. Numerosos estudios han probado que el MRC es un elemento clave para predecir recurrencias locales, a distancia y la supervivencia global de los pacientes, incluidos aquellos que son sometidos a escisión mesorrectal total. Nagtegaal y col. (89) mostraron que aquellos pacientes que han sido sometidos a cirugía con escisión mesorrectal total por cáncer rectal, un MRC menor o igual a 2 mm se asocia a un riesgo de recurrencia del 16%, mientras que aquellos pacientes con MRC menor o igual a 1mm tenían un mayor riesgo de metástasis a distancia así como períodos más cortos de supervivencia.

Clasificación del tumor después de la terapia neoayuvante (ypTNM).

Categoría IIB incluye aquellos factores que han resultado prometedores en múltiples estudios pero que carecen de la suficiente evidencia para ser incluidos en las categorías I o IIA.

Tipo histológico.

Se ha demostrado que los tipos histológicos que tienen una significación pronóstica adversa con independencia del estadio son el carcinoma de células en anillo de sello y los carcinomas microcíticos (84,85). Paradójicamente, el carcinoma de células en anillo puede darse en el marco de una inestabilidad de los microsatélites de alta frecuencia (MSI-H ó IMS-alto) y, en estos casos, el pronóstico puede estar determinado por el estado de los microsatélites y ser, por consiguiente, favorable.

Características histológicas asociadas a la inestabilidad de los microsatélites de alta frecuencia (MSI-H ó IMS alto): infiltración linfocítica y tipos histológicos medular ó mucinoso.

Pérdida de heterocigosidad 18q ó pérdida alélicas (41)

Configuración del borde del tumor

La configuración infiltrante del borde (centros de dediferenciación o tumor incipiente) se asocian a un peor pronóstico.

Categoría III incluye aquellos factores que no han sido suficientemente estudiados como para determinar su posible papel pronóstico.

Contenido ADN.

La supervivencia es mejor en los individuos con tumores diploides y peor en los pacientes con tumores no diploides o aneuploides. Queda por determinar el valor de las determinaciones del contenido de ADN en la valoración del pronóstico individual.

Otros marcadores moleculares.

Se ha sugerido un gran número de marcadores moleculares como factores pronóstico potenciales: genes supresores (LOH 1p/p53, LOH 8p, LOH 1p, LOH 5q), oncogenes (K-ras, c-myc), genes de apoptosis (bcl-2, BAX), genes relacionados con la síntesis de ADN (timidina fosfatasa, timidilato sintetasa), factores de crecimiento (TGF), factores de crecimiento epidérmicos (EGF-R), genes TGF alfa, TGF beta, c-erb-b/her2/neu, EGF-R, genes inhibidores de la kinasa dependiente de ciclina p27,p21), genes relacionados con la angiogénesis (factor de crecimiento del endotelio vascular: VEGF), genes de adhesión molecular y glicoproteínas (CD44, E-cadherin, sialo-Tn antígeno), genes supresores de metástasis (nm23-H1).

- Invasión perineural.
- Densidad microvascular.
- Proteínas y carbohidratos asociados a las células tumorales.
- Fibrosis peritumoral (desmoplasia).
- Reacción inflamatoria purulenta peritumoral.
- Diferenciación neuroendocrina focal.
- Regiones de organización nucleolar.
- Índices de Proliferación.

Categoría IV incluye aquellos factores bien estudiados que no han demostrado tener significación pronóstica.

Tamaño del tumor.

Configuración del tumor.

La configuración del tumor puede ser exofítica, endofítica (ulcerosa), difusa infiltrante (linitis plástica) ó anulares. La mayoría de los estudios realizados no han demostrado que estas configuraciones tengan una significación pronóstica independiente. La linitis plástica se ha relacionado con un mal pronóstico, pero esto puede ser debido a que los tumores que típicamente se asocian a este tipo de configuración son los de alto grado y el de células en anillo de sello.

I.6. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE RECTO

I.6.1. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL CÁNCER RECTAL

La cirugía es la base fundamental para el tratamiento con éxito del carcinoma colorrectal. Su objetivo es la extirpación del tumor primario y cualquier diseminación loco-regional que haya podido producirse, sin provocar diseminación tumoral y con la mejor calidad de vida para el paciente. Se debe distinguir entre cáncer de colon y de recto, ya que esto va a condicionar su patrón de diseminación. El colon es predominantemente intraperitoneal, móvil, lo que facilita su resección con márgenes amplios, siendo su diseminación a distancia, con preferencia en hígado, luego retroperitoneo y en último lugar la recurrencia local. Por el contrario, el recto y el recto-sigma, ambos extraperitoneales y situados en el marco óseo pélvico, plantean mayores dificultades para reseccionar el tumor con márgenes amplios, por lo que tienen mayor tendencia a la recidiva local en pelvis menor.

ESTADIO I

En fases iniciales del cáncer rectal, T1 sin evidencia de afectación ganglionar, un abordaje local puede ser suficiente para el control del tumor primario, evitando la morbilidad asociada a resecciones más amplias. Los beneficios potenciales de la resección local para el cáncer rectal comprenden una reducción de las complicaciones perioperatorias y la conservación de la función anorrectal, vesical y sexual.

La **resección transanal** es la técnica más empleada y una opción adecuada para tumores T1 sin evidencia de enfermedad ganglionar. Sin embargo, este tipo de resección no permite conocer la posible afectación ganglionar, siendo el riesgo de afectación ganglionar del 0-12% en tumores T1 (12-28% en tumores T2) (90). Por este motivo, es crítica una adecuada estadificación preoperatoria para la selección de los pacientes. Para reducir el riesgo de recidiva loco-regional, la excisión local sólo debe llevarse a cabo cuando se cumplan los siguientes criterios de esa neoplasia pT1:

- Menores de 3 cm.
- Afecten a menos del 40% de la circunferencia de la pared rectal.
- Grado Histológico moderadamente o bien diferenciado.
- No evidencia de invasión venosa o linfática.

Muchos investigadores creen útil la administración de radioterapia pélvica concomitante con quimioterapia de manera adyuvante en pacientes con tumores T2 sometidos a excisión local y en pacientes con tumores T1 que llevan asociados factores de mal pronóstico como invasión linfovascular, histología pobremente diferenciada, etc, para disminuir el riesgo de recurrencia locoregional. La alternativa a ésto siempre debe de ser el rescate quirúrgico con cirugía radical.

La proctomía posterior supraesfinteriana (técnica de Kraske) y los abordajes posteriores transesfinterianos (técnica de Bevan o York-Mason) se han utilizado de forma histórica para las lesiones que no son susceptibles de un abordaje transanal convencional. Además, la resección ganglionar puede facilitarse con estas técnicas.

En la actualidad la incorporación indiscutible de técnicas de microcirugía transanal endoscópica ha supuesto un nuevo impulso a la exéresis local del carcinoma de recto en estadios precoces. (90-92).

ESTADIOS II – III

Los carcinomas que asientan en el tercio medio e inferior del recto se deben intervenir practicando una resección anterior baja (RAB), restableciendo el tránsito mediante anastomosis colorrectal manual o mecánica. Cuando se realizan resecciones y anastomosis muy próximas al esfínter (resecciones y anastomosis ultrabajas), es conveniente practicar ileostomías de protección, pues estas técnicas se acompañan con frecuencia de dehiscencias anastomóticas por problemas isquémicos. Además se pueden producir secuelas como la urgencia y frecuencia defecatoria, por lo que cada vez hay más partidarios de asociar los reservorios cólicos o plastias. Sólo los cánceres en los que no se pueda mantener los 2 cm de margen de tejido sano distal al tumor, entre éste y el esfínter anal, serán candidatos a la resección del recto y el ano por vía combinada abdomino-perineal (resección o amputación abdomino-perineal, AAP). Los del tercio superior se deben tratar mediante resección anterior de recto, seccionando el mesorrecto de forma parcial.

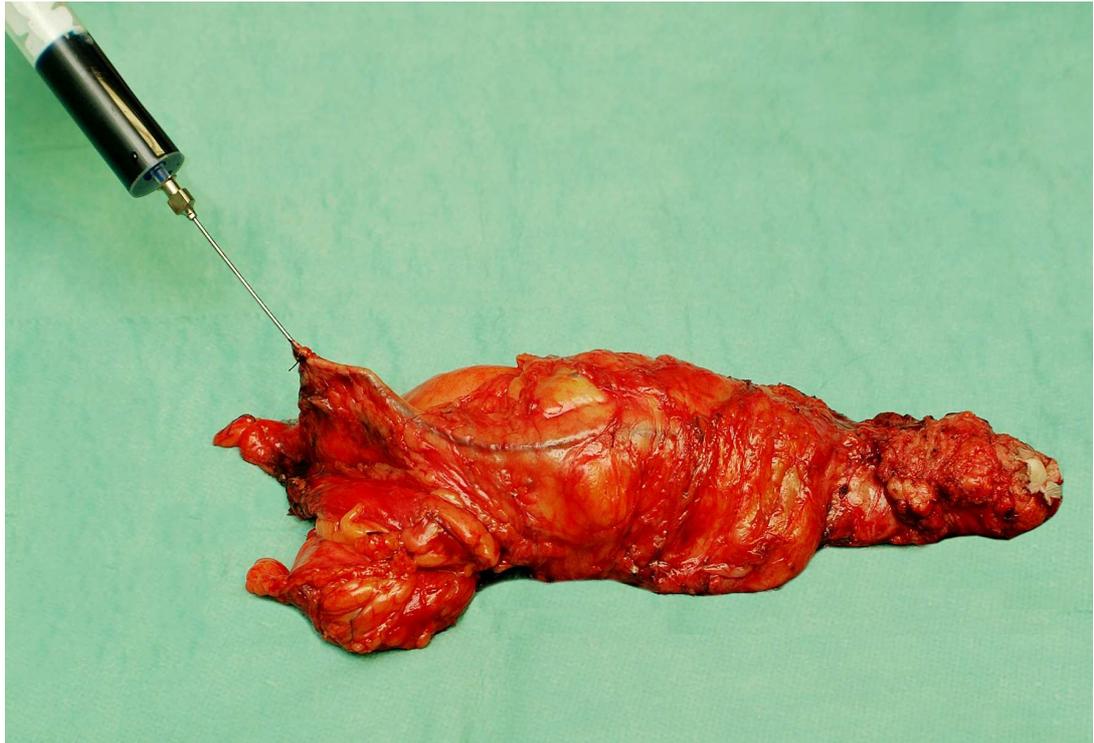
En resumen, el objetivo del tratamiento quirúrgico del cáncer de recto es la resección del tumor con unos márgenes adecuados, así como la resección de los ganglios de drenaje del tumor, incluyendo el concepto de excisión completa del mesorrecto (TME). Se trata de la técnica quirúrgica radical de elección junto con la resección anterior baja (RAB) o la resección abdominoperineal (RAP). La mortalidad es del 1-7% y la morbilidad del 13-46%. La recidiva local se observa en el 4-10% y la supervivencia es del 74-87% (91,92).

Numerosos estudios han demostrado los beneficios de la excisión completa del mesorrecto y determinan que sea hoy en día un procedimiento estándar en el manejo de tumores rectales localizados en recto medio e inferior (93,94).

Todo esto permite una adecuada estadificación de la enfermedad y una disminución del riesgo de recurrencia locoregional y de la diseminación.

En la figura 2 se muestra una pieza quirúrgica con excisión completa del mesorecto.

FIGURA 2: Resección mesorrectal total (RMT)



La capacidad de obtener un margen circunferencial lateral negativo se asocia a un menor riesgo de recurrencia local (95,96). Un estudio prospectivo revela una recurrencia local del 7% tras la adición de TME en comparación con un 23% en los controles históricos.

Realizar cirugía de conservación esfinteriana depende de los requerimientos de un margen distal de 2 cm en lugar del margen tradicional de 5 cm (97-99). Sólo el 2,5% de los pacientes presenta diseminación de la enfermedad con margen superior a 2 cm (100). No existe correlación entre el riesgo de recurrencia local y la extensión del margen anal por encima de 2 cm (101, 102).

La disección de los ganglios linfáticos debe extenderse inmediatamente distal al origen de la arteria cólica izquierda.

I.6.2. TRATAMIENTO NEOADYUVANTE

Uno de los objetivos más substanciales del tratamiento del cáncer rectal es el control de la enfermedad a nivel local. Este hecho constituye la base para considerar la quimiorradioterapia complementaria en el tratamiento del cáncer rectal y, en especial, como base para la enfermedad localmente avanzada, donde se incluyen aquellos casos con afectación ganglionar y/o afectación del margen circunferencial.

I.6.2.1 RADIOTERAPIA

I.6.2.1.1 Tratamiento neoadyuvante radioterápico preoperatorio

En las décadas de los años 70 y 80 aparecen los primeros estudios (103-105) que valoran la radioterapia (sin quimioterapia) preoperatoria a dosis bajas (<35Gy) en cáncer rectal. Pese a las limitaciones que presentaban dichos estudios, parecía existir un cierto beneficio sobre el control local de la enfermedad, no encontrándose mejoría en la supervivencia de dichos pacientes.

La mejoría sobre el control local de la enfermedad queda patente en el estudio europeo de la EORTC (Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer) (106) donde se comparan los efectos de irradiación preoperatoria a dosis moderadas (34,5 Gy) frente a la cirugía sola. Sin embargo, hasta la publicación del estudio realizado por Rider y col. (107) no quedó demostrado el beneficio de la irradiación preoperatoria sobre la supervivencia. Este beneficio de la radioterapia preoperatoria se ha reforzado posteriormente con los resultados de un metanálisis publicado por Stearns y col. (108).

Distintas series han sugerido el empleo de la respuesta anatomopatológica como medida predictiva “sustitutiva” del resultado a largo plazo en pacientes con cáncer rectal (109-112).

Este marcador “sustitutivo” de la supervivencia o el resultado, podría acelerar la evaluación de las nuevas combinaciones de quimiorradioterapia/modalidades combinadas de tratamiento preoperatorio en rápido desarrollo. Sin embargo, el uso sistemático de la respuesta anatomopatológica tras el tratamiento adyuvante preoperatorio como marcador “sustitutivo” de resultado espera una confirmación y evaluación a largo plazo (113).

En cuanto a las consideraciones técnicas de la radioterapia aplicada de forma preoperatoria, debe decirse que son similares a cuando se administra de forma postoperatoria, con una única salvedad, la capacidad de incrementar la dosis por encima de 50Gy especialmente en casos localmente avanzados. Esta escalada de dosis es más factible en el ámbito preoperatorio sin un incremento de las complicaciones asociadas, como sería probable al intentarlo de manera postoperatoria (114-116).

Las principales ventajas del tratamiento preoperatorio son la reducción del estadio del tumor con aumento de su resecabilidad y la probabilidad de conservación esfinteriana, así como una menor incidencia de toxicidad aguda. Estas ventajas a su vez se asocian a la posibilidad de una reducción significativa de la siembra tumoral asociada a recurrencia locoregional de la enfermedad, así como a una disminución de la diseminación de células tumorales viables durante la cirugía, situación que eleva el riesgo de desarrollar focos metastásicos a distancia.

El tratamiento preoperatorio también presenta la ventaja potencial de reducir el riesgo de morbilidad, por el tratamiento, relacionada tanto con la quimioterapia como con la radioterapia, en comparación con la observada con el tratamiento postoperatorio (117,118). Se ha demostrado que la radioterapia administrada de forma preoperatoria conlleva una menor morbilidad que la administrada de manera postoperatoria cuando se realiza una anastomosis coloanal (119).

No se ha conseguido demostrar un mayor potencial de desarrollo de enfermedad diseminada durante el tratamiento preoperatorio y el consiguiente periodo de espera previo a cirugía.

La evaluación de las ventajas o inconvenientes del tratamiento adyuvante preoperatorio frente al postoperatorio en el contexto de un estudio aleatorizado es limitada. En un estudio multicéntrico (120) que comparaba la irradiación preoperatoria frente a la postoperatoria en el carcinoma rectal, la recurrencia local fue estadísticamente más baja después de la irradiación preoperatoria (12%) que tras la postoperatoria (21%). Esta mejoría se observó a pesar de que la dosis de irradiación preoperatoria era baja (25,5 Gy) en comparación con los 60Gy administrados de forma postoperatoria. No existieron diferencias en la supervivencia entre los dos grupos.

Lee y col. (121) comunicaron los resultados de un estudio en fase III del tratamiento adyuvante en el cáncer rectal en estadios II y III diseñado para definir la secuencia óptima de la quimioterapia y radioterapia. En ese estudio se aleatorizó a los pacientes para recibir RT precoz (concomitante con QT) y RT tardía (al tercer ciclo de QT). Este hallazgo se asoció a un incremento de la recurrencia de la enfermedad tanto locoregional como a distancia en aquellos pacientes que recibieron RT tardía y una recurrencia global del 17% en el grupo de RT precoz frente el 27% en el de RT tardía ($p=0,047$). Aunque la supervivencia global no fue significativamente diferente entre los grupos, estos resultados indican que el momento de comenzar la RT adyuvante puede tener un efecto significativo en los pacientes con cáncer rectal.

Otra cuestión relacionada con la secuencia de tratamiento es determinar en qué momento hay que realizar cirugía tras el tratamiento preoperatorio. Hasta la reciente publicación del estudio Lyon R90-01 (122) el momento óptimo para la cirugía tras el tratamiento preoperatorio se basaba en hipótesis y estudios retrospectivos (123). En este estudio se aleatorizaron los pacientes en dos grupos, un grupo fue sometido a cirugía a las dos semanas de la RT preoperatoria y el otro a las 6-8 semanas. No se observaron diferencias en la morbilidad, recurrencia local ni la supervivencia a corto plazo entre los dos grupos. Estos hallazgos, junto a los demostrados previamente de que los cánceres rectales sufren una lenta disminución de volumen durante varios meses tras la irradiación (124), aportaron un apoyo adicional al argumento de que podría ser deseable una mayor demora antes de la cirugía, especialmente en los tumores localmente avanzados, para permitir una máxima regresión tumoral previa a la cirugía.

I.6.2.1.2 Tratamiento adyuvante radioterápico postoperatorio

La principal ventaja de administrar el tratamiento de manera postoperatoria consiste en basar el tratamiento en la estadificación quirúrgica/anatomopatológica. Los estudios iniciales de interés para definir la función del tratamiento adyuvante postoperatorio en el cáncer incluyen el GITSG y el NCCTG (125). En el primero se constató una mejoría significativa de la supervivencia a largo plazo y una reducción significativa de la recurrencia locorregional en pacientes que recibieron quimiorradioterapia adyuvante postoperatoria frente a los que recibieron cirugía sola, si bien se produjo un aumento de la toxicidad global. Resultados similares se encontraron en el estudio NCCTG. Los resultados de estos estudios condujeron a la conferencia *NIH Consensus* de 1990, que recomendó el tratamiento adyuvante (126).

En el estudio NSABP R-02 (127) se evaluó el efecto de la irradiación en el contexto del tratamiento neoadyuvante. No se encontraron diferencias en términos de supervivencia a los cinco años pero sí una reducción significativa de la tasa de recidiva locoregional en aquellos pacientes que habían sido tratados con quimiorradioterapia frente a los que habían recibido quimioterapia sola (8% vs 13%).

El éxito del tratamiento postoperatorio radica en la capacidad para seleccionar a los pacientes con un alto riesgo de recurrencia locoregional o a distancia de la enfermedad, basándose en la estadificación anatomopatológica y en los hallazgos quirúrgicos. Esto también minimiza la posibilidad de tratar en exceso a los pacientes con enfermedad precoz (estadio I) o afectación metastásica. Además, se evitan problemas de cicatrización de la herida asociadas al tratamiento preoperatorio.

1.6.2.2 QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia ha tenido una función sólo de apoyo en el tratamiento del cáncer rectal. Los resultados de estudios recientes pondrán un mayor énfasis en el empleo de la quimioterapia. Uno de los estudios que demostró la importancia de la quimioterapia fue el de O'Connell y col. (128) en el que se mostró que la perfusión continua de 5-FU en el contexto del tratamiento adyuvante aumentaba significativamente el tiempo hasta la recidiva con un descenso del 27% ($p=0,01$) y disminuía la muerte en cerca de un 31% ($p=0,005$) cuando se comparaba con 5-FU con bolo iv.

El resultado del estudio NSABP R-02 sembró dudas sobre la necesidad de irradiación postoperatoria y el efecto de la quimioterapia basada en 5-FU (127).

En este estudio 348 pacientes recibieron de manera postoperatoria 5-FU y 345 recibieron quimiorradioterapia. La irradiación no dio lugar a efectos beneficiosos sobre la supervivencia sin enfermedad ni sobre la supervivencia

global. Sí mostró efecto beneficioso sobre la tasa de recurrencia local que se redujo del 13% al 8% en un periodo de seguimiento de 5 años.

La comunicación sobre el uso del tratamiento adyuvante en el cáncer rectal y el análisis del estadio, el sexo y el control local fue realizada por Douglas y col (129). En esta comunicación se incluyeron a 1695 pacientes en tres grupos que evaluaba las emboladas de 5-FU por sí mismas, 5-FU más ácido folínico y 5-FU/ácido folínico más levamisol. Las conclusiones fueron que no existían diferencias en la supervivencia global ni en la supervivencia sin enfermedad entre los distintos grupos del estudio.

Actualmente se está generando un elevado interés en conocer la utilidad de los agentes quimioterápicos orales, especialmente la Capecitabina, frente a la infusión continua de 5-FU (126).

De forma paralela se están ensayando de manera activa distintas combinaciones de quimioterápicos, así como de anticuerpos monoclonales (130).

I.6.3. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE RECTO METASTÁSICO

Aproximadamente el 25% de los pacientes con cáncer colorrectal presentan afectación metastásica sincrónica. Los pacientes con cáncer de recto metastásico a menudo presentan una enfermedad primaria sintomática (127) siendo los síntomas más frecuentes la anemia secundaria a pérdidas sanguíneas en la localización primaria, los síntomas obstructivos y el dolor pélvico. Puesto que el dolor pélvico es continuo y progresivo, el control de la afectación pélvica es lo más importante si se pretende alcanzar algún objetivo en los pacientes curables, así como con medidas paliativas en pacientes incurables.

De modo general, se puede decir que no existe un protocolo de tratamiento estandarizado para estos pacientes, y que cada una de las decisiones terapéuticas debe tomarse de forma individual.

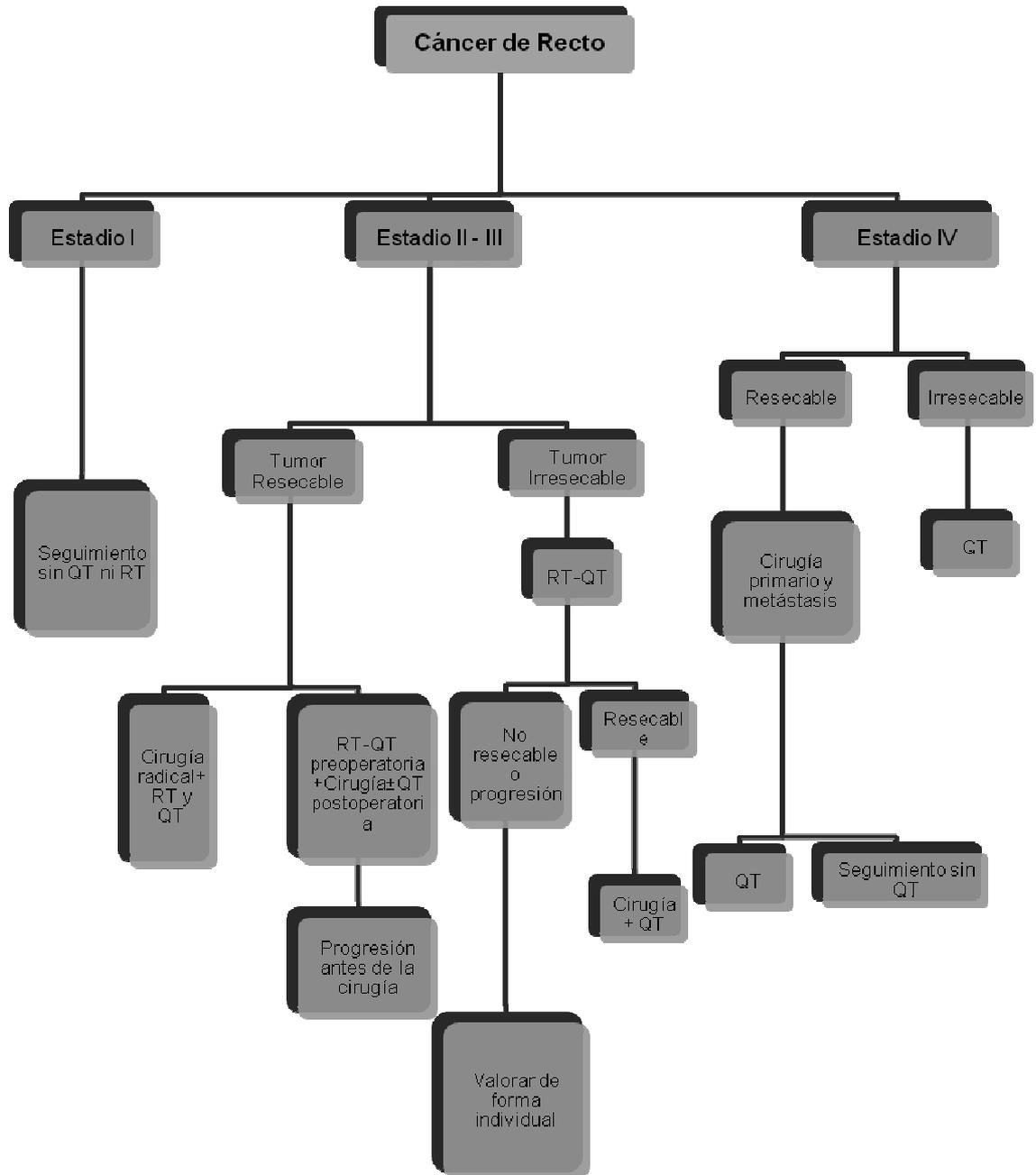
El uso de la radioterapia pélvica en pacientes con cáncer de recto que debutan con metástasis es controvertido. La quimioterapia constituye un tratamiento paliativo y puede ser considerado como tratamiento inicial en la mayoría de los pacientes con cáncer de recto metastásico (128). La colocación de prótesis de metal expansibles puede considerarse para evitar la obstrucción. El control de la enfermedad pélvica tiene importantes implicaciones pronósticas, por lo que el uso de una terapia combinada a base de radioterapia, quimioterapia, y en algunos casos, cirugía paliativa, puede ser una buena alternativa en pacientes con cáncer de recto metastásico, fundamentalmente en aquellos casos donde la afectación metastásica no es muy extensa.

Hay dos estudios que han aportado una información de gran utilidad en el manejo de estos pacientes con cáncer de recto incurable. Matheme y col. (131) comunicaron que la resección paliativa del tumor rectal primario con enfermedad incurable no aumenta la supervivencia ni afecta a la calidad de vida. Se establecieron como factores pronósticos desfavorables la afectación ganglionar, metástasis peritoneales y afectación hepática extensa evidenciada por alteración de los estudios de función hepática.

Assersohn y col (132) demostraron factores pronósticos similares relacionados con la localización metastásica cuando se utilizaba un tratamiento quimioterápico a base de 5-FU. Los pacientes con afectación metastásica peritoneal, ganglionar y pulmonar tuvieron menos probabilidades de respuesta.

En la figura 3 se muestra de modo esquemático el tratamiento complementario de cáncer de recto por estadios (133).

FIGURA 3: Tratamiento complementario del Cáncer de Recto por estadios según Horner y col (133).



La excisión completa del mesorrecto sigue siendo la piedra angular del tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado (134), se acepta tras numerosos estudios que la radioterapia preoperatoria mejora aún más el control local de la enfermedad (135). Hoy en día, tras los estudios del grupo francés de cáncer digestivo se acepta que la administración de quimioterapia, en concreto los derivados de las pirimidinas (5-FU) i.v. o su análogo oral la capecitabina (Xeloda[®]) aumenta la respuesta patológica completa (ypRC) y por tanto mejora el control local (136-139). Al grupo alemán para el estudio del cáncer de recto se debe la estandarización definitiva en la clínica diaria (140).

1.7. VALORACION DE LA RESPUESTA A LA NEOADYUVANCIA

Una adecuada información sobre el efecto de las terapias antitumorales (radioterapia y quimioterapia) contribuiría a la planificación de otros tratamientos complementarios.

Como se ha expuesto anteriormente, el grado de respuesta inducido por el tratamiento neoadyuvante en pacientes con carcinoma rectal, es en sí mismo un factor pronóstico (85), y para algunos autores, con mayor impacto aún que el estadio clínico (116). Este hecho subraya la necesidad de la estimación de dicha respuesta de un modo sistemático y a ser posible estandarizado entre los diferentes grupos de investigación.

1.7.1. VALORACIÓN CLÍNICA, METABÓLICA Y MOLECULAR

De modo teórico la valoración pre-quirúrgica del efecto del tratamiento neoadyuvante pudiera realizarse en base a la modificación de cualquiera de los procedimientos diagnósticos empleados en la estadificación inicial del paciente, sin embargo, su uso en la práctica clínica habitual no ha mostrado la utilidad de los mismos.

- Marcadores tumorales

Es conocido el valor de los niveles de CEA (antígeno carcinoembrionario) pretratamiento como factor de mal pronóstico en pacientes cáncer de recto (85). Del mismo modo también es reconocida su validez para el control evolutivo de dichos pacientes y su capacidad de descartar/diagnosticar la presencia de recidivas en base a sus modificaciones. Sin embargo no está claro (y realmente ha sido poco estudiado) su papel como herramienta para la valoración del efecto terapéutico.

- Métodos de imagen y metabólicos

Las técnicas de imagen convencional, ECO-endorrectal, TC y RM, se han confirmado como pruebas indispensables en la estadificación de estos pacientes, sin embargo, no han demostrado ser predictores positivos fiables de la respuesta clínica al tratamiento neoadyuvante en pacientes con cáncer de recto (116,141-143). Esto se debe a las limitaciones inherentes a los estudios estructurales, que se ven influidos por factores de confusión como puede ser la persistencia de una masa debida a cambios fibróticos o edema. Por tanto, en muchos casos tienden a sobreestimar la extensión local del tumor después de haber recibido tratamiento. Una sensibilidad del TAC del 51% y del 54% para la RM (144) hace que estas técnicas pierdan utilidad en la re-estadificación del cáncer rectal localmente avanzado.

Es conocido, que la 18F-FDG-PET tiene una sensibilidad próxima a 100% en la detección de cáncer de recto diagnosticados de novo (145,146), y que un alto valor del SUV refleja una mayor agresividad tumoral y un mal pronóstico a largo plazo (147). Por otra parte, la 18F-FDG-PET, ha demostrado ser superior a las técnicas de imagen convencional en la reestadificación de pacientes que han recibido tratamiento, mostrando una mayor seguridad en la detección de tumor residual (148-150).

La capacidad de la 18F-FDG-PET para determinar de manera fiable la respuesta a tratamiento neoadyuvante se ha sugerido en gran número de tumores (151-156). En este sentido, se ha propuesto al grado de reducción en la captación de 18F-FDG tras tratamiento neoadyuvante respecto a su valor basal en el estudio pre-tratamiento como un índice para predecir de manera precoz la regresión tumoral de multitud de tumores sólidos tratados con radioquimioterapia (157).

Algunos estudios (158) concluyen que la PET es capaz de discriminar respuesta de no respuesta, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90%. En otro estudio (159) realizado por 31 centros PET a nivel europeo para valorar la respuesta al tratamiento de QT en 12 grupos y RT en tres

grupos, se concluyó, que a pesar de la diferente metodología utilizada en la realización de los estudios PET, esta técnica es un método satisfactorio para aportar información sobre la respuesta al tratamiento. Los pacientes con mayor reducción de captación de ^{18}F -FDG presentan una mejor respuesta clínica.

La ^{18}F -FDG-PET es también más exacta que la TC en distinguir los cambios post-tratamiento de los tumores residuales en pacientes sometidos a ablación por radiofrecuencia (160).

En el contexto clínico del cáncer de recto localmente avanzado tratado con neoadyuvancia son también numerosos los estudios que abordan esta hipótesis, si bien los resultados publicados por los distintos grupos de trabajo son discordantes, tanto si los cambios en el metabolismo local inducidos por el tratamiento con radio y quimioterapia neoadyuvante pueden mermar el rendimiento diagnóstico de la ^{18}F -FDG-PET (148), o si por lo contrario, existe una clara capacidad predictiva de respuesta al tratamiento con el consiguiente impacto sobre el pronóstico (161).

1.7.2. ESTADIAJE ANATOMOPATOLÓGICO

- Respuesta Patológica al tratamiento neoadyuvante (ypTNM):
Modificación de la estadificación.

La radioterapia y quimioterapia aplicada de manera pre-operatoria, puede alterar el T y el N patológico, llegando incluso a producir la desaparición completa de células tumorales en la pared rectal y en nódulos perirrectales. Estos efectos de reducción sobre el estadio “downstaging” (término anglosajón), definido como cualquier modificación del TN patológico (ypTNM) vs el TN clínico (cTNM), han sido utilizados por muchos autores como instrumento de medida de la respuesta al tratamiento (115, 162, 163).

De modo general, puede considerarse que el objetivo final de la terapia neoadyuvante es la obtención de una respuesta completa desde el punto de vista patológico (CPR), entendiendo ésta como la ausencia de células tumorales en la pieza quirúrgica, y en este contexto parece existir cierto consenso en su uso por los diferentes grupos de trabajo (147,164-167).

Sin embargo, el empleo de este criterio como variable respuesta, adolece de ciertas limitaciones. En primer lugar existe un obvio consenso en qué considerar como respuesta completa, sin embargo no está tan claro la estandarización de la ausencia de la misma, es decir, la presencia de actividad tumoral. A este menester, se han considerado diferentes grados de respuesta no completa, principalmente en base a la disminución de tamaño de la lesión tumoral (del inglés “downsizing”) o en la disminución del estadio en la clasificación TNM (ypTNM), en función de la disminución en uno, dos o más estadios respecto a la estadificación clínica (cTNM) (165).

Otra limitación reside en la falta de capacidad para determinar los diferentes estratos histológicos afectos, no discriminando entre la respuesta de tumores que se encuentran en el mismo estrato, al no especificar si la afectación residual es mínima o masiva con respecto a la fibrosis observada (168).

- Índice de Regresión Tumoral: TRG.

En un intento de complementar las limitaciones antes expuestas se ha propuesto el empleo de un índice de regresión tumoral (conocido habitualmente por sus siglas en inglés TRG: Tumoral Regresion Grade). Este criterio parte de que el grado de regresión o respuesta tumoral se caracteriza por una serie de cambios citológicos y a nivel del estroma. Desde el punto de vista citológico, las células neoplásicas muestran vacuolización y/o eosinofilia, picnosis nuclear y necrosis. A nivel del estroma, los cambios propios de la

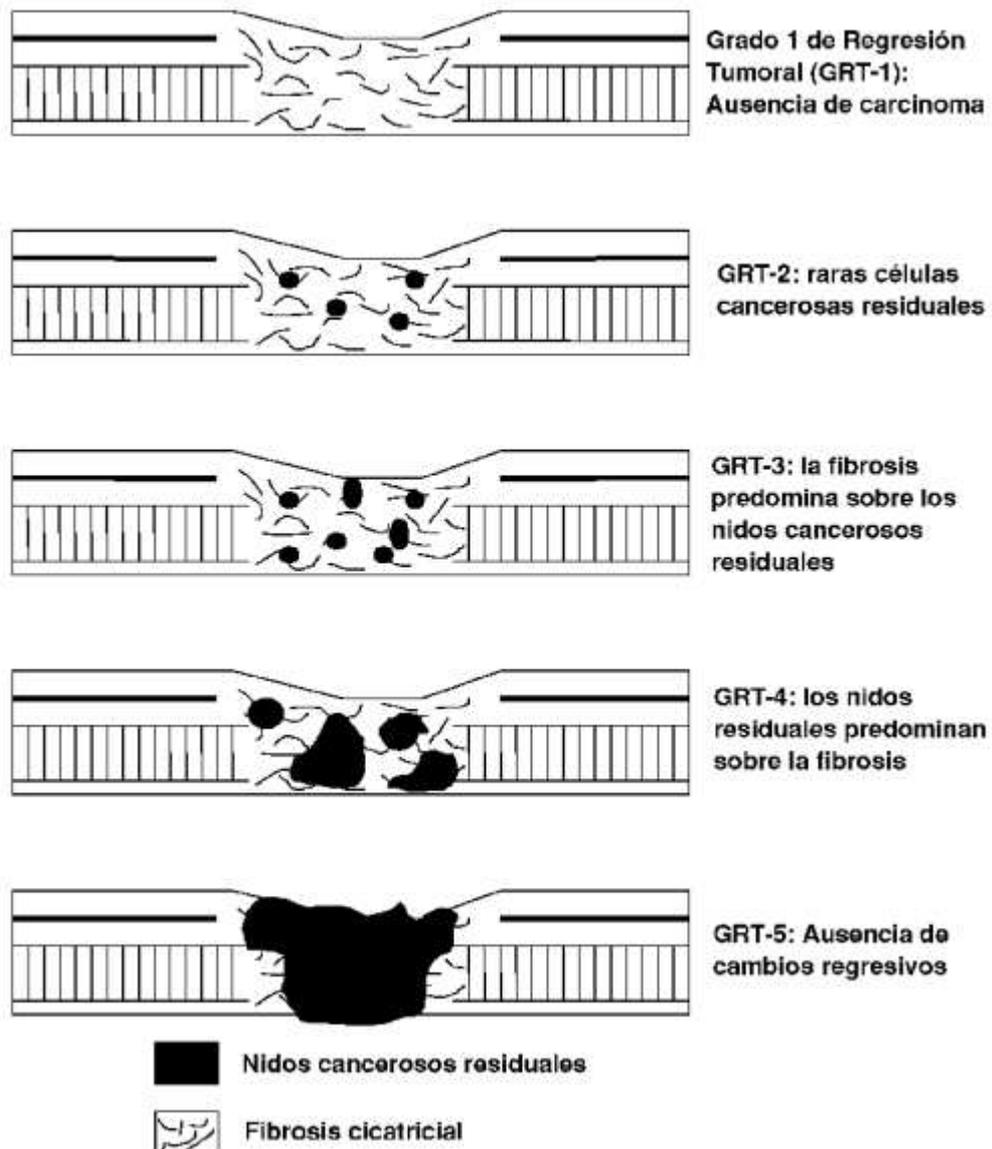
regresión son la fibrosis, con o sin infiltrado inflamatorio, incluyendo el granuloma gigantocelular alrededor de células fantasma y queratina.

Estos hallazgos han llevado a diferentes autores a exponer los signos histopatológicos que permitirían la clasificación de dichos grados de respuesta, que de modo genérico se establece en una clasificación (Tumor Regresion Grade), en cinco grupos dependiendo del porcentaje microscópico de fibrosis y de restos tumorales hallados en la pieza (169,170). Mandard y colaboradores (169) describen cinco grados de regresión originalmente en pacientes con cáncer de esófago tratados con neoadyuvancia:

- Grado I: Ausencia de células neoplásicas.
- Grado II: Alguna célula neoplásica con claro predominio de fibrosis.
- Grado III: Células neoplásicas en la pieza, si bien la fibrosis sigue siendo predominante.
- Grado IV: Predominio de células neoplásicas sobre el componente fibrótico.
- Grado V: Ausencia de regresión.

En la figura 4 se muestra de modo esquemático el esquema de regresión tumoral de Mandard

FIGURA 4: Grados de Regresión Tumoral de Mandard (169).



En base al mismo concepto teórico, el grupo de Dworak (170) define cuatro grados de regresión en pacientes con cáncer de recto tratados con tratamiento neoadyuvante:

- Grado 0: Ausencia de regresión.
- Grado 1: Predomina la masa tumoral sobre la fibrosis.
- Grado 2: Predomina la fibrosis con algunos grupos celulares tumorales.
- Grado 3: Predomina la fibrosis con pocas células tumorales (difíciles de identificar microscópicamente)
- Grado 4: Sólo fibrosis. Respuesta total o total regresión.

Pese a que inicialmente los criterios de Dworak pudieran parecer más “específicos” para su aplicación en el carcinoma colorrectal, la mayoría de los grupos utilizan como criterio estandarizado los criterios de Mandard. De este modo el criterio de Mandard es el que se ha seguido en el estudio que constituye la presente Tesis Doctoral, clasificando a los pacientes en dos grupos, respondedores (aquellos que muestran grados de regresión I y II) y no respondedores (grados del III al V).

I.8.APLICACIÓN DE LOS MICROARRAYS

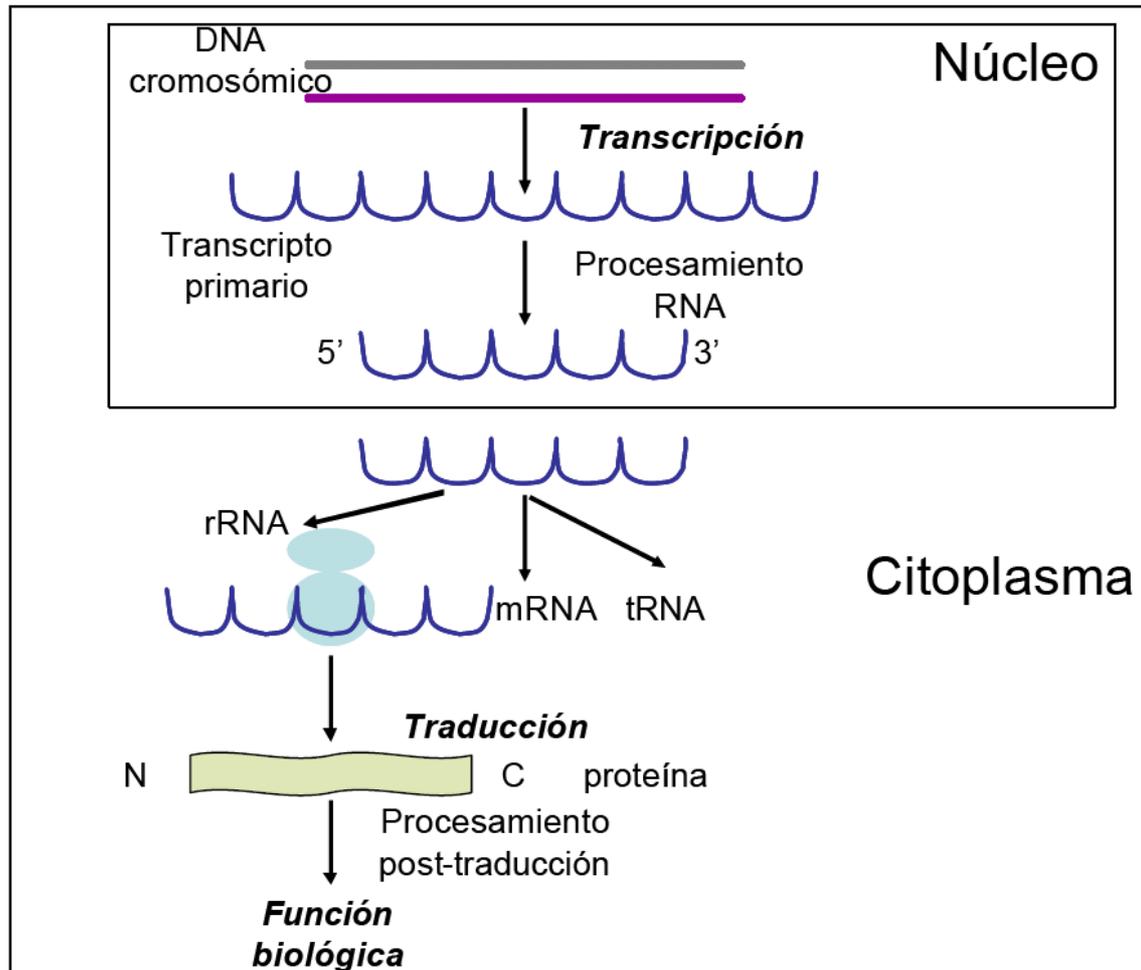
I.8.1. INTRODUCCIÓN

Los genes consisten en porciones de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifican una proteína en particular. Cada segmento de ADN genómico, organizado en cromosomas en el núcleo celular, está construido con cuatro bloques de nucleótidos constituido por un grupo fosfato, un azúcar (desoxirribosa) y una de las cuatro bases nitrogenadas: Adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Durante la síntesis de ARN (transcripción) la doble cadena de ADN se despliega y una de ellas es usada como molde para generar una copia complementaria de cadena simple con la base uracilo (U) que reemplaza a la timina. El ARN es procesado posteriormente, de manera que a partir de un transcrito primario se generan diferentes clases entre ellas el ARN mensajero (ARNm). En el proceso siguiente de traducción, se sintetizan proteínas a partir del mRNA en los ribosomas. La correspondencia entre las cuatro letras presentes en el ADN y los 20 aminoácidos que forman las proteínas está dada por el código genético, que vincula tres bases (codón) a un aminoácido. La proteína sufre diferentes modificaciones post-traducción hasta ser completamente funcional. De esta manera, las características estructurales y funcionales de células y tejidos están determinadas por la expresión simultánea, selectiva y diferencial de miles de genes.

Una propiedad importante del ADN es la complementariedad de las bases que lo componen, así la timina se complementa con la adenina y la guanina con la citosina por medio de puentes hidrógeno de las cadenas opuestas del ADN. Esta propiedad es la base molecular de la técnica de *microarrays*, donde hebras de ADN de diferente origen van a hibridizarse por complementariedad de las bases que las componen (171,172).

De forma esquemática se representa lo antes mencionado en la figura 5

FIGURA 5: Dogma central de la biología molecular: el material genético consiste de ADN, que se transcribe a ARNm que sirve como molde para la síntesis de proteínas. ARNm: ARN mensajero; ARNr: RNA ribosomal; ARNt: RNA de transferencia



I.8.1.1. Fundamento de la tecnología empleada en *microarrays*

La metodología clásica utilizada para la detección y cuantificación de mRNA presente en una célula es el análisis por *Northern blot* y la RT-PCR (Reacción en Cadena Polimerasa)

-*Northern blot*. Técnica que utiliza una sonda radioactiva en solución que se une con un mRNA inmovilizado en un soporte.

-RT-PCR, técnica donde el ARNm es copiado a ADNc (ADN complementario) y se genera un intermediario de doble cadena por la reacción de transcripción reversa (RT) y posterior amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En estas técnicas, el principio fundamental es la hibridación, que se basa en la complementariedad de las bases, pero su debilidad es la detección. En el primer caso la detección de emisión de radioactividad requiere pasos adicionales como la autorradiografía y en el mejor de los casos el escaneo con detectores de radiaciones beta y gamma que aumentan hasta 100 veces la sensibilidad de la técnica. En el caso de la RT-PCR los niveles de detección han aumentado significativamente mostrando en tiempo real la duplicación exacta del material inicial en la reacción de PCR por la incorporación de fluoróforos a la doble cadena naciente. Esto permite detectar cambios de dos órdenes de magnitud comparado con los geles de bromuro de etidio que manifiestan cambios de diez órdenes de magnitud.

Estas técnicas suplieron las necesidades durante muchos años pero sufren la limitación del número de genes a estudiar simultáneamente. Actualmente se requieren informes globales o de miles de genes a la vez, imposibles de detectar mediante radioactividad, debido a que estos ensayos soportan una cierta densidad de puntos en simultáneo, o por PCR en tiempo real, dadas las limitaciones de realizar los ensayos de 96 muestras cada vez (una placa).

La palabra *microarray* deriva del griego *mikro* (pequeño) y del inglés *array* (distribución ordenada). Podríamos decir que las micromatrices permiten el depósito de miles de puntos conteniendo genes o parte de genes sobre un portaobjetos para su estudio de una sola vez en un único experimento. De esta manera es posible tener una visión instantánea de la actividad de genomas completos o de un grupo selecto de genes.

En los estudios de *microarrays* se combinan las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia. De esta manera, sólo en los puntos del portaobjeto donde haya ocurrido hibridación habrá fluorescencia y la intensidad de la fluorescencia detectada será proporcional al nivel de expresión del gen en estudio.

Una condición indispensable es que cada uno de los genes que esté representado sea fácilmente distinguible de otros. En otras palabras la porción del gen inmovilizada en el portaobjeto debe llevar consigo, independientemente de su tamaño, su cédula de identidad. Este punto es de especial importancia en el diseño de los *microarrays* y se basa en búsquedas exhaustivas en las bases de datos públicas (como *Unigene* y *GenBank*) y selección por ensayos de prueba y error (173,174).

1.8.1.2. Componentes de un experimento de *microarrays*

Dada una pregunta biológica o un planteo de sondeo global se obtiene una muestra que será marcada para su posterior detección. Esta muestra marcada es enfrentada al *microarray* donde ocurre la hibridación. Un seguimiento exhaustivo por análisis de imágenes detectará los puntos marcados y los remitirá al correspondiente gen. A continuación, mediante el uso de algoritmos de interpretación se extraerán los datos más relevantes según la hipótesis o se describirán los aspectos que marcan diferencias significativas en experimentos de exploración (Tabla 6). Este esquema básico refleja, en cada uno de sus componentes, decisiones importantes que el investigador debe tomar y que no limitan el método a una hazaña biotecnológica sino al resultado de un arduo entrenamiento técnico y de trabajo en equipo. A continuación se comentan sus componentes.

I.8.1.3.Muestras biológicas

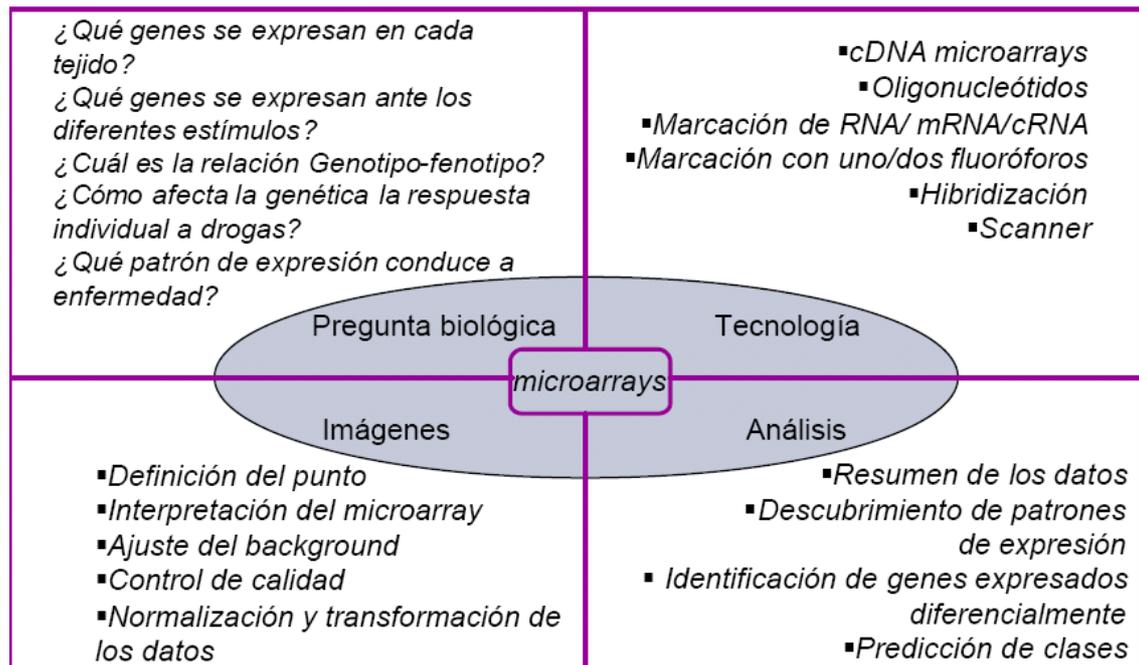
El primer componente que introduce variación a un experimento es la muestra en sí. El éxito de un ensayo de *microarrays* depende en gran parte de la calidad de la muestra obtenida. El ARN total obtenido debe estar intacto y puro, no debe contener proteínas ni ADN contaminante. Para ello se exige que sea evaluada su cantidad y calidad detectada por espectrofotometría y su integridad por electroforesis (deben observarse las bandas de RNA 28S y 18S en proporción y peso molecular adecuado).

Sin hacer mención de los aspectos éticos subyacentes, definir patrones universales con experimentos costosos como los de *microarrays* es una cuestión que no tiene solución aún. La heterogeneidad que presentan líneas celulares inmortalizadas es mínima ante la que pueda presentar una biopsia tomada de un tejido tumoral. Es imposible tener dos muestras biológicas del mismo individuo que den resultados similares por el solo hecho de haberlas manipulado en eventos independientes. A su vez, las comparaciones suelen hacerse contra tejidos normales, pero no existen consensos para las definiciones de normal y afectado, dado que factores como los antecedentes genéticos, sexo, edad, etapa de desarrollo, diferenciación y crecimiento dirigen los patrones de expresión. Tampoco debemos olvidarnos que los tejidos son de diversa composición celular y que cada una de estas células activará diferentes programas de expresión ante diferentes estímulos.

Se ha planteado el uso de mRNA “universales” o de especies diferentes que funcionen como controles internos del ensayo. Estos controles se procesan en conjunto con la muestra y contienen en el *microarray* sondas específicas que monitorizan la calidad del ensayo. De esta manera, se comprobó por diluciones seriadas que los más modernos *microarrays* pueden detectar hasta un transcripto (1 molécula aislada de ARNm). Este es un paso importante que da confiabilidad a la técnica, probando que hasta en el nivel más bajo de transcripción, los transcriptos más raros y menos abundantes serán tomados en cuenta para el análisis.

En la tabla 6 se presentan los puntos que deben tenerse en consideración en un experimento de microarrays.

TABLA 6: Puntos importantes en cada paso de un experimento de *microarrays*



1.8.1.4. Diseño experimental en experimentos de microarrays

El diseño experimental es esencial en los experimentos de *microarrays* y es crucial desde la recolección de muestras y criterios de inclusión, la elección del *microarray* a ensayar y el método para inferir los resultados. En general las preguntas biológicas conducen a probar hipótesis o a producir datos nuevos mediante asociación con parámetros estadísticos. En el primer caso los resultados obtenidos corroboran la hipótesis planteada y en el segundo los datos hablan por si mismos. Ambas estrategias son válidas si las herramientas usadas para convertir los datos en información y la información en conocimiento son robustas.

En muestras patológicas se ha propuesto trabajar con mezclas provenientes de diferentes pacientes afectados para reducir el efecto “personal” en el patrón de expresión. También es indispensable realizar duplicaciones biológicas y técnicas del experimento. Un duplicado biológico es aquel donde se obtiene ARN en dos eventos diferentes o ARN de individuos diferentes que se integran en el análisis. Los duplicados técnicos son las hibridaciones de un mismo ARN en diferentes *microarrays* para evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. De todas maneras, estas repeticiones, aunque mejoran la certeza de los datos obtenidos, no solucionan el problema del tamaño de la muestra en *microarrays*.

1.8.1.5. Tipos de *microarrays*

El concepto básico en *microarrays* es el posicionamiento preciso en un soporte sólido de elementos que funcionen como detectores moleculares en altas densidades. En la práctica, los *microarrays* abarcan una amplia gama que puede tener diferentes soportes (membranas o vidrio) y diferentes moléculas que interaccionan en este medio. Para poder clasificar los *microarrays* debemos dejar claro qué se entiende por *target* (blanco) y que se define como *probe* (sonda). Existen controversias al respecto pero tomaremos por blanco a la molécula libre y como sonda a la inmovilizada.

Existen diversos tipos de *microarrays* según las sondas utilizadas que abarcan metodologías muy variadas que van desde lo más casero hasta lo más sofisticado. Los tipos más comunes son:

Microarrays de ácidos nucleicos

Microarrays de cDNA

Las sondas son producidas en laboratorios de fabricación mediante la amplificación selectiva de cDNAs (100-3000 nucleótidos) por PCR en placas de 96 pocillos.

Estos amplicones se purifican, se verifica su calidad y cantidad y se depositan por capilaridad en portaobjetos de vidrio mediante costosos robots que requieren un ambiente libre de partículas.

Microarrays de oligonucleótidos

Las sondas son porciones de ADN sintético de cadena simple que pueden ser cortas (15-25 nucleótidos) o largas (50-120 nucleótidos). Estos fragmentos pueden ser presintetizados y depositados en portaobjetos por robots o sintetizados *in situ* y depositados por *ink jet* o fotolitografía (DNAchips).

Los *microarrays* que contienen fragmentos presintetizados (cDNA u oligos) pueden ser fabricados en laboratorios con infraestructura adecuada, pero los sintetizados *in situ* o los que vienen con genes preseleccionados prearreglados (*bioarrays*) deben ser adquiridos a diferentes proveedores que poseen plantas de fabricación con un nivel elevado de complejidad y delicados controles de calidad. Los *arrays* de cDNA son los más flexibles y usados en investigación porque permiten depositar genes o fragmentos de genes amplificados de cualquier especie y así diseñar y generar de manera sencilla y menos costosa el grupo de sondas. Por otro lado, requiere de réplicas tanto en el mismo soporte como duplicados técnicos, dado que su punto débil es el depósito del amplicón y la reproducibilidad de sus características físicas (dimensiones, área, límites). La tendencia actual es usar oligonucleótidos de longitud corta, aunque todavía existen quienes cuestionan la especificidad dada por el diseño de sondas tan pequeñas, evidentemente, años de experiencia en diseño de PCRs avalan las ventajas de esta opción.

Microarrays de proteínas

Las sondas son anticuerpos fijados a portaobjetos de vidrio y los blancos son muestras de suero o tejido. Esta técnica se ve por el momento restringida por varios puntos que requieren de tiempo para esclarecerse. Entre ellos se puede mencionar la dificultad de fabricar e inmovilizar estructuras

tridimensionales como son las proteínas y detectar interacciones de proteínas plegadas, sin olvidar mencionar que no se dispone aún de colorantes fluorescentes que permitan cuantificar eficientemente a estas moléculas.

Microarrays de tejidos (TMA)

Esta técnica trata de resolver uno de los problemas principales y limitantes en análisis moleculares de tejidos: el tamaño limitado de la muestra. Se utiliza una aguja hueca par tomar muestras milimétricas de las regiones de interés de tejidos embebidos en parafina, en especial biopsias. Luego se depositan de manera ordenada en un nuevo bloque de parafina y se cortan con un micrótopo entre 100-500 veces reordenándose sobre portaobjetos de vidrio donde se realizarán pruebas múltiples a nivel ADN, ARN y proteínas (inmunohistoquímica, hibridización *in situ*).

Comparative Genomic Hybridization (CGH)

Es un método citogenético molecular que permite monitorizar anomalías cromosómicas. Las alteraciones se clasifican en pérdidas, ganancias y amplificaciones de ADN, incluyendo mutaciones a nivel de cromosomas completos y por *loci*. Permite monitorizar tumores y defectos congénitos a partir de cromosomas en metafase o ADN genómico. La técnica se basa en la hibridación competitiva donde se colorea el ADN tumoral con un marcador fluorescente y el ADN blanco con otro. Permite el estudio de material de archivo como muestras congeladas o embebidas en parafina con el fin de correlacionar la evolución clínica con aberraciones cromosómicas.

La descripción técnica de los aspectos analíticos de estos últimos tres puntos excede el objetivo de esta Tesis Doctoral y en adelante se expondrán los arrays más usados que son los microarrays de ADN.

I.8.1.6. Consideraciones técnicas de la utilización de microarrays

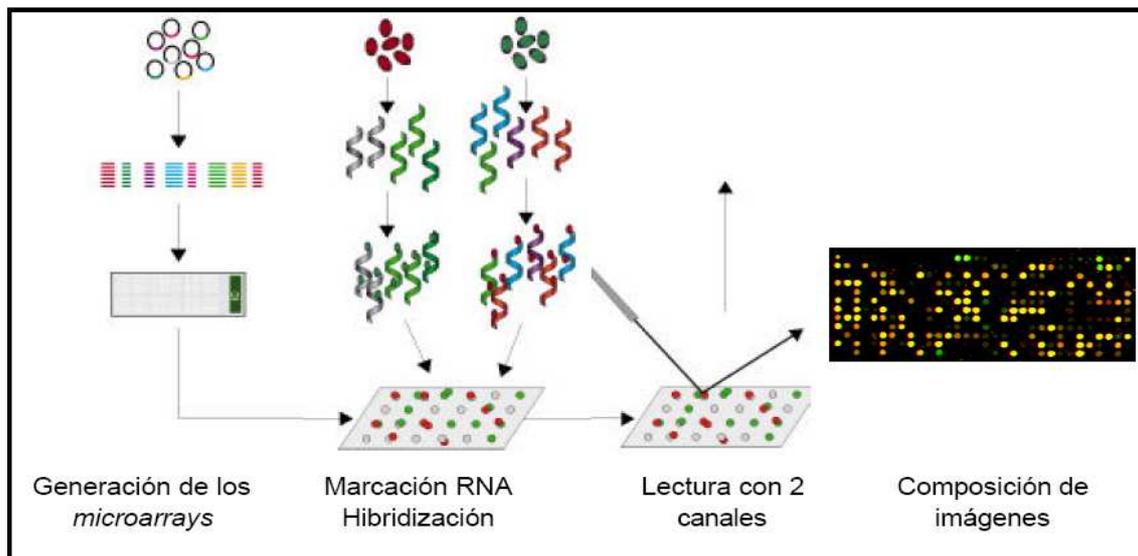
Marcación e hibridización del blanco

En los experimentos de expresión génica el ARN total es obtenido de la muestra biológica y marcado con un colorante fluorescente para su posterior detección. Las primeras propuestas fueron marcar con dos colorantes derivados de cianinas (Cy5 rojo y Cy3 verde) las muestras de ARN total durante el proceso de transcripción reversa o modificar químicamente los nucleótidos *a posteriori*.

Estas muestras provenientes de dos condiciones a comparar se mezclan en cantidades iguales y se hibridan competitivamente en el mismo *microarray*. La lectura se hace con detectores que permitan detectar los espectros de emisión de los dos colorantes en canales diferentes y generar imágenes separadas para cada uno de ellos. Los inconvenientes que plantea este procedimiento son la elevada cantidad necesaria de ARN (20-75 µg) y la afinidad diferente de los distintos colorantes por el blanco. Esto hace imperativo que en el diseño se incluyan experimentos donde las muestras sean marcadas adicionalmente con el colorante opuesto para obtener resultados más confiables. Una complejidad adicional se plantea en el análisis de las imágenes, ya que para medir expresión diferencial deben componerse en un solo archivo de imágenes la superposición resultante del archivo generado con el colorante verde y el archivo generado con el colorante rojo.

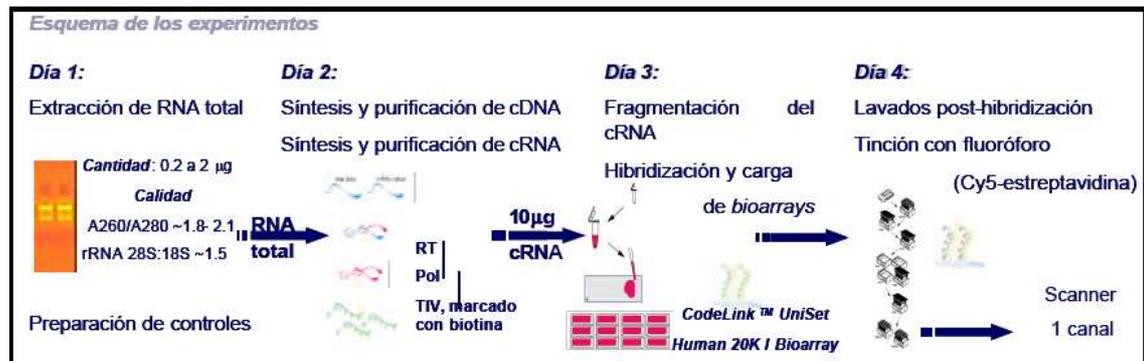
De esta manera los puntos que resulten verdes estarán expresados diferencialmente en una condición y los rojos en otra, mientras que los amarillos estarán expresados en ambas). La figura 6 muestra de manera esquemática los experimentos de microarrays realizados con dos colorantes fluorescentes.

FIGURA 6: Experimentos de microarrays con dos colorantes



Estos inconvenientes son superados cuando se trabaja con protocolos más modernos con ARN copia (ARNc) que resulta de la transcripción *in vitro* del RNA original. Las cantidades requeridas para realizar el experimento son ínfimas (0.2-2 μg) y se marca con un solo colorante. La desventaja de este método es que se hibrida una muestra por *microarray*. En cuanto a la hibridación, las técnicas y protocolos han mejorado radicalmente con procedimientos que tienden a reemplazar los hornos de hibridación y posteriores lavados manuales por condiciones más estandarizadas y cámaras de hibridación flexibles incluidas sobre el portaobjeto de vidrio (Figura 7).

FIGURA 7: Experimentos de microarrays con un colorante



Análisis de los datos

Una vez obtenido el/los archivos de imágenes, hay que transformar las intensidades de las señales obtenidas en datos numéricos, discriminando la señal informativa del ruido que pudiera haber en segundo plano. En este proceso hay que considerar las dimensiones y forma de cada punto analizado de la imagen, su localización y los parámetros estadísticos que pueden asociarse a ellos.

Los controles de calidad son realizados para cada imagen.

Es en este punto donde el trabajo multidisciplinario se vuelve indispensable. El manejo de una cantidad extensa de datos de modo simultáneo requiere el uso de algoritmos de computación para obtener, manejar, procesar y almacenar la información en paralelo. En este escenario los bioinformáticos aportan su conocimiento a los experimentos de *microarrays*.

De esta manera se obtiene una matriz de expresión donde las filas serán genes y las columnas experimentos. En los diseños con dos colorantes se trabaja con proporciones entre las intensidades medidas con cada uno de

ellos y en los realizados con un solo colorante estos datos son absolutos. En ambos casos los datos se normalizan y transforman para disminuir las variaciones y hacer los cálculos posteriores más sencillos.

En este punto debe sumarse al grupo de trabajo un experto en bioestadística que pueda aplicar los supuestos correspondientes para realizar comparaciones que sean válidas estadísticamente. Para un gen dado (fila) pueden compararse las intensidades entre muestras y generar un reporte que exprese encendido y apagado de genes o de cuántas veces más o menos expresado se encuentra en las diferentes condiciones ensayadas. No deben compararse intensidades entre genes (filas) del mismo experimento ya que el nivel de expresión es una propiedad de cada gen, se puede modificar por la expresión de otro gen presente en altos niveles en el mismo experimento y está ligado a complejas vías de control.

Métodos de Agrupamiento y Visualización de los datos

El análisis de agrupamiento o *Clustering* de la matriz de expresión consiste en reunir genes basándose en la similitud de su perfil de expresión.

Existen métodos no supervisados y supervisados basándose en datos previos para concentrar los patrones de expresión relacionados. Entre los métodos no supervisados el más empleado es “k-media” y es apto para organizar datos exploratorios exhaustivos. “K-media” es un algoritmo de partición que divide los ítems en k-grupos de manera que la suma de las distancias al centro del grupo sea mínima. Por otro lado los métodos supervisados requieren un grupo de experimentos que los entrene (*training set*) para generar reglas que puedan hacer predicciones o clasificar datos a testar (*testing set*). Entre ellos se puede mencionar a los basados en redes neuronales de aprendizaje. Los esquemas resultantes son de fácil visualización y altamente informativos.

Interpretación de los datos: *data mining*

Existen diferentes algoritmos que permiten extraer de un grupo selecto de genes su ontología (GO). La ontología de los genes proporciona un vocabulario controlado para describir características de genes y productos génicos en términos de los procesos biológicos asociados, los componentes celulares y la función molecular de manera independiente de la especie en cuestión. Los principios de organización del GO son que un gen tiene una o más funciones moleculares, usadas en uno o más procesos biológicos y puede asociarse a uno o más componentes de la célula.

A partir del conocimiento de los términos de GO y de atribución de éstos a los datos de *microarrays* se pueden visualizar las vías metabólicas que están siendo modificadas.

Reporte de los datos: se creó un consorcio que colecta los datos mínimos acerca de un experimento de *microarrays* (MIAME) de manera que el formato para importar y exportar datos entre laboratorios sea compatible. Este campo es crítico y las publicaciones requieren que se cumplan estos puntos.

Las herramientas contenidas en GEO (*Gene Expression Omnibus*) permiten visualizar, buscar y obtener datos sobre expresión génica.

Cada célula contiene una dotación completa de cromosomas. Sin embargo, la expresión diferencial de los genes es la que dará a esa célula su función biológica. Este proceso de expresión génica es muy complejo en cuanto a regulación y permite a la célula responder de manera dinámica ante cambios instantáneos. Los experimentos de *microarrays* permiten monitorizar en cada momento la expresión génica durante una enfermedad, los cambios en tejidos tumorales, la expresión de marcadores relacionados con factores pronósticos de enfermedad o toxicidad, y los polimorfismos de genes, entre otras tantas aplicaciones (175).

La magnitud creciente de información y el desarrollo de técnicas innovadoras provee hoy al investigador de herramientas poderosas, flexibles, no tóxicas y de alto rendimiento. Esta escala ampliada, tanto en la cantidad como en la calidad de los datos obtenidos en experimentos de *microarrays* plantea una cuestión adicional no sólo porque el volumen de datos que deben ser procesados es muy elevado, sino también porque muchos de dichos datos son obtenidos de manera colateral, sin una hipótesis previa que guíe el experimento, o involucran genes que hoy no tienen función asignada aún para organismos modelo. La información global no es ni buena ni mala en sí misma, es un instrumento que, adecuadamente utilizado, permitirá alcanzar mayores niveles de conocimiento.

La evolución de esta tecnología de avanzada en el tiempo llevó a una disminución de los costos asociados y de los requerimientos de infraestructura, haciendo hoy factible su aplicación en empresas farmacéuticas y en un futuro no muy lejano en centros biomédicos especializados. La implementación de estudios de expresión génica en la población marcará el camino hacia una medicina personalizada donde las estrategias de diagnóstico y monitorización del tratamiento se basarán en la evidencia aportada por experimentos de *microarrays*.

En los últimos diez años, las herramientas de análisis genético han sufrido una revolución técnica comparable a la incorporación del microscopio en los laboratorios. Han aparecido sistemas de análisis genómico masivo que permiten analizar en un solo experimento el estatus de miles de genes. Es decir, ahora, estudiar la relación gen-enfermedad no está basada en analizar un gen único y sus efectos sino en analizar el comportamiento de miles de genes de forma simultánea. Estos sistemas, denominados genéricamente como matrices, arrays, *microarrays* o *biochips*, están cambiando nuestra forma de plantear problemas y extraer conclusiones de los experimentos ya que nos ofrecen una foto compleja del conjunto del genoma. Este conjunto de datos sobre expresión génica y relaciones entre genes tratados de forma sistemática mediante herramientas de análisis masivo, constituye el cuerpo esencial de lo

que denominamos genómica. La genómica intenta proporcionar a los investigadores en biología el equivalente de la Tabla Periódica de los Elementos, es decir, un inventario de todos los genes que se emplean para conseguir una criatura viviente, asociado a un sistema de clasificación que genere bloques o subconjuntos de genes que se comportan de forma coordinada.

Estudios genómicos masivos, como los realizados con microarrays de expresión, nos ofrecen información rápida y reproducible sobre el nivel de expresión de un número elevado de genes (generalmente varios miles) en la muestra estudiada en un solo experimento. Esa información tiene varios niveles de complejidad. El nivel más bajo corresponde a datos simples sobre genes concretos. Un array de expresión puede identificar el nivel de expresión de un gen individual asociado a un determinado fenotipo de forma similar a experimentos más tradicionales. Los niveles más alto de complejidad, sin embargo, permiten examinar la figura completa del conjunto del transcriptoma, es decir todos los genes que se expresan de forma asociada a ese fenotipo. Este nivel de complejidad es imposible de alcanzar con otros sistemas distintos a los biochips. Además, los arrays de expresión han acelerado en varios órdenes de magnitud el descubrimiento de marcadores moleculares de utilidad en medicina clínica. Las investigaciones recientes procedentes de varios laboratorios están revelando principios fundamentales que ayudan a clasificar una enfermedad de acuerdo con su perfil de expresión específico. Esos principios se basan en datos que proceden del análisis de microarrays y que son sorprendentemente reproducibles, a menudo esclarecedores y algunas veces inesperados.

Sin duda, la mayor contribución de los estudios con arrays tiene su nicho natural en la taxonomía. Clasificar un determinado tumor con un nombre y apellidos lo más certero posible permite ajustar el diagnóstico y el tratamiento casi de forma individual. Sin embargo, como es conocido, realizar una filiación adecuada de un caso real depende de muchas variables: circunstancias de recogida de la muestra, ser riguroso en la descripción,

disponibilidad de herramientas de diagnóstico adecuadas y, finalmente, la experiencia del profesional. Todos estos elementos tienen como final el desarrollo de una clasificación de los tumores que sea universal y efectiva. Este desarrollo es paralelo a las estrategias prácticas que se han desarrollado en el campo de la patología. En primer lugar, se da el reconocimiento de una diferencia en la morfología de una manera reproducible y sistemática. En segundo lugar, se intenta establecer la relación entre las características del tumor y las del tejido normal del que se origina. En tercer lugar, se busca y se trata de establecer asociaciones entre la evolución del paciente o la respuesta al tratamiento y la clasificación propuesta, de forma que ésta tenga una utilidad clínico-terapéutica. La tecnología de microarrays puede usarse para derivar clasificaciones, establecer asociaciones con la línea celular de origen y ayudar en el pronóstico, pero con la ventaja añadida de ser capaz de identificar los genes que determinan esa clasificación (176).

I.8.2. MICROARRAYS DE EXPRESIÓN Y SU EMPLEO EN LA TAXONOMÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

En general, como ya se ha comentado anteriormente, el análisis de los patrones de expresión tiene una incidencia directa en el diagnóstico molecular de los tumores. Cuanto mayor sea la capacidad para clasificar un tumor determinado de forma no ambigua, se acumulará información más precisa referente a la biología de ese cáncer (capacidad de metástasis, resistencia al tratamiento, etc.) y, en definitiva, mayores serán las posibilidades de éxito en la curación de ese paciente. El efecto clínico del empleo de los microarrays de expresión, aunque esté pendiente de validaciones a gran escala en grupos de pacientes homogéneos, está basado en dos evidencias que ya se encuentran documentadas en la literatura. Por un lado, los tumores presentan patrones de expresión directamente relacionados con la línea celular de la que proceden y con características clonales específicas de pacientes (177). Por otro, los

patrones de expresión han ayudado a establecer diferencias en la biología y el pronóstico de los tumores (178).

Empleando el microscopio de luz transmitida, los tumores presentan un aspecto que recuerda a la célula normal en la que se origina pero en la que se hubiera detenido el proceso de diferenciación celular. El resultado de esa similitud es que la taxonomía del cáncer está basada en los distintos tipos histológicos normales en los que se origina. Al aplicar los estudios mediante arrays de expresión a diferentes tipos de tumores, lo primero que se observa es que los perfiles de expresión se correlacionan bastante bien con los fenotipos histológicos de los tumores. En leucemias y linfomas, esta relación está comprobada y acerca mucho a una clasificación basada en el linaje celular (179-181). Otros autores han encontrado también diferencias en tumores de origen epitelial. Por ejemplo, tumores de mama primarios se agrupan en dos patrones de expresión semejantes a los encontrados en líneas celulares derivadas de dos linajes diferentes del tejido mamario (células basales y lumbinales) (182).

Es muy interesante comprobar que, al margen del tipo celular estudiado o del tipo de análisis, la proporción de genes que, en cualquier array, aparece diferencialmente expresada entre el tumor y el tejido normal de origen es de, aproximadamente, sólo un 5%. Las relaciones que pueden ser definidas mediante patrones de expresión pueden también contribuir a aumentar el conocimiento de la progresión tumoral. Lesiones precancerosas, como las encontradas en adenomas de colon, pueden separarse mediante patrones de expresión del tejido normal y el carcinoma. Sin embargo, esos patrones de expresión génica del adenoma presentan un mayor grado de similitud con los carcinomas que con el tejido normal. En general, estos estudios demuestran que el linaje celular es un elemento determinante del patrón de expresión de un tumor.

Este compromiso clonal del patrón de expresión de un tumor, íntimamente relacionado con el paciente y su origen de linaje celular, permite obtener marcadores moleculares individuales y, con el tiempo, será muy útil en el desarrollo de terapias individualizadas como se ha comprobado en cáncer de mama (183,184) y hepatocarcinomas (185).

I.8.3. LOS PATRONES DE EXPRESIÓN COMO HERRAMIENTA DE PRONÓSTICO Y PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Una vez establecido que los patrones de expresión reafirman en gran medida los patrones histológicos diferenciales en los tumores, es necesario demostrar que la ventaja añadida de reconocer esos patrones es poder subclasificar los tumores en base a su comportamiento biológico. Esos subgrupos deberían estar definidos mediante marcadores moleculares sutiles y complejos que conlleven un impacto significativo en la predicción del pronóstico y la respuesta al tratamiento. Esta aproximación se ha conseguido en varios tipos de cáncer.

Leucemias agudas y linfomas son tipos de cáncer especialmente informativos por su accesibilidad, la abundancia de marcadores, el conocimiento adquirido de las células normales originales y la existencia de tratamientos muy efectivos. Por ejemplo, se han publicado ya análisis de expresión, con arrays de Afymetrix[®] de más de 300 pacientes infantiles con leucemia linfoblástica aguda (LLA) (186,187). Los resultados permiten clasificar esas leucemias en subgrupos que relacionan patrones de expresión diferentes con alteraciones citogenéticas y/o histológicas esenciales: LLA de células T, hiperdiploidía con más de 50 cromosomas, BCR-ABL, E2A-PBX, TEL-AML1, reordenamientos del gen MLL, y un grupo diferenciado que carece de marcador citogenético específico. Dado que cada uno de estos subgrupos conlleva un pronóstico asociado, el estudio mediante microarrays va a proporcionar un gran número de marcadores informativos sobre la biología de ese pronóstico y facilitará de forma enorme la monitorización del proceso

terapéutico. En la próxima década se podrá asistir a la validación de todos estos marcadores.

Otro ejemplo significativo son los estudios realizados en cáncer de pulmón y próstata y el establecimiento de grupos de pronóstico (188-190). Al menos tres estudios han ayudado a separar los adenocarcinomas de pulmón en tres subgrupos que expresan de forma diferencial un conjunto de genes. Esos subgrupos tienen diferentes patrones de supervivencia: los de peor pronóstico son aquellos adenocarcinomas que expresan de forma preferente genes de diferenciación neumocítica y tienen una alta expresión de genes implicados en procesos de remodelación tisular y actividad proliferativa. Hay publicados estudios de la misma naturaleza en próstata (190). Un cuidadoso análisis que integra datos de cuatro estudios diferentes con microarrays ha identificado que las rutas de biosíntesis de las purinas y las poliaminas están completamente desreguladas a nivel transcripcional.

Finalmente, otro de los usos más prometedores de los microarrays es el empleo de los patrones de expresión como predictores de la respuesta al tratamiento. Se conocen datos confirmatorios en relación con el tratamiento de linfomas, leucemias agudas y cáncer de mama. El grupo de Alizadeh y col en colaboración con el Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project ha estudiado, mediante microarrays de expresión, 240 pacientes con linfoma B difuso de células grandes (181). Han confirmado la existencia de 3 subgrupos y han descrito cinco patrones de expresión diferentes (firmas moleculares) con pronósticos asociados diferenciales. Las firmas del centro germinal, MHC clase II y nódulo linfático están asociadas a buen pronóstico, mientras que las firmas de genes proliferativos y “otros genes” están asociadas a mal pronóstico. Como todos los pacientes recibieron el mismo tratamiento, los resultados de los perfiles de expresión también han podido ser utilizados para elaborar predictores de la respuesta al tratamiento estándar de este tipo de linfoma.

Los estudios realizados con muestras de cáncer de mama han sido realizados con diferentes plataformas y sobre diferentes poblaciones. Sin embargo, los resultados son muy concordantes. La primera conclusión es que el elemento de más impacto en el perfil de expresión del cáncer de mama es el estatus de receptor de estrógenos (RE), reforzando el papel fundamental del eje RE en la génesis del cáncer de mama humano y en la determinación de la respuesta a la manipulación hormonal. Además subdividen los grupos pronósticos con mayor precisión. Sotirou y col. (184) han realizado estudios de perfiles asociados a la respuesta al tratamiento y han podido determinar genes directamente relacionados con la respuesta farmacodinámica.

Hay varios estudios que han demostrado que la firma de expresión génica podría predecir resultados en pacientes con cáncer de colon como los trabajos de Bertucci y col, en el año 2004 (191) y Bandrés y col. (192), en el año 2007. En cáncer rectal el primer informe sobre utilización de la tecnología de microarrays para predecir la respuesta antes de radioterapia preoperatoria fue publicado por Watanabe y col en el año 2006 (193).

I.8.4.PERSPECTIVAS DE LA UTILIZACIÓN DE MICROARRAYS

Los análisis de expresión mediante microarrays de cDNA o de oligos ya son accesibles a la comunidad científica. Los resultados, además, fascinan a los investigadores ya que son bastante reproducibles y aportan una gran cantidad de información sobre la regulación de la expresión génica en condiciones normales y patológicas. Como consecuencia del éxito de estas herramientas, se pueden recoger en la literatura un gran número de experimentos realizados con arrays de expresión y que agrupan, relacionan o describen los perfiles de expresión de cientos o miles de genes según dos tipos generales de preguntas:

¿Se pueden utilizar los perfiles de expresión para clasificar de una manera mejor los diferentes tipos de cáncer?

¿Se puede conocer el efecto, en el perfil de expresión, de estímulos extrínsecos (drogas, estrés, etc.) o internos (mutaciones, sobreexpresión de genes)?

La respuesta a ambas preguntas es afirmativa aunque, en general, este tipo de análisis han de ser validados con posterioridad mediante técnicas de PCR cuantitativa ya que existen problemas de estandarización y otras fuentes de variabilidad como:

- a) La naturaleza normalmente lábil y diluida de las muestras biológicas.
- b) Condiciones estocásticas y subóptimas de los procesos de marcaje y de interacción molecular con elementos microscópicos insuficientemente redundantes.
- c) Sensibilidad indeterminada a factores y procedimientos mal estandarizados y controlados (temperatura y volúmenes de disoluciones, concentración de ozono atmosférico).
- d) Dependencia en instrumentación calibrada de forma variable (baños termostatzados, escáneres).
- e) Diversidad de procedimientos de procesamiento de datos.
- f) Sistemas inapropiados de análisis de datos.
- g) Escasez de recursos bioinformáticos para el tratamiento y comprensión de datos masivos. A todo esto se añade la diversidad existente de alternativas y de plataformas tecnológicas, y la variabilidad del proceso de producción de plataformas “hechas en casa” por laboratorios de apoyo a la investigación de centros académicos.

En resumen, esta tecnología es revolucionaria y tiene y va a tener un gran impacto en la medicina. Sin embargo, ninguna tecnología es suficiente para contribuir por sí sola al avance de las grandes cuestiones abiertas en la investigación biosanitaria. Lo importante son las preguntas y establecer validaciones adecuadas que permitan la traducción de todos estos hallazgos a la práctica clínica de rutina.

HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

La presente Tesis Doctoral postula la siguiente hipótesis de trabajo:

Es totalmente desconocido por qué algunos pacientes con neoplasia de recto responden o no a los protocolos de neoadyuvancia. Todavía no se han identificado marcadores en sangre periférica que puedan predecir esta respuesta, lo cual sería de máxima importancia ya que con ellos se conseguiría individualizar y optimizar el mejor tratamiento para cada paciente.

Así el estudio mediante microarrays de los niveles de expresión de muestras de sangre periférica de pacientes con neoplasia de recto ayudará a individualizar y optimizar el tratamiento más adecuado para cada paciente.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Como objetivo se ha propuesto el siguiente:

-Investigar marcadores biológicos en sangre periférica como factores predictivos de respuesta al tratamiento radioquimioterápico en pacientes con adenocarcinoma de recto localmente avanzado mediante realización de microarrays de ADN.

PACIENTES Y MÉTODOS

IV. PACIENTES Y MÉTODOS

IV.1. METODOLOGÍA

IV.1.1.DISEÑO

Estudio observacional longitudinal prospectivo.

IV.1.2.ÁMBITO

IV.1.2.1.Geográfico

Los pacientes del estudio que constituyen la presente tesis doctoral procedían del área sanitaria Granada-Norte, de la que es referencia el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (HUVN).

IV.1.2.2.Temporal

Los pacientes participantes en este estudio han sido incluidos desde Febrero de 2008 hasta Septiembre de 2010.

IV.1.3.POBLACIÓN EN ESTUDIO

IV.1.3.1.Criterios de inclusión

Se han incluido todos los pacientes diagnosticados de carcinoma de recto localmente avanzado, es decir, aquellos pacientes en los que el tumor invadía la serosa (T3) u otros órganos de forma directa (T4), y/o presentaban afectación ganglionar (N1- N2). Por tanto, eran pacientes en estadios II y III de la enfermedad (clasificación según AJCC/UICC) (70) subsidiarios de tratamiento neoadyuvante con radio y quimioterapia independientemente del sexo y edad.

IV.1.3.2.Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio los pacientes que presentaron alguna de las siguientes características:

- Carcinomas localizados a una distancia superior a 13cm del borde anocutáneo en la rectoscopia rígida.
- Pacientes que por su co-morbilidad no sean subsidiarios de radioquimioterapia.
- Existencia de metástasis hepáticas y/o a distancia (estadio IV)
- Existencia de tumor sincrónico de colon.
- Sospecha de carga hereditaria (Síndrome de poliposis familiar hereditaria y Síndrome de Lynch).

Para ser incluidos en el estudio todos los pacientes aceptaron mediante la firma por ellos, o por sus familiares, del correspondiente consentimiento informado aceptado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (Anexo I).

IV.1.3.3.Población diana

La población diana del estudio propuesto se encontraba constituida por aquellos pacientes con alta sospecha o diagnóstico de neoplasia rectal que, “a priori”, fuesen candidatos a terapia neoadyuvante.

IV.1.3.4.Población accesible

Pacientes con alta sospecha o diagnóstico de neoplasia rectal del área sanitaria, de la cual es referencia el Servicio de Cirugía General del Hospital Virgen de las Nieves.

IV.1.4.MUESTRA DE ESTUDIO

La cohorte prospectiva se seleccionó mediante reclutamiento secuencial siguiendo el orden de llegada al Servicio de Cirugía del Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

No se ha realizado aleatorización, de modo que han sido incluidos todos los pacientes que cumplían los criterios de inclusión.

IV.1.4.1. Estimación del tamaño muestral

Evaluación de la correlación entre la activación de genes y la respuesta a tratamiento en pacientes con elevada sospecha o diagnóstico de neoplasia rectal que fuesen candidatos a terapia neoadyuvante. El tamaño de la muestra se calculó en base a aceptar un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste unilateral para comparación de dos muestras independientes (programa ENE 2.0). Se consideraron 35 pacientes, los cuales debían cumplir con los criterios de inclusión en el estudio para detectar una diferencia mínima del 50% entre la capacidad de respuesta de los pacientes, asumiendo una desviación estándar del 15%.

IV.1.5. PROTOCOLO DE ESTUDIO

IV.1.5.1. Flujo de pacientes

El flujo asistencial de los pacientes incluidos en el estudio se realizó en el marco de la Guía Clínica del Servicio Andaluz de Salud: “Proceso Asistencial integrado Cáncer Colorrectal” en el que participan los siguientes Servicios del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada:

- Digestivo.
- Radiodiagnóstico.
- Oncología Radioterápica.
- Medicina Nuclear.
- Oncología Médica.
- Cirugía General.
- Anatomía Patológica.

Generalmente los pacientes fueron derivados desde su Centro de Salud por la sospecha o certeza de neoplasia rectal al Servicio de Digestivo del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

IV.1.5.2.Procedimiento diagnóstico-estadificación convencional

El procedimiento de diagnóstico-estadificación convencional incluyó:

- Historia clínica y exploración física (tacto rectal).
- Endoscopia digestiva baja (flexible).
- Biopsia.
- Determinación de niveles séricos de Antígeno Carcinoembrionario (CEA).
- Ecografía endorrectal.
- Rectoscopia rígida.
- Resonancia Magnética Pélvica.
- Tomografía por Emisión de Positrones con 18F-FDG, combinada con TC.

IV1.5.3.Estadificación de la enfermedad local (TxNx)

Para la estadificación clínica de la enfermedad local (TxNx) se emplearon la Ecografía Endorrectal y la Resonancia Magnética Pélvica (RM), salvo contraindicación de las mismas, como masa estenosante que impide el paso de la sonda en el caso de la ecografía, o pacientes portadores de marcapasos en el caso de la RM. Cuando los resultados de ambas pruebas obtenidos para un mismo paciente fueron discordantes, a efectos prácticos se consideró el estadio que implicaba un peor pronóstico para el paciente.

Ecografía endorrectal

La ecografía endorrectal se realizó tras realizar rectoscopia rígida con una sonda B&K Medical 360° (Gentofte, Denmark).

Los datos obtenidos mediante la realización de esta prueba fueron:

- Localización del tumor.
- Distancia al aparato esfinteriano.
- Capas del recto afectadas.
- Afectación ganglionar.

Resonancia Magnética Pélvica (RM)

La RM se realizó en un escáner Signa 1,5T (General Electrical Medical Systems, Milwaukee, WI, USA), utilizando una antena phased array (Torsopa, General Electrical Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) de cuatro elementos. El protocolo utilizado para el estudio de neoplasia rectal incluye secuencias axiales centradas en pelvis potenciadas en T1 y T2 y secuencias sagital, axial y coronal de alta resolución siguiendo el eje del tumor. Se determinaron de esta forma los siguientes aspectos de la lesión rectal:

- Localización del tumor.
- Tamaño tumoral.
- Distancia al aparato esfinteriano, considerando como tal el borde superior del músculo puborrectal.
- Extensión local de tumor, especificando qué capas del recto se encuentran afectas.
- Distancia a la fascia mesorrectal: Margen de Resección Circunferencial (MRC).
- Relación con órganos vecinos.
- Existencia o no de tumor fuera de la fascia del mesorrecto.
- Posible ulceración de la reflexión peritoneal.
- Existencia de adenopatías en mesorrecto, especificando en el caso de que las haya si se encuentran en número mayor o menor de tres, y la distancia de los ganglios a la fascia mesorrectal.

IV.1.5.4. Estadificación a distancia (Mx)

Para la estadificación de la enfermedad distal (Mx) se ha empleado la Tomografía por Emisión de Positrones Con Tomografía Multicorte tras la administración de 18F-FDG (18-fluorodexosiglucosa).

A todos los pacientes participantes en el estudio se les realizaron dos exploraciones mediante estudio 18F-FDG- PET/TC: una tras el diagnóstico de neoplasia rectal para completar la estadificación de la enfermedad local y determinar la posibilidad de afectación metastásica a distancia; y otra, a las

seis semanas tras la finalización del tratamiento neoadyuvante para determinar la posible respuesta funcional del tumor a dicho tratamiento o bien evidenciar progresión de la enfermedad.

El intervalo transcurrido entre la finalización del tratamiento neoadyuvante y la realización del segundo estudio 18F-FDG-PET/TC se fijó en seis semanas, con el objeto de minimizar los posibles efectos del tratamiento sobre la interpretación de los resultados obtenidos en el estudio mediante esta técnica (término anglosajón de “*stunning*”); en concreto la posible captación de glucosa por el tejido inflamatorio consecuencia de la radioterapia.

La preparación de los pacientes para la exploración consistió en ayuno de seis horas y no efectuar ejercicio físico en las horas previas a la realización de la misma. El estudio 18F-FDG- PET/TC se realizó previa determinación de la glucemia, siendo recomendable la normalización de la misma, mediante insulina de acción rápida por vía intravenosa, cuando los niveles de glucosa son superiores a 150 mg/mL.

El estudio 18F-FDG-PET/TC se llevó a cabo en un equipo híbrido PET/TAC (Siemens Biograph 16, Knoxville, Tennessee, USA). La dosis de 18F-FDG se estimó en función del peso corporal (oscilando entre 370 y 444 MBq), administrándose por vía intravenosa tras canalización de una vía periférica, para evitar la extravasación de la dosis y permitir la hidratación del paciente mediante infusión de unos 250 cc de suero salino.

La adquisición de imágenes se realizó a los 50-60 minutos después de la inyección, tiempo necesario para una correcta metabolización de la FDG y captación por parte de las células tumorales

A todos los pacientes se les realizó una exploración corporal que incluía desde la base del cráneo hasta el tercio superior del muslo adquiriendo datos para este estudio a tres minutos por paso de camilla. La reconstrucción de los datos obtenidos se realizó siguiendo algoritmos de reconstrucción iterativa, concretamente la técnica Ordered78Subset Expectation Maximization (OSEM) utilizando para ello 2 iteraciones y 8 *subsets*.

Para una adecuada interpretación de los estudios cada exploración fue evaluada de forma visual, incluyendo la imágenes de emisión sin corrección de atenuación, y semicuantitativa.

A) Análisis Cualitativo o Visual

- Se consideraron patológicos aquellos focos de hipercaptación del trazador que no fueran atribuibles a hallazgos de carácter fisiológico.
- Se analizó la presencia de actividad relevante a nivel rectal, la visualización de las imágenes de fusión PET/TC permitió la correlación de los hallazgos funcionales con las alteraciones estructurales, en este caso masas a nivel rectal.
- Cualquier lesión hipermetabólica detectada en el resto del organismo fue considerada, a priori, como probable lesión tumoral maligna, prestando especial atención a aquellos órganos donde son más habituales las metástasis de cáncer de recto como el hígado o el pulmón.

B) Análisis Semicuantitativo

El grado de captación de la zona problema, se determinó mediante el cálculo del índice SUV (Standard Uptake Value o valor de captación estandarizado, Figura 8) de la región de interés (ROI) en relación a la dosis inyectada y al peso del paciente. Se calcularon tanto el SUV máximo de la lesión como el SUV medio, que resulta del cociente entre la actividad metabólica total y el volumen tumoral como se puede ver en la figura 8. Este parámetro es útil para evaluar la respuesta terapéutica en un paciente individual ya que se puede asumir que el error cometido (antes y después), si se mantienen constantes los parámetros de la exploración, está afectado por los mismos factores.

FIGURA 8: Cálculo del índice SUV (Standard Uptake Value o valor de captación estandarizado).

$$\mathbf{SUV = C_{PET} (T) / (dosis\ inyectada / Peso\ del\ paciente)}$$

C_{PET}(T): Dosis administrada corregida por desintegración/Actividad del tumor

IV.1.5.5.Toma de muestra pre-tratamiento neoadyuvante

De cada paciente participante en el estudio se extrajeron mediante punción venosa, utilizando un sistema Vacutainer[®] (Becton Dickinson, California, USA), 15mL de sangre periférica distribuidos del siguiente modo: 3mL en un tubo vacío tipo Venoject II (Terumo, Leuven, Bélgica) para determinaciones analíticas de bioquímica sérica rutinarias, 3mL en un tubo con EDTA como anticoagulante para realización de hemograma y 9 mL (3mL en cada uno de los tres tubos) en tubos que contienen un estabilizador del ácido ribonucleico (ARN) (PAXgene Blood RNA tubes, Becton Dickinson/Qiagen, San Diego, California, USA) para la purificación y aislamiento del correspondiente ARN, con el que posteriormente se procederá a la hibridación de los microarrays .

IV.1.5.6.Tratamiento neoadyuvante

El tratamiento neoadyuvante que se realizó en los pacientes incluidos en el estudio constaba de:

Radioterapia

La radioterapia administrada fue de 28 fracciones (1,8Gy por fracción) sobre la lesión tumoral y mesorrecto incluyendo las adenopatías locorregionales. Se administraban 5 fracciones a la semana

Quimioterapia

El protocolo de quimioterapia administrado de forma preoperatoria y concomitante con la radioterapia consistió en capecitabina (Xeloda[®]) (825mg/m² dos veces al día) de forma aislada o combinada con Oxaliplatino (50mg/m² una vez a la semana) en algunos pacientes con la intención de aumentar la respuesta al tratamiento.

En pacientes con cáncer de recto con metástasis hepáticas potencialmente resecables se modifica el tratamiento neoadyuvante, si bien no se realiza su comentario, al igual que la posibilidad de aplicar radioterapia del llamado ciclo corto, al estar excluidos en el trabajo de investigación que constituye la presente Tesis Doctoral.

IV.1.5.7. Tratamiento quirúrgico

El esquema terapéutico incluye una ventana de espera, entre la finalización de la radio-quimioterapia y la intervención quirúrgica, de 8 semanas. La intervención quirúrgica incluye el concepto técnico de excisión total del mesorrecto tanto para las resecciones anteriores como para las amputaciones abdomino-perineales de recto.

Todos los cirujanos responsables, así como los resultados obtenidos de los pacientes incluidos en esta Tesis, están auditados por la Asociación Española de Cirujanos dentro de su proyecto auditado cáncer de recto (Proyecto Vikingo).

IV.1.5.8. Estadificación anatomopatológica post-quirúrgica

La pieza quirúrgica fue remitida al Servicio de Anatomía Patológica del HUVN donde se realizó un examen exhaustivo, también auditado por la Asociación Española de Cirujanos en su proyecto nacional de cáncer de recto, para determinar el estadio anatomopatológico post-quirúrgico (ypTxNx), el margen circunferencial y el grado de respuesta tumoral (TRG). La pieza siempre se fija en formaldehído para luego ser cortada en su eje axial.

En el informe histológico quedaron detallados los siguientes aspectos:

- Existencia o no de células tumorales en la pieza.
- Capas de recto afectadas.
- Número de ganglios analizados.
- Invasión carcinomatosa ganglionar o acúmulos celulares mucoides
- Afectación o no del margen circunferencial.

- Afectación o no de los márgenes quirúrgicos.
- Excisión de mesorrecto satisfactoria o no.
- Grado de respuesta tumoral (Clasificación TRG de Mandard).

IV.1.5.9. Valoración de la respuesta al tratamiento neoadyuvante

Respuesta Histológica:

- Grado de Regresión Tumoral (TRG)

El grado de respuesta tumoral a la neoadyuvancia se analiza según el método semicuantitativo estándar del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, utilizando los grados de regresión tumoral de Mandard (169). La regresión tumoral se caracteriza por una serie de cambios citológicos y a nivel del estroma. Desde el punto de vista citológico, las células neoplásicas muestran vacuolización y/o eosinofilia, picnosis nuclear y necrosis. A nivel del estroma, los cambios propios de la regresión son la fibrosis con o sin infiltrado inflamatorio, incluyendo el granuloma gigantocelular alrededor de células fantasma y queratina.

En base a la existencia de estos cambios, la regresión del tumor primario se clasifica en cinco grados histológicos de regresión:

- Grado I: Ausencia de células neoplásicas.
- Grado II: Alguna célula neoplásica con claro predominio de fibrosis.
- Grado III: Células neoplásicas en la pieza, si bien la fibrosis sigue siendo predominante.
- Grado IV: Predominio de células neoplásicas sobre el componente fibrótico.
- Grado V: Ausencia de regresión.

Según el grado de regresión tumoral los pacientes, se distribuyeron en dos grupos, denominados, respectivamente como respondedores (grados de regresión I y II) y no respondedores (grados III al V).

- *Estadio Anatomopatológico (ypTNM)*

Atendiendo al estadio anatomopatológico (ypTNM) se considera respuesta patológica completa (ypRC) a la ausencia de células neoplásicas en la pieza.

Se considera “*Downstaging*” o infraestadiaje a cualquier reducción del estadio tumoral ypTNM frente al estadio clínico antes de la radioquimioterapia (cTNM).

Se considera “*Downsizing*” o reducción del tamaño a cualquier reducción de la ypT frente al estadio clínico pretratamiento (cT) evidenciado bien por ecografía endorrectal o por resonancia pélvica. (162).

IV.2. TAMAÑO MUESTRAL

De un total de 112 pacientes tratados en el HUVN por neoplasia de recto durante el periodo de realización de este estudio, se incluyeron un total de 35 pacientes con las características definidas en los apartados anteriores y que cumplían con los criterios de inclusión previamente descritos en el apartado correspondiente.

IV.3. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA

De cada uno de los pacientes participantes en el estudio se procedió a extraer antes de tratamiento radioquimioterápico las muestras de sangre periférica, en forma y volumen descritas con anterioridad.

La muestra de sangre periférica recogida se trasladó de inmediato a La Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada para su procesamiento.

Para el estudio del perfil de expresión génica se utilizaron los microarrays de genoma completo humano del sistema CodeLink™ comercializados por Applied Microarrays (Tempe, AZ, USA). La extracción del ARN se realizó en todas las muestra recogida de sangre periférica obtenidas antes del tratamiento radioquimioterapéutico.

IV.3.1. AISLAMIENTO, PRECIPITACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN

IV.3.1.1. Aislamiento del ARN

El material de laboratorio empleado para el manejo de ARN se trató con dietil-pirocarbonato (DEPC) (Sigma, USA) al 1% y, posteriormente, se autoclavó para evitar cualquier posible contaminación con ribonucleasas (RNAsas).

El ARN total se extrajo a partir de la fracción leucocitaria. El primer paso consiste en recoger la sangre periférica en tubos PAXgene Blood RNA (Becton Dickinson/Qiagen, San Diego, California, USA), que contienen agentes lisadores celulares y agentes estabilizadores del ARN. Para obtener la suficiente cantidad de ARN se extrajo de cada individuo participante en el estudio 3 tubos Paxgene Blood, antes y después de tratamiento radioquimioterápico.

El proceso de purificación del ARN se efectuó siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante del kit PAXgene Blood ARN (PreAnalytix, Becton Dickinson/Qiagen, Holanda). Dicho kit contiene los tampones BR1, BR2, BR3, BR4 y BR5 necesarios para realizar la purificación y que se mencionarán más adelante. El proceso de purificación se describe a continuación y queda representado en la figura 9.

- Centrifugación a velocidad 5.000xg durante 15 minutos de los tubos PAXgene Blood para obtener en el precipitado los ácidos nucleicos.
- Posteriormente, los ácidos nucleicos se resuspenden en 4mL de agua destilada libre de RNAsas y se vuelve a centrifugar durante 15 minutos a 5.000xg.
- A continuación, se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento obtenido en 360µL de tampón BR1, mezclándose vigorosamente hasta que la solución quede homogénea.
- El volumen resuspendido se transfiere a tubos estériles de microcentrífuga a los que se les añaden 300µL del tampón BR2 y 40µL

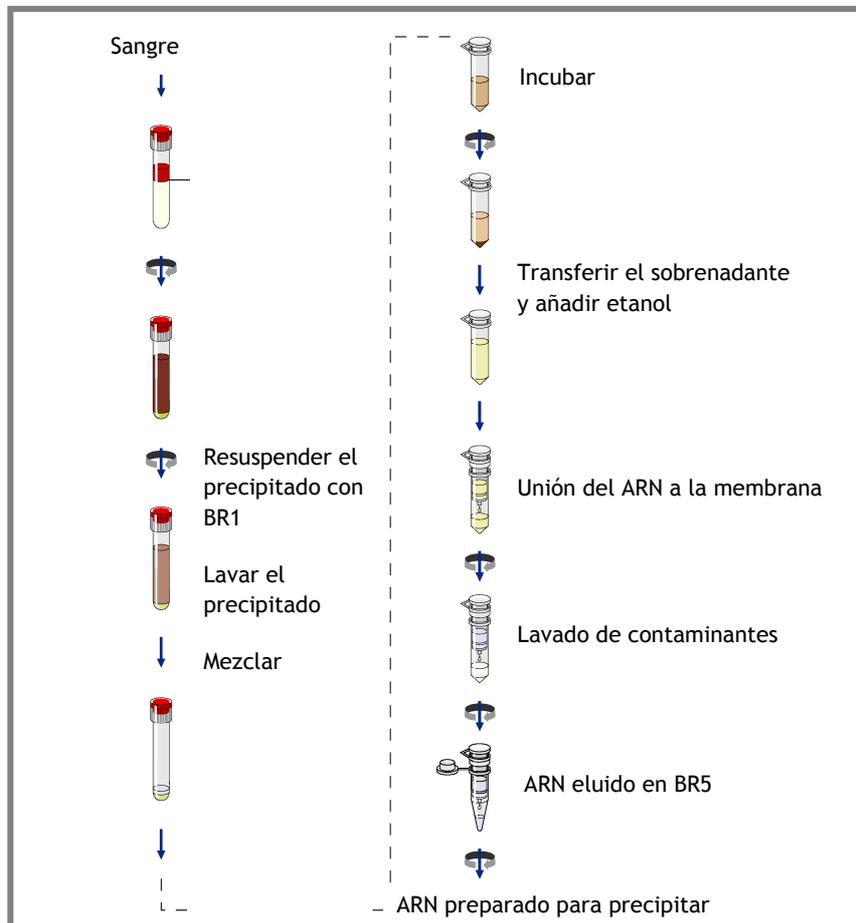
de Proteinasa K para la digestión de las proteínas mediante incubación a 55°C durante 10 minutos en un bloque calefactor con agitador a 1200xg (Thermomixer, Eppendorf, Alemania).

- A continuación se procede a pipetear el lisado directamente a una columna "Paxgene" de disrupción por centrifugación, suministrada en el kit, que se introduce en un tubo de procesado (PT) de 2mL procediéndose a centrifugar durante 10 minutos a máxima velocidad (sin superar 20.000 xg).
- Posteriormente se transfiere cuidadosamente todo el sobrenadante de la fracción eluida a un nuevo tubo de microcentrífuga (MCT) de 1,5mL, procurando no deshacer el precipitado ("pellet") del tubo procesado. Seguidamente se añaden 350µL de etanol (96-100% de pureza) mezclándose en agitador o vórtex.
- A continuación se pipetea 700µL de muestra en la columna "Paxgene" de centrifugación de ARN (también suministrada en el Kit) y se centrifuga durante 1 minuto a 8.000-20.000xg. Transcurrida esta centrifugación se introduce la columna de centrifugación en un tubo de procesado nuevo de 2mL desechándose el antiguo que contiene el eluido.
- Después se pipetea el resto de la muestra en una columna "Paxgene" de centrifugación de ARN y se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a 8.000-20.000xg. Se introduce la columna de centrifugación en un tubo de procesado nuevo de 2mL y se desecha el tubo de procesado antiguo con el eluido.
- A continuación se pipetea 350µL del tampón de lavado BR3 en la columna "Paxgene" de centrifugación de ARN. Se centrifuga durante 1 minuto a 8.000-20.000xg. Se introduce la columna de centrifugación en un tubo de procesado de 2mL nuevo y se desecha el tubo de procesado antiguo con el eluido.
- Después se pipetea la mezcla de incubación de DNAsa (70µL de tampón de digestión de ADN + 10mL de la solución madre de DNAsa)

directamente en la membrana de la columna "Paxgene" de centrifugación de ARN y se deja actuar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.

- Transcurrido el tiempo indicado, se pipetea 350µL de tampón de lavado BR3 en la columna de centrifugación de ARN y se centrifuga durante 1 minuto a 8.000-20.000xg. Se introduce la columna de centrifugación en un tubo de procesado antiguo con el eluido.
- A continuación se pipetea 500µL de tampón de lavado BR4 en la columna "Paxgene" de centrifugación de ARN y se centrifuga durante 1 minuto a 8.000-20.000xg. Se introduce la columna de centrifugación en un tubo de procesado de 2mL nuevo y se desecha el tubo de procesado.
- Este paso se vuelve a repetir una vez más, pero se centrifuga durante 3 minutos a 8.000-20.000xg.
- Para incrementar el rendimiento de elución del ARN se realiza una última centrifugación de 2 minutos a 8.000-20.000xg para secar completamente la membrana de silicagel de la columna, procediendo a continuación a la elución del ARN mediante dos lavados con 40µL de tampón de elución BR5. Tras cada lavado, las columnas se centrifugan durante 1 minuto a 14.000rpm para obtener un volumen final de 80µL de cada columna. Finalmente, se mezcla el volumen obtenido de las 3 columnas de cada individuo (volumen total de 240µL de ARN) y se incuban durante 5 minutos a 65 °C. Tras la incubación las muestras se almacenan a -80°C para posteriores aplicaciones o proceder directamente a la precipitación del ARN.

FIGURA 9: Descripción del método utilizado para la extracción de ARN total. PAXgene®Blood RNA Kit (Preanalytix, Becton Dickinson/ Qiagen, CA, USA).



IV.3.1.2. Precipitación del ARN

La precipitación del ARN comienza con el ajuste del volumen del ARN eluido en BR5 (240µL) a un volumen final de 360µL en agua destilada libre de RNasas. A los 360µL se le añaden 40µL de acetato sódico 2M, pH 4,0, hasta un volumen final de 400µL. A continuación, a la muestra se le añade 1 volumen de isopropanol (400µL) incubándose durante toda la noche a -20°C.

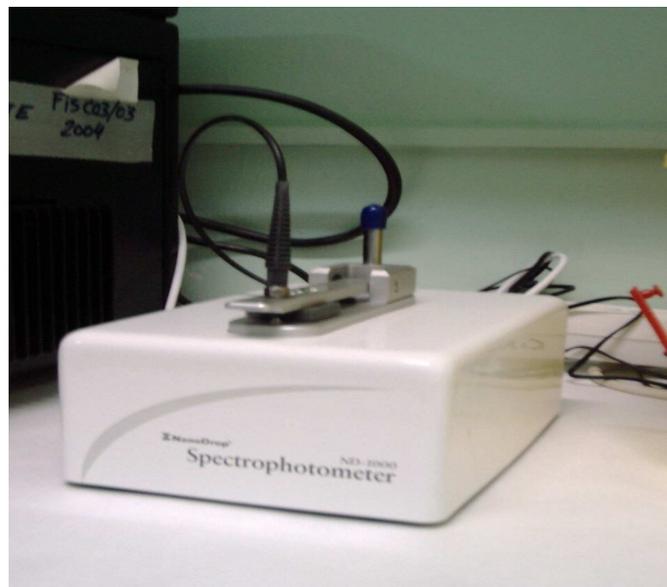
Posteriormente, la muestra se centrifuga durante 10 minutos a 4°C y 12.000 rpm descartándose cuidadosamente el sobrenadante. El sedimento obtenido tras centrifugación se resuspende en 1mL de etanol al 70% y, tras

otra centrifugación en las mismas condiciones (10 minutos a 4°C y 12.000 rpm), volviendo a descartarse nuevamente el sobrenadante. El sedimento obtenido se deja secar durante 15-30 minutos y se resuspende en 12µL de agua libre de RNasas.

IV.3.1.3. Cuantificación y pureza del ARN

La cuantificación del ARN total se determina utilizando un equipo NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, el cual, con tan solo 1µL de muestra de interés, permite conocer la cantidad de ARN presente en ella. Este equipo, además permite intuir la pureza del ARN respecto a posibles contaminaciones proteicas determinando el cociente establecido entre 260-280nm (A_{260}/A_{280}) que debe hallarse entre valores de 1,8-2,1. La figura 10 muestra el equipo utilizado en esta Tesis Doctoral.

FIGURA 10: NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer,



IV.3.1.4. Determinación de la calidad del ARN

La calidad del ARN extraído se evaluó mediante electroforesis capilar en un bioanalizador Experion[®] (Bio-Rad, Richmond, VI, USA). Este método emplea el ARN ribosómico para inferir la calidad del ARN mensajero, ya que del ARN total el ribosómico constituye más del 80% y el mensajero solo entre el 1 y el 3% lo que hace imposible su detección directa.

El bioanalizador Experion[®] (Bio-Rad, Richmond, VI, USA) es un sistema de electroforesis automatizado basado en la tecnología de microfluídica.

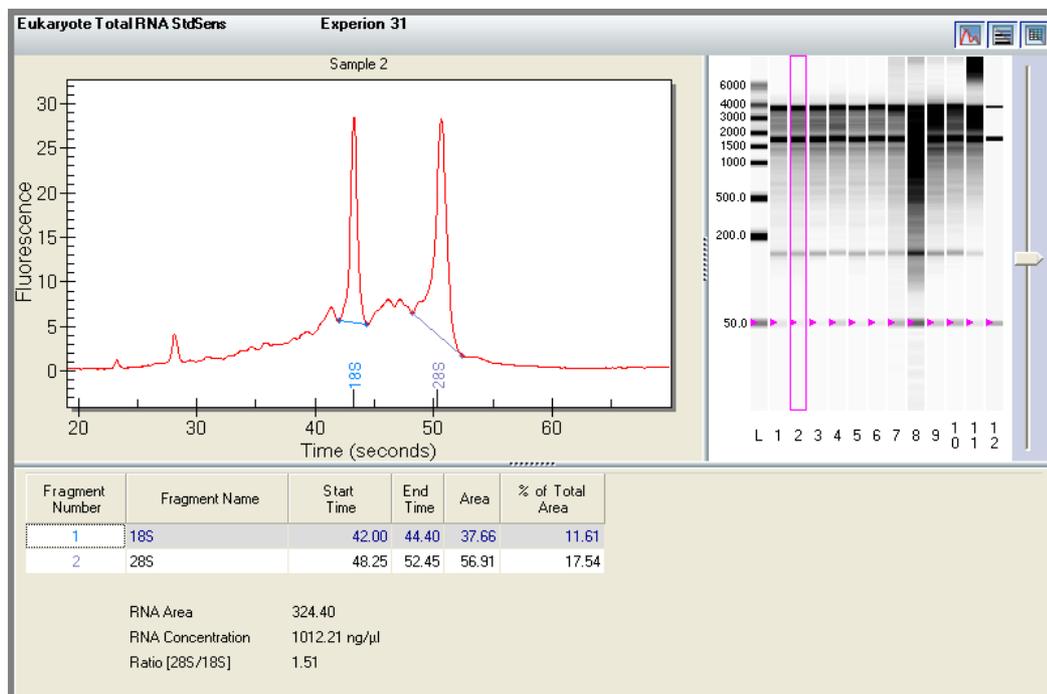
La pieza clave del Experion[®] es el gel que contiene una serie de pocillos de plástico unidos a una superficie de cristal que está conectada a una red de microcanales que interseccionan con cada uno de los pocillos. Cuando estos canales se ceban con el gel y se cargan las muestras de ARN, la estación de electroforesis conduce cada muestra por un microcanal aplicando un voltaje preciso. El Software del Experion[®] genera electroforetogramas que permiten analizar la calidad del ARN obtenido. Primero se genera el electroforetograma de los marcadores de ARN (ladder) en el que se identifican nueve picos a diferentes tamaños. Después, se genera el electroforetograma de la muestra de ARN donde se observan dos picos de pequeño tamaño que corresponden a un marcador interno y al ARN ribosomal 5S, y dos picos mayores que corresponden al ARN 18S y 28S respectivamente.

Una vez comprobada la calidad del RNA obtenido mediante el equipo Experion[®] se continúa con los siguientes pasos que constituyen la realización de los microarrays. La figura 11 muestra el equipo Experion[®] utilizado en la presente Tesis Doctoral. La figura 12 muestra una imagen proporcionada por el equipo Experion[®] del resultado de purificación del ARN de una de las muestras utilizadas en la presente Tesis Doctoral.

Figura 11: Equipo Experion[®] (Bio-Rad) para comprobación de la calidad del ARN utilizado en la presente Tesis Doctoral.



Figura 12: Calidad del ARN purificado en imagen obtenida del equipo Experion[®] (Bio-Rad).



IV.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA HIBRIDAR EN LOS MICROARRAYS

El ARN total (0,2-2 µg) obtenido es sometido a un proceso de transcripción reversa en presencia de T7-oligo (dT) para obtener ADN complementario (cDNA). Se requieren dos pasos:

- Síntesis de la primera cadena de ADN complementario (ADNc ó cDNA). En este proceso que dura dos horas y que se realiza a una temperatura de 42°C se utiliza *10x first-strand buffer* (suministrado por el fabricante en el MessageAmpII-Biotin Enhanced™ Kit, Applied Biosystems, USA), también se utilizan nucleótidos (dNTPs), inhibidores de las RNasas y la enzima retro-transcriptasa.
- Síntesis de la segunda cadena utilizando *10x second-strand buffer* (provisto en el MessageAmpII-Biotin Enhanced Kit™, Applied Biosystems, USA), dNTPs, y las enzimas ADN polimerasa y ribonucleasa H. Estos reactivos para la síntesis de la segunda cadena de cDNA se mezclan con los del primer paso procediéndose, a continuación, a incubar durante 2h a 16°C.

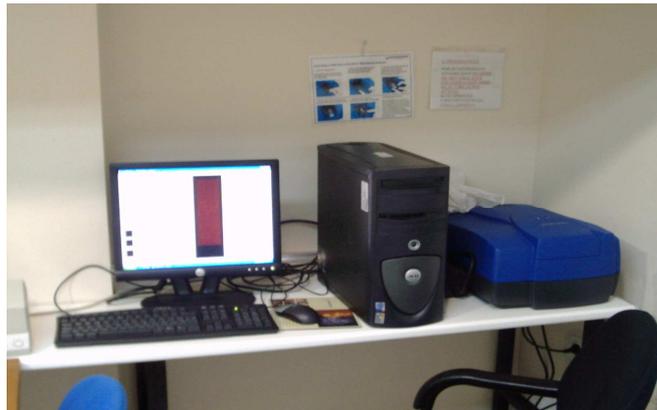
Una vez sintetizado el cDNA, éste es purificado mediante columnas de sílica-gel incluídas en el MessageAmp II Biotin Enhanced™ PCR purification Kit (Ambion, Holanda) y concentrado mediante precipitación. A continuación, se realiza la síntesis del cRNA mediante transcripción *in vitro* (IVT) y marcaje con ¹¹UTP biotina, dejando incubar la reacción durante 14 horas a 37°C. Posteriormente, se purifica y eluye el cRNA marcado con biotina utilizando el kit comercial MessageAmpII-Biotin Enhanced™ PCR purification Kit (Ambion, Holanda), así como se comprueba su concentración, pureza y calidad. La A₂₆₀ debe ser de 0,15 para continuar con el proceso. El paso siguiente consiste en fragmentar el cRNA a 94°C durante 20 min e hibridar las muestras en los cristales de los microarrays que contienen el genoma completo humano (CodeLink®, Applied Microarrays, Tempe, Az, USA) durante 18-24 h a 37°C,

transcurridas las cuales se procede a realizar diversos lavados y a efectuar la detección con un conjugado de Cy5-Streptavidina.

Posteriormente tras una incubación de 30 minutos, sucesivos lavados para eliminar uniones inespecíficas y una vez secados los cristales mediante centrifugación, se procede a su escaneo y análisis de la información obtenida utilizando un equipo GenePix 4000B Array Scanner™ (Axon Instruments) instalado en el laboratorio de la Unidad Investigación Cirugía Experimental.

La figura 13 muestra el escáner utilizado.

FIGURA 13: Escáner GenePix4000B y equipo de análisis de microarrays utilizado en la presente Tesis Doctoral



IV.4.1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA POR MICROARRAYS

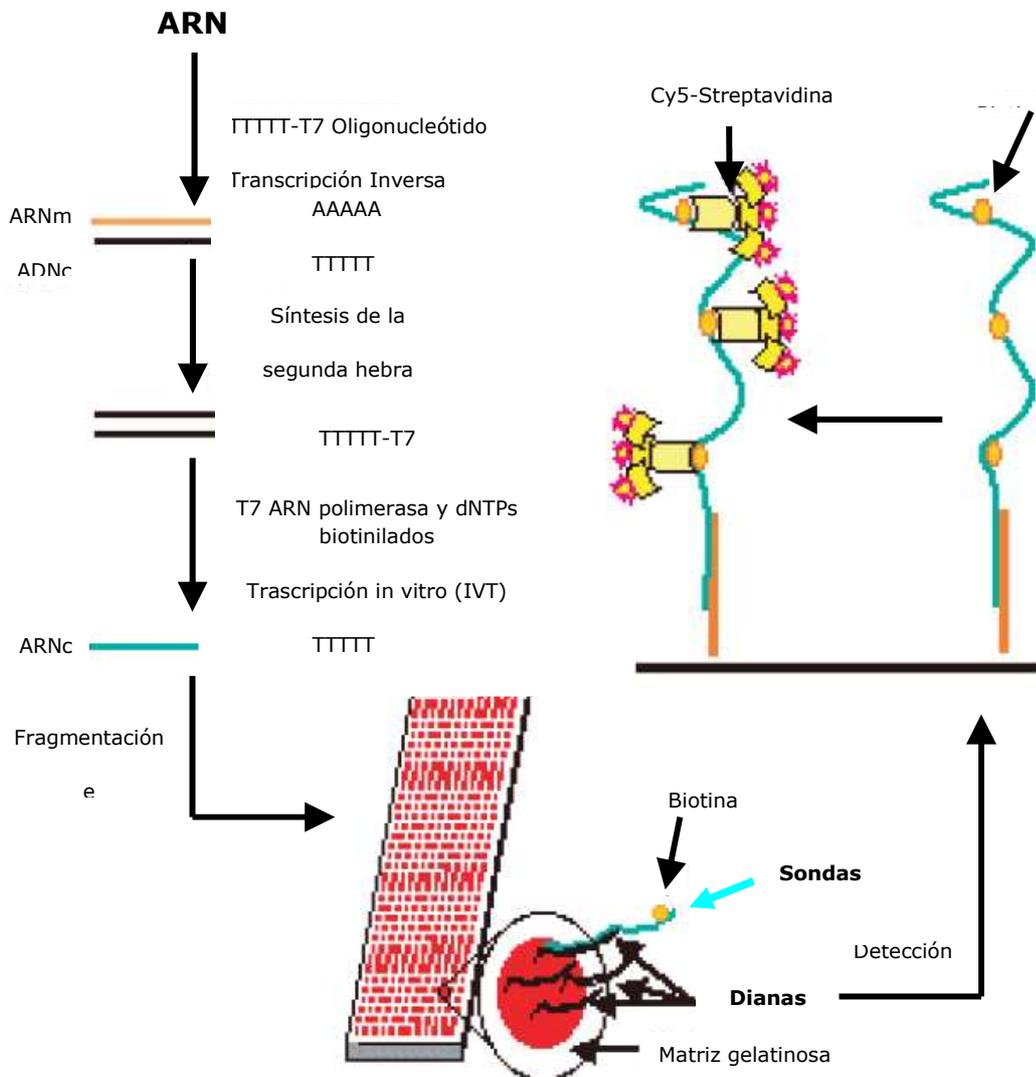
El diseño de cada microarray-bioarray de CodeLink® consiste en una superficie cristalina recubierta por una matriz tridimensional de un gel acuoso. El cristal es sometido a un fotoacoplamiento de un prepolímero hidrofílico de acrilamida que proporciona una superficie de unión, gracias a la presencia en su interior de un éster activado. Este polímero está covalentemente unido así mismo y a la superficie de cristal y proporciona el sitio de unión para los C6-aminooligonucleótidos que son depositados sobre el polímero por robots

dispensadores piezoeléctricos. Esta matriz va a proporcionar un ambiente acuoso que permite a la diana de oligonucleótidos estar separada del soporte cristalino y así maximizar la interacción con la sonda marcada procedente de la muestra. El tipo de ácido nucleico inmovilizado sobre el soporte es un oligómero de 30 bases presintetizado y fabricado mediante el método de deposición. La figura 14 muestra los microarrays del sistema CodeLink utilizados en el estudio que constituye la presente Tesis Doctoral. En la figura 15 se representa de forma esquemática el proceso de hibridación de los microarrays CodeLink.

FIGURA 14: Microarrays del sistema CodeLink[®] (Applied Microarrays Temple, AZ, USA)



FIGURA 15: Esquema general del proceso de extracción del ARN, marcaje, hibridación en el microarray y posterior escaneo de los cristales (portaobjetos).



IV.4.2. HIBRIDACIÓN EN LOS MICROARRAYS

Para una correcta hibridación del array, y aunque se ha mencionado de modo resumido previamente, el ARNc se debe fragmentar hasta unos tamaños aproximados de 100 a 200 pb. Para ello, se parte de una cantidad de 10µg del ARNc purificado que se mezclan con 5µL del tampón de fragmentación incubándose durante 20 minutos a 94° C. Durante la incubación se prepara la

mezcla de reactivos para la posterior reacción de hibridación: 78 μ L del componente A del tampón de hibridación y 130 μ L del componente B.

La solución de hibridación y el ARNc fragmentado se llevan a un volumen final de 260 μ L con agua libre de ribonucleasas, incubándose posteriormente durante 5 minutos a 90 °C para su desnaturalización. A continuación, se cargan 250 μ L de la mezcla de hibridación en el array. Una vez cargado el array se sellan los puertos de la cámara de hibridación con tiras de sellado de 1cm y se introduce sobre un soporte en el agitador orbital Innova[®] 4080 (New Brunswick, NJ, USA). La hibridación en el agitador orbital dura 18 horas y se realiza a una velocidad de 300 rpm y 37 °C.

La figura 16 muestra el agitador orbital y la centrífuga para microarrays utilizados en la presente Tesis Doctoral.

FIGURA 16: Agitador orbital Innova[®] 4080 y centrífuga Sigma para microarrays utilizados en la presente Tesis Doctoral.



IV.4.3. POST-HIBRIDACIÓN DEL ARRAY

Una vez concluida la fase de hibridación, el array se retira del agitador y se separa de cada array la cámara de hibridación. El cristal del array se lava

con tampón TNT 0,75X (0,1M Tris-HCl a pH 6, 0,15 M de NaCl y 0,05% de Tween® 20) a temperatura ambiente y después se incuba a 46 °C durante 1 hora en tampón 0,75x TNT precalentado a igual temperatura durante al menos 16 horas.

La detección de la señal se realiza empleando una dilución 1:500 de streptavidina (Cy5-Streptavidin) en tampón TNB (0,1 M Tris-HCl a pH 6, 0,15 M de NaCl y 0,5% de reactivo de bloqueo (NEN Blocking reagent, Perkin-Elmer). En esta solución cada array se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de marcaje se elimina lavando cada array cuatro veces durante cinco minutos en tampón 1xTNT. Finalmente, se realiza un lavado con 0,1X SSC/0.05 % Tween® (Bio-Rad, Richmond, VI, USA) durante 30 segundos, secándose cada array por centrifugación a 2000 rpm durante 3 minutos. Llegado este punto el array está preparado para ser escaneado.

La lectura de cada array se realiza con el escáner GenePix 4000B (Axon Instruments) mediante un láser a 635 nm, un voltaje de tubo fotomúltiple (PMT) de 600 V y una resolución de 10µm. El escáner utiliza el CodeLink® Expression Scanning Software (Applied Microarrays, Tempe, Az, USA) y las imágenes de cada cristal se analizan posteriormente con el CodeLink® Expression Analysis Software v5.0 (Applied Microarrays, Tempe, Az, USA).

IV.5. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN DE MICROARRAYS

IV.5.1. NORMALIZACIÓN

Antes de poder utilizar los datos experimentales es necesario normalizar los datos para intentar ajustar los efectos que son debidos a las variaciones en la tecnología y no en la biología. En particular, normalizando los datos se pretende ajustar las diferencias existentes entre los fluorocromos, en el marcaje, intensidad, etc.

El software fue implementado en el lenguaje de programación R y ha sido diseñado para análisis de datos de microarrays de plataformas General Electric (Codelink®). El software comprende la normalización y control de calidad de los arrays, así como el análisis estadístico para la identificación de genes con un comportamiento diferente entre los grupos de muestras. Los métodos de normalización implementados incluyeron la normalización de Mediana y corrección del ruido de fondo o *background* con aplicación del método LOESS (regresión polinómica ponderada).

El estudio del control de la normalización y la calidad de los arrays se llevó a cabo mediante la generación de diversas gráficas que mostraban la homogeneidad entre las intensidades de los *arrays* antes y después del proceso de normalización, como se presenta en las figuras 17 y 18.

FIGURA 17: Gráfica MA para 8 arrays del estudio realizado. M y A se definen como: $M = \log_2(I_1) - \log_2(I_2)$ $A = 1/2 (\log_2(I_1) + \log_2(I_2))$ donde I_1 es la intensidad de un array particular e I_2 es la intensidad promedio de todos los arrays. La distribución de puntos en las gráficas MA se concentró alrededor del eje $M=0$, no existiendo sesgos en la media de M

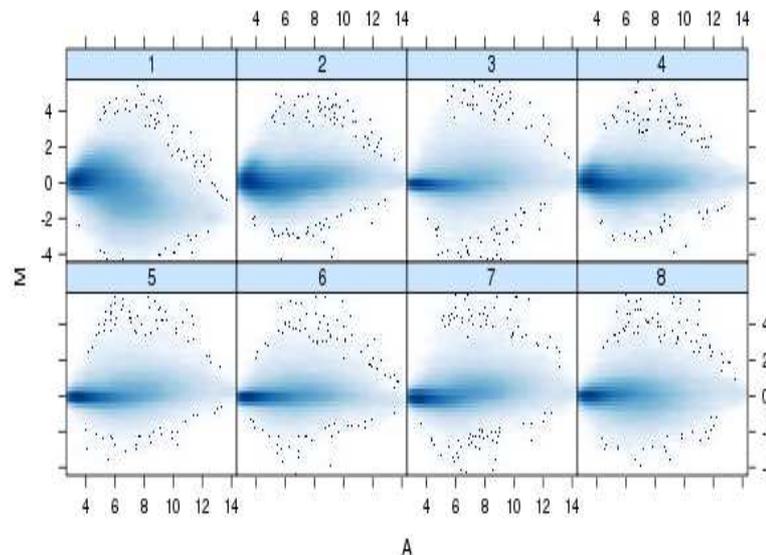
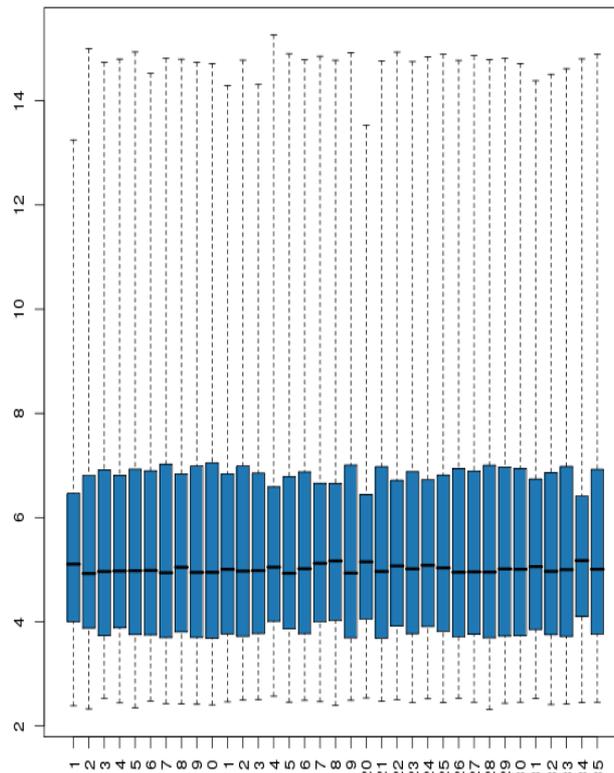


FIGURA 18: Diagramas de cajas del \log_2 (Intensidades). Cada caja se corresponde con un array. Se puede comprobar que tras la normalización, los arrays son homogéneos ya que las cajas son de amplitud similar y están centradas en posiciones cercanas de el eje Y.



IV.5.2. Análisis de Significación de Microarrays (SAM)

Se utilizó la técnica SAM (Significance Analysis of Microarrays) (196) para identificar genes que varían su comportamiento de forma significativa entre un conjunto de experimentos con microarrays. Una matriz de expresión X_{pn} con p filas y n columnas, es una matriz numérica en la que se dispone un gen por cada fila, el resultado de un experimento de microarrays por cada columna, de forma que la posición (i, j) de la matriz contendrá el nivel de expresión del gen i bajo la muestra experimental j . SAM toma como entrada una matriz de expresión y el valor de un parámetro delta (D) fijado por el

usuario, para discriminar entre genes que cambian su expresión de forma significativa y no significativa. El parámetro D se fija de forma empírica, en función del número de genes significativos que se deseen extraer y del grado de significación estadística que se exige, en nuestro caso será de $p < 0,05$. En definitiva, para obtener una tasa de falsos descubrimientos “false discovery rate” ($fdr < 0,05$).

Una vez obtenidos los genes significativamente expresados, se calculan sus respectivos niveles de sobre/subexpresión con respecto al microarray con el que se compara, para ello se calcula el logaritmo del cociente de cada gen entre el valor de su expresión en un paciente y el valor de su expresión en el microarray de referencia (194).

Existen distintos tipos de experimentos para los que se puede aplicar esta técnica. El caso que interesa para el estudio realizado en la presente Tesis Doctoral es el denominado “two class unpaired”: dos conjuntos de experimentos (denominados C_1 y C_2) con unidades experimentales diferentes, por ejemplo, C_1 puede corresponderse con distintos pacientes que sufren una dolencia determinada y C_2 a pacientes sanos.

Descripción del funcionamiento de SAM

Sean los niveles de expresión x_{ij} con $i = 1, 2, \dots, p$ genes y $j = 1, 2, \dots, n$ experimentos diferenciados en dos clases: C_1 y C_2 .

El funcionamiento de SAM es el siguiente (como se puede ver en la figura 19):

1.- Para cada gen i calcular el estadístico d_i que mide la diferencia de expresión relativa para el gen i entre los dos grupos de pacientes C_1 y C_2 [1]:

$$d_i = \frac{r_i}{s_i + s_0}$$

2.- Ordenar los genes en base a su estadístico. Así se produce la lista $d_{(1)} < d_{(2)} < d_{(3)} < \dots < d_{(p)}$, donde $d_{(1)}$ es el valor mínimo y así sucesivamente.

3.- Realizar B permutaciones de los experimentos.

4.- Para cada permutación b , se calculan los estadísticos d_i^b y se ordenan obteniendo la lista $d_{(1)}^b < d_{(2)}^b < d_{(3)}^b < \dots < d_{(p)}^b$.

5.- A partir de los estadísticos calculados para cada una de las B permutaciones, se estiman los valores de los estadísticos originales (los calculados con la clasificación correcta de las columnas). Esta estimación se lleva a cabo haciendo la media de los valores de la primera posición de las listas obtenidas en el punto 4 ($\bar{d}_{(1)}$), de la segunda posición ($\bar{d}_{(2)}$), etc. Es decir, se calcula:

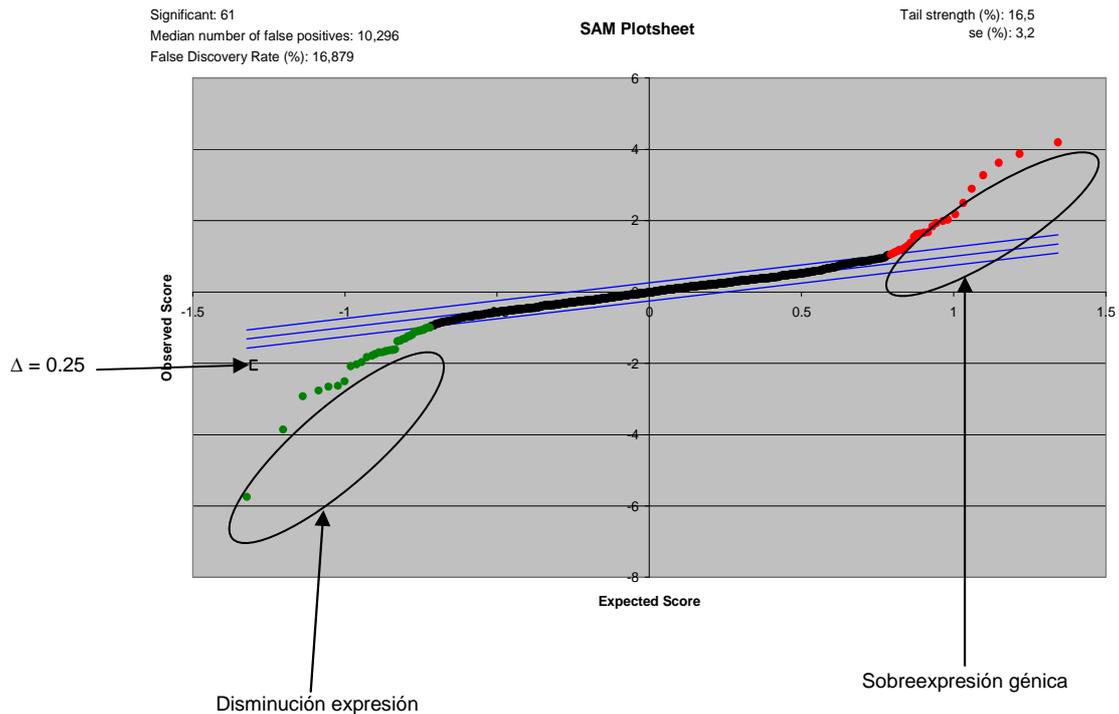
$$\bar{d}_{(i)} = \left(\frac{1}{B}\right) \times \sum_{b=1}^B d_{(i)}^b, \text{ para } i = 1, 2, \dots, p$$

6.- Se representan gráficamente los valores de los $\bar{d}_{(i)}$ frente a los $d_{(i)}$ (Ver figura a continuación). Una vez fijado el valor de Δ , se recorre la gráfica partiendo desde el (0,0) hacia la derecha hasta encontrar un $i1$ tal que $\bar{d}_{(i1)} - d_{(i1)} > \Delta$. A todos los genes que quedan más allá del $i1$ se les llama *significativos positivos*. Estos serán los genes que han aumentando su expresión significativamente en las muestras de la clase C_2 respecto a las de la clase C_1 .

A su vez, se recorre también la gráfica hacia la izquierda partiendo del (0,0) hasta encontrar un $i2$ tal que $\bar{d}_{(i2)} - d_{(i2)} > \Delta$. Todos los genes que quedan más a la izquierda de $i2$ son *significativos negativos*. Estos serán los genes que han disminuido su expresión significativamente en las muestras de la clase C_2 respecto a las de la clase C_1 .

7.- Cálculo del “q-value” para cada gen. El “q-value” de un gen es el equivalente al bien conocido *p-value*, con el añadido de que está corregido para tests con múltiples hipótesis (194).

FIGURA 19: Ejemplo gráfico del análisis de significación de los microarrays (SAM).



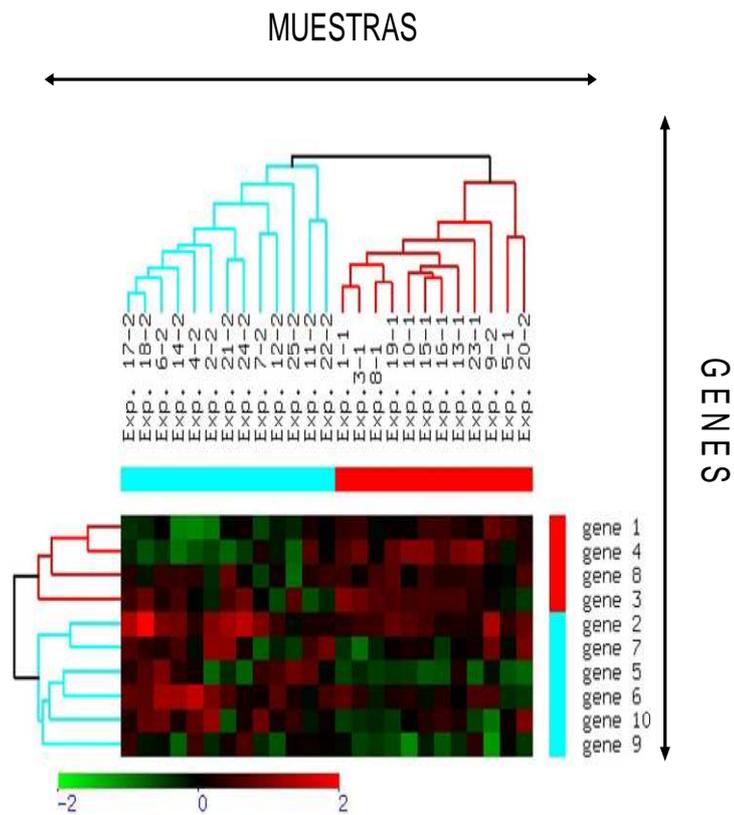
IV.4.3. AGRUPAMIENTO (“CLUSTERING”)

La información recogida de los microarrays puede ser analizada mediante un algoritmo de agrupación (“clustering”) jerárquica, que genera dendrogramas, agrupando los elementos según su similitud. En el dendrograma, la longitud de las ramas es una representación de la distancia entre los distintos partes del mismo.

En la figura 20 se puede observar un dendrograma en el cual los genes se sitúan en vertical y las muestras en la parte superior en horizontal. Los genes sobre-expresados van a aparecer en color rojo y los reprimidos en color verde (según la opción seleccionada). Este análisis permite definir el patrón de

agrupamiento de las muestras tumorales, según el perfil de expresión de los genes. Para la agrupación de las muestras en base a los perfiles de expresión se ha utilizado el programa de clustering jerárquico desarrollado por el Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial de la Universidad de Granada.

FIGURA 20: Dendograma correspondiente a la agrupación jerárquica de los patrones de expresión de los genes, situados en vertical, en las muestras, dispuestas en la parte superior.



IV.6. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS MICROARRAYS: qRT-PCR

Los estudios a gran escala de expresión génica mediante microarrays requieren de la validación de los resultados obtenidos. Se ha realizado la comprobación de aquellos genes cuya expresión diferencial ha mostrado resultados significativos, utilizando la técnica de PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). Se han utilizado sondas comerciales diseñadas con el software Solaris (Dharmacon, Chicago, IL USA) en un equipo MX3005P (Stratagene, Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA).

La figura 21 muestra el equipo Mx3005P para realización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizado en la presente Tesis Doctoral

FIGURA 21: Equipo para qRT-PCR Mx3005P utilizado en al presente Tesis Doctoral.



La RT-PCR (retrotranscriptasa (RT)-reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) es una PCR convencional que amplifica un ADN complementario (ADNc) obtenido por transcripción inversa de un ARNm, y que permite detectar la expresión de un gen particular. Otras técnicas, usadas también para detectar la expresión de genes, como el *Northern blot*, no llegan a tener la sensibilidad de la RT-PCR. Así, esta técnica es usada ampliamente para caracterizar los patrones de expresión de los ARN mensajeros. En la RT-PCR se copia primero el ARN en ADNc, usando una transcriptasa inversa (RTasa), y después se le somete a PCR que amplifica el ADNc exponencialmente.

Reacción de retrotranscripción (RT)

Se han utilizado las siguientes condiciones (protocolo de AffinityScript[®] QPCR cDNA Synthesis Kit, Agilent Technologies, Ca, USA) para obtener ADNc de las muestras que fueron analizadas posteriormente mediante RT-PCR cuantitativa:

1. Se prepara la síntesis de la primera hebra de ADNc en un tubo de microcentrifugado añadiendo los siguientes componentes en este orden:

RNAsa libre en 20µL de H₂O.

10µL de la primera hebra master-mix.

3µL de oligo(dT)primer.

1µL de AffinityScript RT/RNasa Block enzyme mixture.

1 µg de ARN (0,3pg-3µg).

2. Incubación a 25° C durante 5 minutos.

3. Incubación a 42° C durante 15 minutos para permitir la síntesis del ADNc.

4. A continuación se incuba a 95°C durante 5 minutos para terminar la reacción de síntesis del ADNc.

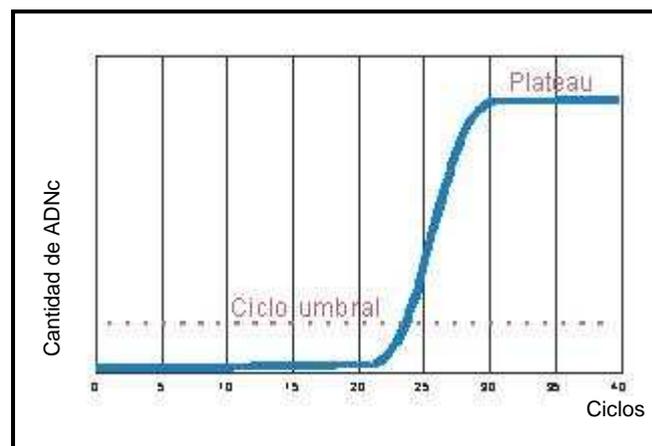
5. Para finalizar la síntesis de la primera cadena de ADNc se pone en hielo para usar inmediatamente la PCR cuantitativa.

6. Se comprueba la calidad del ADNc y se determina su concentración utilizando el equipo Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

PCR a tiempo real o PCR cuantitativa

La PCR a tiempo real es una técnica precisa y potente para cuantificar la cantidad de molde (ADNc) que se ha usado en una reacción de PCR (195). Las reacciones de PCR siguen una cinética, la cual se presenta en la figura 22.

FIGURA 22: Cinética de las reacciones de PCR.

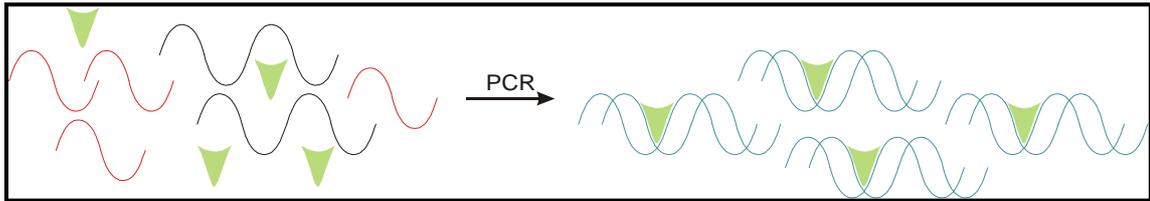


La PCR convencional analiza la cantidad de DNA presente en la muestra en el punto final de la reacción (plateau). En este momento, la cantidad de producto dependerá de la cantidad de reactivos (cebadores, dNTPs, actividad de la polimerasa) presentes en la muestra inicial pero no depende ya de la cantidad de molde inicial puesto que, la PCR es, por naturaleza, un proceso exponencial. Así, el único punto de la reacción en que la cantidad de molde determina el desarrollo de la PCR es el punto de inicio de la amplificación exponencial. Una reacción en la que haya más molde producirá más pronto (en un ciclo más temprano) la cantidad de DNA necesaria para ser detectada.

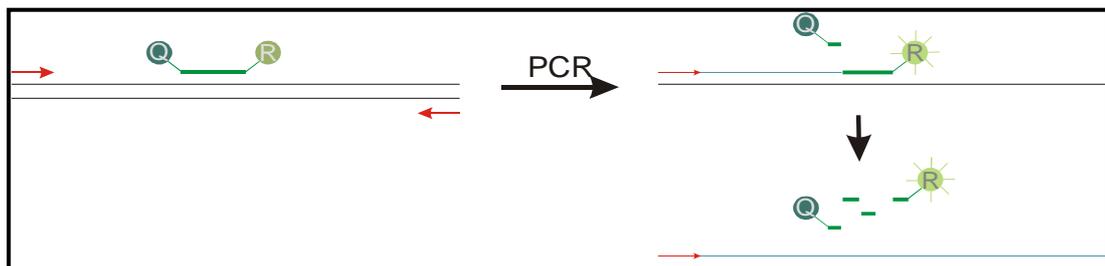
La PCR cuantitativa aprovecha el fenómeno de la fluorescencia para medir la cantidad de producto a tiempo real. El momento (ciclo) en el que una muestra empieza a ser detectada se denomina ciclo umbral o Ct, y es proporcional a la cantidad de molde de partida. El termociclador que se utiliza está acoplado a un láser y un detector, que registran el aumento de fluorescencia en el tubo.

Los dos tipos de reactivos fluorescentes más extendidos son:

-Agentes intercalantes: son moléculas fluorescentes que se introducen en la doble hélice de DNA con alta afinidad pero tienen una afinidad menor por las cadenas simples:



-Sondas tipo TaqMan[®]: en este caso el reactivo fluorescente es la sonda, un oligonucleótido cuya secuencia se encuentra entre la de los cebadores. Esta molécula tiene dos fluoróforos anclados, uno en cada extremo. El primero de ellos es fluorescente y el segundo es un “apagador” (quencher)” de la fluorescencia. Cuando la PCR progresa, el quencher y el fluoróforo se separan y éste comienza a emitir fluorescencia:



De los dos sistemas de fluoróforos descritos, el más sensible es el sistema de sondas Taqman[®] ya que, al controlar cuándo empieza a emitir fluorescencia da un fondo menor. La principal diferencia es que las sondas Taqman[®] sólo se unen al gen que se quiere amplificar, permitiendo un

amplificado específico. El otro método es inespecífico y se podría estar cuantificando bandas inespecíficas. Los fluoróforos más extendidos son FAM y VIC y como *quencher* se suele usar TAMRA. En el caso de la presente Tesis se han utilizado sondas Taqman[®].

La síntesis de ADNc o retro-transcripción es un paso crítico puesto que, se requiere que sea un proceso lineal (para que sea reflejo de la cantidad de RNA de partida, que había en la muestra a estudiar) y de una eficiencia adecuada y reproducible. Cuantificar la cantidad de ADNc, que se pone en el experimento, es difícil por lo que, se suele emplear un control con el fin de normalizar la medida obtenida por la cantidad de ADNc de partida. Es lo que se llama control endógeno. El control endógeno es un gen cuya expresión se mide en paralelo con el gen problema, del que se conoce que tiene una expresión constante en las muestras de interés a analizar. No existe ningún gen conocido que se exprese de manera constante en todos los tejidos. Debido a su importancia, la determinación de este control endógeno requiere experimentos específicos para ello y ha de hacerse para cada tejido. En el caso del estudio realizado en la presente Tesis Doctoral, tras diferentes pruebas se seleccionó el gen gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), como gen constitutivamente expresado para el control endógeno (*“housekeeping gene”*).

Además en este tipo de estudios conviene medir cada ADNc al menos por duplicado para comprobar la reproducibilidad y evitar resultados que llevarían a valoraciones erróneas intra-experimento. Con el fin de evidenciar problemas de inhibición, que veces por la composición del tampón de RT, una muestra más concentrada amplifica más tarde que una más diluida, se miden dos diluciones diferentes del mismo ADNc, cada una por triplicado. Si además se quieren descartar artefactos debidos a la reacción de RT, se deben medir ADNcs procedentes de síntesis diferentes.

Para cada muestra a estudiar en la presente Tesis Doctoral se preparó la siguiente mezcla indicada en la tabla 7.

TABLA 7: Preparación de la mezcla de reacción del protocolo PCR.

Master Mix (Solaris qPCR)	12,5µL
Solaris primer	1,25µL
ADNc	1µg
H ₂ O libre de RNAsas	Cantidad suficiente (Variable)
Volumen final	25µL

Las condiciones de la RT-PCR cuantitativa fueron: 15 minutos y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, con una elongación terminal a 60°C durante 1 minuto.

En la tabla 8 se presentan los genes a validar mediante qRT-PCR en la presente Tesis Doctoral y obtenidos tras realizar los microarrays, de las muestras de sangre periférica.

TABLA 8: Genes analizados mediante esta técnica RT-PCR cuantitativa.

Gene name	CodeLink ID
CAPG	NM_001747.2
CIR	NM_004882.3
FALZ	U05237.1
NUPL2	AW237453.1
PRDM2	BF514317.1
ZFP36	NM_003407.1

Una vez conocidos los genes a validar mediante qRT-PCR se realiza la secuencia de los “primers” o cebadores y sondas. Todos los “primers” deben confirmar que no presentan homología con otros genes conocidos, para lo cual se utiliza la herramienta BLAST Sequence Similarity Search tool (NCBI). La tabla 9 muestra las secuencias de los “primers” o cebadores realizados para la validación de los genes de interés mediante qRT-PCR.

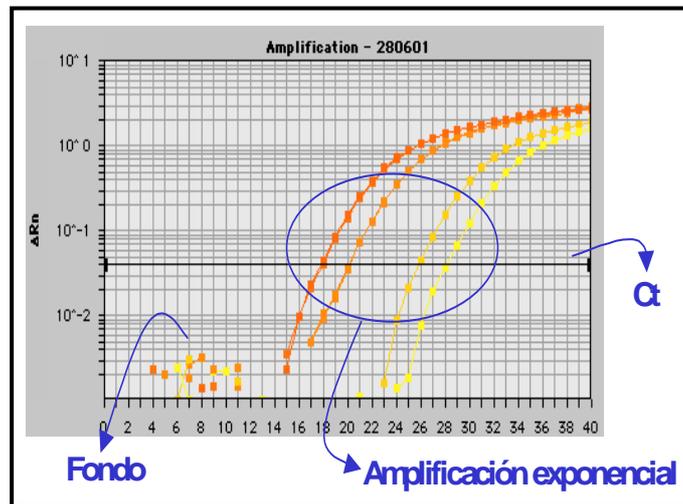
TABLA 9: Secuencia de los primers o cebadores y sondas. Todos los “primers” confirmaron no presentar homología con otros genes conocidos utilizando la herramienta BLAST Sequence Similarity Search tool (NCBI).

Gene Name	Tipo	Secuencia
CAPG	Sonda	TCAAGTACCAGGAAGGT
	Primer Forward	CAATGAGTCTGACCTCTTC
	Primer Reverse	GTGAAATGCTGACTCCACACCA
CIR	Sonda	GTCTTTCTGGAATCAATG
	Primer Forward	CAGAGATCAGCCCTTTGGTA
	Primer Reverse	GTGGGAACCGAACTTGCATT
FALZ	Sonda	ATAGTACCTACAGCAGC
	Primer Forward	GACGACGATGACTCCGATT
	Primer Reverse	TTTTCGCCTACCTGGAGTG
NUPL2	Sonda	AGCAATAACTTACAGAG
	Primer Forward	GGTTTTACAGACATTTACCAG
	Primer Reverse	CGTTGGACAGAATTTAGATAACTC
PRDM2	Sonda	AACCCTGAGATAGCAGCT

	Primer Forward	CTCCTGGTCTGGTACAATG
	Primer Reverse	TCGCTCTTCCTCAATCGCA
ZFP36	Sonda	CCGTGCCATCCGACCAT
	Primer Forward	TGCCATCTACGAGAGCCT
	Primer Reverse	GGACTCAGTCCCTCCAT

Como resultado del experimento de qRT-PCR se obtiene una medida de fluorescencia, que se traduce en medida de cantidad. Para eso se utiliza una curva estándar, realizada con cantidades conocidas de ADNc molde. Como la curva se mantendrá igual en los distintos experimentos, permitirá además evaluar la reproducibilidad entre experimentos. La curva estándar se compone de 5 puntos obtenidos de 5 diluciones seriadas (1, 1/10, 1/50, 1/100 y 1/500) de ADNc procedente de un ARN humano universal (Referencia Human Universal (Stratagene, Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) que está compuesto de ARN de 10 líneas celulares. La curva estándar elegida debe tener varios puntos entre los que deben amplificar todas las muestras puesto que, es el único rango en el que se puede asegurar que la amplificación es lineal. Al final del experimento, los resultados que el programa Mx3005P (Agilent Tech, Ca, USA) ofrece generan un gráfico representado en la figura 23. En este gráfico se representa el incremento de fluorescencia en función del ciclo de amplificación. Sobre este gráfico, se fija el Ct de manera que corte todas las líneas de amplificación de todas las muestras en la parte exponencial de la curva, por encima de la señal del fondo. Así se establece el punto en el cual el programa procesará cada amplificación para calcular la cantidad de molde.

FIGURA 23: Gráfico de los resultados de la RT-PCR cuantitativa. En la línea horizontal están representados los ciclos de amplificación y en la vertical la intensidad de la señal.



Con estos datos, el programa del equipo Mx3005 P genera un fichero de informe (“Experimental Report”) en el que se registra cada muestra, qué tipo de muestra es, los valores de expresión fijados para la curva estándar y el valor de expresión calculado para cada muestra problema. Este fichero puede ser almacenado y procesado posteriormente en Excel, donde han de hacerse las normalizaciones. Así, para calcular el valor de expresión real de cada muestra, la expresión del gen problema hay que dividirla entre la expresión del control endógeno.

Para el análisis estadístico de los valores de expresión obtenidos tras realizar qRT-PCR se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0 con la aplicación de la prueba T para muestras independientes.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

V.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

Los pacientes del estudio que constituyen la presente Tesis Doctoral proceden del área sanitaria Granada-Norte de la que es referencia el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada..

Desde el punto de vista clínico el estudio se desarrolla en el marco del PROCESO ASISTENCIAL INTEGRADO “CÁNCER COLORRECTAL” propuesto por el Sistema Sanitario Público de Andalucía y con aplicación/desarrollo en el Hospital Universitario Virgen de la Nieves de Granada.

Se han incluido 35 pacientes, de los cuales 8 fueron excluidos (pacientes nº5, 26, 29, 30, 32) al apreciarse clara discordancia entre la respuesta tumoral observada aplicando la clasificación de Mandard (TRG) y el concepto de *downstaging*. El paciente nº7 se excluyó por presentar metástasis hepáticas diagnosticadas en la intervención. Finalmente, los pacientes nº20 y nº23 se excluyeron por contaminación en el momento de la toma de muestra. De los 27 restantes, y siguiendo los criterios de Mandard (169): 11 fueron considerados Respondedores (40,74%) y 16 No Respondedores (59,26%), como se recoge en la tabla 10.

TABLA 10: Distribución de los pacientes por grupos de estudio.

<i>Pacientes respondedores</i> <i>N=11</i>	<i>Pacientes no respondedores</i> <i>N=16</i>
Paciente 1	Paciente 3
Paciente 2	Paciente 4
Paciente 6	Paciente 7
Paciente 8	Paciente 12
Paciente 9	Paciente 14
Paciente 11	Paciente 15
Paciente 13	Paciente 16
Paciente 17	Paciente 18
Paciente 24	Paciente 19
Paciente 31	Paciente 21
Paciente 35	Paciente 22
	Paciente 25
	Paciente 27
	Paciente 28
	Paciente 33
	Paciente 34

V.1.1.SEXO Y EDAD

La población de estudio válida quedó constituida por 21 varones (77,78%) y 6 mujeres (22,22%).

La edad media de la población del estudio que constituye la presente Tesis Doctoral fue de 59,53 años, con una desviación típica de 12,25, un valor mínimo de 36 y un valor máximo de 83 años.

V.1.2.PRESENTACIÓN CLÍNICA

El síntoma y motivo de consulta más frecuente en la población de estudio fue la rectorragia que se presentó en el 70% de los casos seguido de las alteraciones en el hábito intestinal (diarrea y estreñimiento) en el 58% de los casos.

V.1.3.FÓRMULA LEUCOCITARIA

Puesto que la realización de los microarrays se efectuó a partir del ARN obtenido de muestra de sangre periférica (células nucleadas), se presenta a continuación la fórmula leucocitaria de estos pacientes en la tabla 11.

TABLA 11: Fórmula leucocitaria de los pacientes del estudio.

Serie blanca	Media	Mediana	Desviación típica	Máximo	Mínimo
Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	5,9930	5,6000	2,41899	12,20	1,30
Linfocitos (%)	23,2451	21,6000	9,47105	47,00	5,60
Granulocitos (%)	67,3338	76,500	9,67438	88,40	45,40
Monocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,5521	0,5000	0,30466	1,70	0

V.1.4.VALORES DE LA SERIE ROJA:

La serie roja de los pacientes incluidos en el estudio se presenta en la Tabla 12.

TABLA 12: Serie roja en los pacientes del estudio. MCV corresponde al volumen corpuscular medio, y MCH corresponde a la hemoglobina corpuscular media.

Serie roja	Media	Mediana	Desviación típica	Máximo	Mínimo
Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$)	4,2568	4,3700	0,82527	5,65	1,67
Hemoglobina (g/dL)	13,2070	13,6000	2,53582	19,70	5,00
Hematocrito (%)	38,0521	39,6000	6,76527	54,50	14,80
MCV	89,9521	90,3000	6,49050	102,70	73,90
MCH (pg)	31,1775	31,9000	2,90621	35,80	23,80
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	220,295	227,0000	81,81537	553,000	7,000

V.1.5.DETERMINACIÓN GENERAL DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS:

A todos los pacientes participantes en el estudio se les realizó una determinación de los siguientes parámetros bioquímicos cuyos resultados se muestran en la Tabla 13.

TABLA 13: Principales determinaciones de valores analíticos a los pacientes incluidos en el estudio.

PARÁMETROS SÉRICOS	MEDIA	MEDIANA	DESV. TÍPICA	MÁX.	MÍN
Creatinina (mg/dL)	0,6761	0,6500	0,1941	1,26	0,22
Urea (mg/dL)	30,3291	27,4100	12,2885	76,71	7,34
GOT/AST (U/L)	23,6679	22,9500	8,2626	53,271	10,08
GPT/ALT (U/L)	20,2392	17,1250	13,6375	103,76	7,80
GGT (U/L)	33,7458	23,5900	31,5156	188,74	3,91
Colesterol total (mg/dL)	199,596	197,9750	33,4577	284,38	112,8

Proteínas totales (g/dL)	6,2276	6,3900	0,9904	8,28	4,60
Triglicéridos (mg/dL)	195,600	165,3800	100,2028	591,55	64,41
Bilirrubina total (mg/dL)	0,6997	0,5600	0,6152	4,33	0,15
Bilirrubina directa (mg/dL)	0,1565	0,1300	0,1152	0,72	0,01
LDH (U/L)	367,329	330,9150	131,9790	905,03	180,1
CK (U/L)	70,1364	59,00	35,6249	177,00	14,00
Amilasa (U/L)	53,3355	52,2000	25,3322	188,83	12,13
Lipasa (U/L)	31,3211	23,8550	34,5213	281,44	8,44
Hierro (mg/dL)	8,8323	4,7400	8,7923	37,18	1,09
Cl	98,9545	99,0000	3,7104	107,00	89,00
K	3,8302	3,6354	2,1198	4,21	3,11
Na	137,636	139,0543	7,0528	150,00	114,0
GOT/AST (Glutamato Oxalacetato Transaminasa/ Aspartato aminotransferasa) GPT/ALT (Glutamato Piruvato Transaminasa/Alanina aminotransferasa) GGT (Gamma-glutamil-transferasa) LDH (Láctico deshidrogenasa) CK (Creatin kinasa) Cl (cloro) K (potasio) Na (sodio)					

V.2. TIPIFICACIÓN Y ESTADIFICACIÓN PREQUIRÚRGICA

Para la valoración preoperatoria de la enfermedad local, estadificación del T y del N, se realizaron ECO-endoanal (uTNM) y RMN pélvica (cTNM). La estadificación preoperatoria fue la siguiente:

- T3N0: 14 pacientes; T3N1: 5 pacientes; T3N2: 4 pacientes.
- T4N0: 3 pacientes; T4N1: 1 paciente.

Para completar el proceso de estadificación se realizó un estudio 18F-FDG-PET/TAC con la finalidad de descartar la existencia de enfermedad metastásica a distancia.

V.3. TERAPIA NEOADYUVANTE

El tratamiento neoadyuvante empleado consta de:

V.3.1. TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO

Todos los pacientes de la población de estudio recibieron tratamiento quimioterápico de forma preoperatoria. En 13 pacientes (48,15%) el tratamiento de quimioterapia se basó en la administración de Capecitabina y Oxaliplatino (Xelox®, Roche), 14 pacientes (51,85%) recibieron únicamente Capecitabina (Xeloda®, Roche) como se presenta en la Tabla 14.

V.3.2. TRATAMIENTO RADIOTERÁPICO

Todos los pacientes de la población de estudio recibieron radioterapia externa con intención radical: 50,4Gy a 1,8Gy por fracción (un total de 28 días de tratamiento), sobre la lesión tumoral y mesorrecto incluyendo las adenopatías locorregionales, de forma preoperatoria.

V.4. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Por término medio la intervención quirúrgica se efectuó a los 63 días con una mediana de 56 días (desviación típica de 1,82 con mínimo de 49 y máximo de 98 días respectivamente). A todos los pacientes de la población de estudio se les realizó el tratamiento quirúrgico acorde a lo expuesto en el capítulo de Pacientes y Métodos (resección radical aplicando el concepto de escisión mesorrectal completa).

Resección anterior baja a 21 pacientes (77,78%), en 7 de ellos no se reconstruyó el tránsito, dejando una colostomía terminal (Hartmann); y

realizamos una amputación abdominoperineal en los restantes 6 pacientes (22,22%). La Tabla 14 recoge los datos mencionados.

V.5. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA A LA NEOADYUVANCIA

Se contemplan dos tipos de respuesta: una respuesta histológica, basada en el análisis anatómo-patológico de la pieza quirúrgica, según la modificación en la estadificación TNM (ypTNM) y según el grado de regresión tumoral (TRG) cuyos resultados se exponen en la Tabla 14.

En base a la respuesta histológica a la neoadyuvancia los pacientes participantes en el estudio se distribuyeron en 2 grupos:

- 1) Respondedores: 11 pacientes (40,74%) de los cuales 5 fueron TRG1 y TRG2 fueron 6.
- 2) No respondedores: 16 pacientes (59,26%) de los cuales, 2 fueron TRG3, 8 pacientes fueron TRG4 y 6 fueron TRG5.

Hubo respuesta patológica completa (RPC) en 5 pacientes (18,52%).

TABLA 14: Características generales de los 27 pacientes incluidos en el estudio.

Pac N°	QT	cTN	Cirugía	TRG	DOWNST	DOWNST	Resp	CPR
1	Capox	T4N1	LAR	2	1	1	Si	No
2	Cap	T3N0	LAR	2	1	1	Si	No
3	Cap	T3N1	LAR	4	1	0	No	No
4	Cap	T3N0	LAR	5	0	0	No	No
5	Cap	T3N0	APR	2	1	1	Si	No
6	Capox	T4N0	APR	2	1	1	No	No

7	Capox	T3N1	LAR	1	1	1	Si	Si
8	Capox	T3N2	HART	2	0	0	Si	No
9	Capox	T3N2	HART	2	0	1	Si	No
10	Cap	T3N0	HART	3	1	1	No	No
11	Cap	T3N0	LAR	1	1	1	Si	Si
12	Cap	T3N0	APR	4	1	1	No	No
13	Cap	T3N0	LAR	5	1	1	No	No
14	Cap	T3N1	HART	5	1	0	No	No
15	Cap	T3N0	LAR	1	1	1	Si	Si
16	Capox	T4N0	APR	4	0	0	No	No
17	Capox	T4N0	HART	5	0	0	No	No
18	Capox	T3N0	LAR	4	0	0	No	No
19	Capox	T3N0	APR	5	0	0	No	No
20	Capox	T3N1	HART	1	1	1	Si	Si
21	Cap	T3N0	HART	4	1	1	No	No
22	Cap	T3N1	LAR	4	0	1	No	No
23	Capox	T3N2	LAR	5	0	0	No	No
24	Cap	T3N0	LAR	1	1	1	Si	Si
25	Capox	T3N2	APR	3	0	0	No	No
26	Cap	T3N2	LAR	3	1	0	No	No
27	Capox	T3N1	LAR	2	1	1	Si	No

QT (Quimioterapia): Cap (Capecitabina (Xeloda®, Roche)), Capox (Capecitabina y Oxaliplatino (Xelox®, Roche))

cTN (Estadificación TNM)

Cirugía: LAR (Resección anterior baja), APR (Amputación abdominoperineal), HART (Hartmann)

TRG (Grados de regresión tumoral según Mandard (155); 1,2,3,4,5)

DOWNST: término anglosajón de Downstaging definido como cualquier reducción del estadio tumoral ypTNM frente al estadio clínico antes de la radioquimioterapia (cTNM). 1(si), 0(no)

DOWNS: término anglosajón de Downsizing cualquier reducción de la ypT frente al estadio clínico pretratamiento (cT) evidenciado bien por ecografía endorrectal o por resonancia pélvica 1(si), 0(no)

Resp (Respondedores). Si, No

CPR (Respuesta Patológica Completa) Si, No

V.6. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE EXPRESION GENICA MEDIANTE MICROARRAYS EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Para obtener los perfiles de expresión de las muestras sanguíneas de pacientes con adenocarcinoma de recto, 27 ARNs obtenidos de los pacientes participantes en el estudio fueron hibridados por duplicado en los *microarrays* de genoma completo humano de la plataforma CodeLink® (Applied Microarrays, AZ, USA), tras ser sometidos a los procedimientos de extracción, marcaje e hibridación explicados anteriormente en el apartado de Pacientes y Métodos.

A modo de resumen, se recuerda que, para el estudio del perfil de expresión génica de los pacientes con adenocarcinoma de recto mediante microarrays, se obtuvieron muestras de sangre periférica antes de la intervención quirúrgica (T0) de cada uno de los pacientes participantes en el estudio, procesándose y analizándose tal como se ha descrito en el apartado correspondiente del capítulo Pacientes y Métodos. Una vez realizada la hibridación correspondiente y obtenidos los resultados de fluorescencia, tal y como se ha descrito previamente en el apartado correspondiente de Pacientes y Métodos, se procedió a realizar la técnica de “Análisis de Significación de Microarrays” (SAM por sus siglas en inglés).

Así, una vez leídos los microarrays utilizando el escáner de lectura GenePix 4000B (Axon Instruments, USA) se obtuvieron los datos globales (“raw”) de los distintos microarrays (tanto de pacientes respondedores como de pacientes no-respondedores, todos ellos realizados por duplicado). Posteriormente, se utilizó la normalización proporcionada por el software CodeLink Expression Analysis v5.0 (Applied Microarrays, Tempe, AZ USA) consistente en centrar en el valor 1 la mediana de la expresión de cada microarray, para lo cual se divide la expresión de cada gen por el valor de la mediana en el microarray en cuestión.

Puesto que la finalidad de esta técnica es el descubrimiento de la sobre-expresión de genes en pacientes afectados de cáncer de recto que responden a tratamiento con respecto a los pacientes que no-responden, para ello se procedió al cálculo de los genes que se encuentran significativamente expresados en el experimento, utilizando SAM y ajustando el valor “delta” para obtener una “tasa de falsos positivos” ó “*false discovery rate*” (FDR) acorde con la precisión buscada en la realización del ensayo.

Una vez se obtienen los genes significativamente expresados se procede al cálculo de los niveles de sobre-expresión, es decir que estén “n” veces (“*folds*”) sobre-expresados en los pacientes respondedores con respecto a los no-respondedores. Para ello se calcula el logaritmo del cociente de cada gen entre el valor de su expresión en el paciente respondedor y el valor de su expresión en el paciente no-respondedor.

Con el objetivo de identificar aquellos genes que mejor diferenciaban los pacientes no respondedores de los respondedores, realizamos un t-test ajustado para el análisis múltiple. Se identificaron un total de 8 genes representados en la Tabla 15, y cuya expresión es distinta y significativa ($p_{ajustada} < 0,05$) entre las dos clases establecidas (Respondedores y No Respondedores). Entre estos 8 genes, se observan genes implicados en diversas funciones biológicas, tales como orientación celular, transcripción, transporte de proteínas desde el núcleo, apoptosis y antiangiogénesis.

TABLA 15: Genes identificados en el estudio sobre-expresados en pacientes Respondedores. Se presenta la referencia correspondiente a la secuencia de cada gen recogida en la base de datos del Centro Nacional para la Información sobre Biotecnología de Estados Unidos de América (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

Gene name	CodeLink ID
BC035656.1	BC035656.1
CIR	NM_004882.3
PRDM2	BF514317.1
CAPG	NM_001747.2
FALZ	U05237.1
NUPL2	AW237453.1
ZFP36	NM_003407.1
HLA-DPB2	CD655061.1

V.6.1. DESCRIPCIÓN DE LOS GENES SOBRE-EXPRESADOS EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFERICA DE LOS PACIENTES PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

***BC035656.1**, es un gen cuya secuencia aún no está definida, por lo cual se ha descartado de momento seguir considerándolo para el estudio.

***CIR**, es un gen corepresor que interactúa con RBPJ, indicando su participación en la ruta de señalización Notch. La referencia para su secuencia en la base de datos del Centro Nacional para la Información sobre Biotecnología de Estados Unidos de América (National Center for Biotechnology Information, NCBI) es NM_004882.3.

***PRDM2**, este gen tiene como sinónimo RIZ1, presenta cuatro transcritos cuyas referencias del NCBI para sus secuencias son: NM_001007257.2 NM_001135610.1 NM_012231.4 NM_015866.4.

***CAPG**, gen cuya referencia para su secuencia dada por el NCBI es: NM_001747.2.

***FALZ**, cuyo sinónimo es BPTF (de Bromodomain Phdfinger Transcription Factor) presenta dos transcritos alternativos cuyas referencias en NCBI para las secuencias son: NM_004459.6 NM_182641.3.

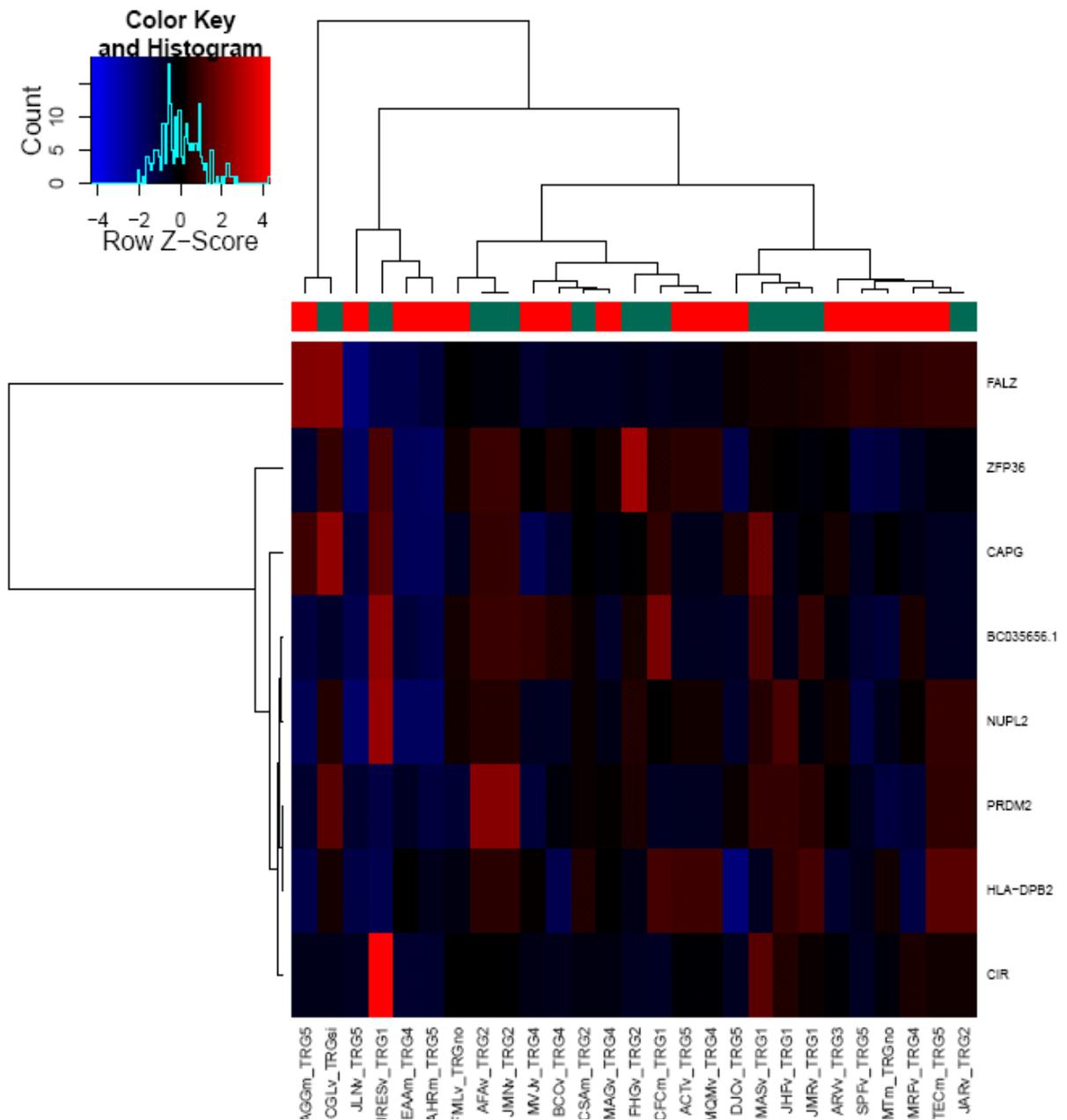
***NUPL2**, este gen está definido como “nucleoprotein like 2” sus sinónimos habituales son NUPL2 CG1, hCG1, NLP-1 y NLP_1. Su referencia en NCBI para su secuencia es NM_007342.2.

***ZFP36**, es un gen conocido como TTP, cuya referencia en NCBI para su secuencia es: NM_003407.2.

***HLA-DPB2**, cuyos sinónimos son DP2B; DPB2; DPbeta2; HLA-DP2B. Es un gen similar al antígeno de histocompatibilidad HLA de clase II. Su secuencia en NCBI viene dada por la referencia AK301188.1. Dada la complejidad de este gen, de momento no se ha incluido en el estudio.

Como cabría esperar, el dendrograma o *clustering* con estos 8 genes representado en la figura 24, permite distinguir los distintos tipos de muestras analizados, siendo lo más significativo que la mayoría de los pacientes Respondedores se agrupan juntos y claramente diferenciados de los No Respondedores. Los Respondedores se estructuran, casi en su totalidad (a excepción del caso que se coloca próximo a los No Respondedores), bajo una misma rama del dendrograma de la cual parten un cuantioso número de ramificaciones, que reflejan la heterogeneidad genética de este subgrupo.

FIGURA 24. *Clustering* que muestra las 27 muestras tumorales. Los genes sobre-expresados aparecen en color rojo, mientras que los reprimidos aparecen en azul



Es destacable que estos genes presentan niveles de expresión mayores en las muestras de los pacientes Respondedores a tratamiento neoadyuvante. No obstante, el cálculo de las veces (*“fold”*) que se encuentran sobre-expresados estos 8 genes en los pacientes respondedores con respecto a los no-respondedores no presentó grandes variaciones. Los *fold* oscilaron entre 1,47 de BC035656.1 y 0,72 de HLA-DPB2. Este cálculo se presenta de forma detallada en la Tabla 16.

TABLA 16: Genes sobre-expresados en pacientes respondedores con su *fold* correspondiente.

Nombre del gen	Número de veces (<i>fold</i>)
BC035656.1	1,4689245235
CIR	1,3411484949
PRDM2	1,2390657017
CAPG	1,2360478894
FALZ	1,1420434214
NUPL2	0,8239296640
ZFP36	0,7866265846
HLA-DPB2	0,7252555136

A continuación se expone de forma detallada la expresión de estos 8 genes en cada uno de los pacientes pertenecientes a los dos grupos de estudio (Respondedores y No Respondedores a tratamiento neoadyuvante).

Grupo 1: PACIENTES RESPONDEDORES

PACIENTE 1

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	16,6133352801
CIR	23,9482536825
PRDM2	4,1087276431
CAPG	13,1106909168
FALZ	55,7890625696
NUPL2	37,5417648356
ZFP36	1,4796613686
HLA-DPB2	2,2708433366

PACIENTE 2

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	30,8915039968
CIR	26,6931759314
PRDM2	3,7451745589
CAPG	32,2119507099
FALZ	40,7339832329
NUPL2	67,9626008269
ZFP36	2,3681153632
HLA-DPB2	6,1519382600

PACIENTE 6

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	17,2099589589
CIR	14,5370515226
PRDM2	3,0803319792
CAPG	21,0225412051
FALZ	42,9580697315
NUPL2	43,5843824813
ZFP36	1,1501402335
HLA-DPB2	4,2550445495

PACIENTE 8

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	30,8915039968
CIR	26,6931759314
PRDM2	3,7451745589
CAPG	32,2119507099
FALZ	40,7339832329
NUPL2	67,9626008269
ZFP36	2,3681153632
HLA-DPB2	6,1519382600

PACIENTE 9

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	19,1290316282
CIR	24,3442091741
PRDM2	4,5901497585
CAPG	14,6747252380
FALZ	60,2257657709
NUPL2	41,3096851761
ZFP36	1,5643643219
HLA-DPB2	2,4981822108

PACIENTE 11

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	24,2598545665
CIR	12,4656767322
PRDM2	3,6360985537
CAPG	19,3057819462
FALZ	33,6749046799
NUPL2	113,3981177300
ZFP36	1,3134240416
HLA-DPB2	4,5612252449

PACIENTE 13

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	26,0219634169
CIR	13,5298820121
PRDM2	2,5767977766
CAPG	18,5765583971
FALZ	65,8909924794
NUPL2	36,9257474994
ZFP36	1,4598578393
HLA-DPB2	5,8930614943

PACIENTE 17

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	20,9023621185
CIR	8,1464064663
PRDM2	2,7916756694
CAPG	31,1023273924
FALZ	76,7567900335
NUPL2	56,7334691891
ZFP36	0,6313913342
HLA-DPB2	8,8341018191

PACIENTE 24

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	28,4347193668
CIR	24,1618313415
PRDM2	3,7465053842
CAPG	43,3133016508
FALZ	63,1801584081
NUPL2	46,7156389752
ZFP36	1,5337487178
HLA-DPB2	6,8978026265

PACIENTE 31

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	26,4447862978
CIR	25,1352156047
PRDM2	6,2825051308
CAPG	39,9240754565
FALZ	113,8016305570
NUPL2	74,0843085128
ZFP36	0,2864443259
HLA-DPB2	9,6817890014

PACIENTE 35

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	27,4397570816
CIR	16,0369720039
PRDM2	3,6712759898
CAPG	51,6194790451
FALZ	87,7865459931
NUPL2	65,3793118619
ZFP36	1,9263824238
HLA-DPB2	1,7449135997

Grupo 2: PACIENTES NO RESPONDEDORES

PACIENTE 3

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	11,7910026178
CIR	15,5887934018
PRDM2	3,2864568942
CAPG	13,2973019164
FALZ	42,3329843372
NUPL2	60,9833726751
ZFP36	0,6503147719
HLA-DPB2	2,2819182291

PACIENTE 4

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	11,7910026178
CIR	15,5887934018
PRDM2	3,2864568942
CAPG	13,2973019164
FALZ	42,3329843372
NUPL2	60,9833726751
ZFP36	0,6503147719
HLA-DPB2	2,2819182291

PACIENTE 7

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	16,6133352801
CIR	23,9482536825
PRDM2	4,1087276431
CAPG	13,1106909168
FALZ	55,7890625696
NUPL2	37,5417648356
ZFP36	1,4796613686
HLA-DPB2	2,2708433366

PACIENTE 12

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	31,9797437349
CIR	12,1096346254
PRDM2	3,2141707248
CAPG	24,9876826026
FALZ	58,0435602404
NUPL2	43,2357157255
ZFP36	0,9580910855
HLA-DPB2	3,0895177244

PACIENTE 14

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	20,5416344502
CIR	9,6860298960
PRDM2	2,9814760048
CAPG	15,3544793542
FALZ	70,5151916012
NUPL2	28,2347925042
ZFP36	0,4526753563
HLA-DPB2	4,9280163242

PACIENTE 15

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	12,1240672727
CIR	5,6781231927
PRDM2	1,8061001511
CAPG	27,2678803697
FALZ	33,9649901220
NUPL2	10,4392405376
ZFP36	1,1460734253
HLA-DPB2	1,9869112527

PACIENTE 16

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	3,8850204078
CIR	8,5130637143
PRDM2	0,9111499424
CAPG	33,4132465336
FALZ	34,5306070153
NUPL2	20,6809973818
ZFP36	0,4934874855
HLA-DPB2	0,8276271203

PACIENTE 18

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	14,9704805385
CIR	8,6815019999
PRDM2	1,8914457666
CAPG	9,6994459460
FALZ	20,7993119312
NUPL2	53,5974993114
ZFP36	0,8732477042
HLA-DPB2	4,9940748355

PACIENTE 19

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	7,4691843214
CIR	5,0298005928
PRDM2	1,1858089736
CAPG	12,3760373065
FALZ	40,3679384869
NUPL2	11,2040409013
ZFP36	0,6760096076
HLA-DPB2	1,5392223272

PACIENTE 21

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	6,8684188641
CIR	10,7735269001
PRDM2	2,0089063889
CAPG	1,7471626983
FALZ	31,2043351857
NUPL2	40,2756651802
ZFP36	0,3856816365
HLA-DPB2	5,9532971818

PACIENTE 22

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	0,859122519
CIR	2,589869429
PRDM2	0,354303035
CAPG	6,543108911
FALZ	0,977583306
NUPL2	0,961832611
ZFP36	0,515056348
HLA-DPB2	0,262747152

PACIENTE 25

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	19,1501883615
CIR	17,2272841525
PRDM2	2,3394349763
CAPG	17,4456681331
FALZ	38,3293083321
NUPL2	50,3225840608
ZFP36	1,0729146226
HLA-DPB2	1,7092265073

PACIENTE 27

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	1,0023456454
CIR	1,1284187180
PRDM2	0,5676397507
CAPG	0,6507374165
FALZ	9,0339320218
NUPL2	2,3567444372
ZFP36	0,6033932021
HLA-DPB2	1,0858934470

PACIENTE 28

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	0,8202231719
CIR	0,7903421003
PRDM2	0,6108768940
CAPG	0,8416180968
FALZ	4,0295864751
NUPL2	1,4393603423
ZFP36	0,3616386335
HLA-DPB2	0,5250176927

PACIENTE 33

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	30,7051344090
CIR	15,9563803278
PRDM2	3,2908080117
CAPG	12,5534618743
FALZ	42,2162753702
NUPL2	50,6683130592
ZFP36	0,4870395245
HLA-DPB2	4,5817390857

PACIENTE 34

GEN	EXPRESIÓN
BC035656.1	3,9662787255
CIR	9,2190240089
PRDM2	2,2224004218
CAPG	19,9569221660
FALZ	20,9656748671
NUPL2	13,6954085979
ZFP36	0,3610573627
HLA-DPB2	1,0671769812

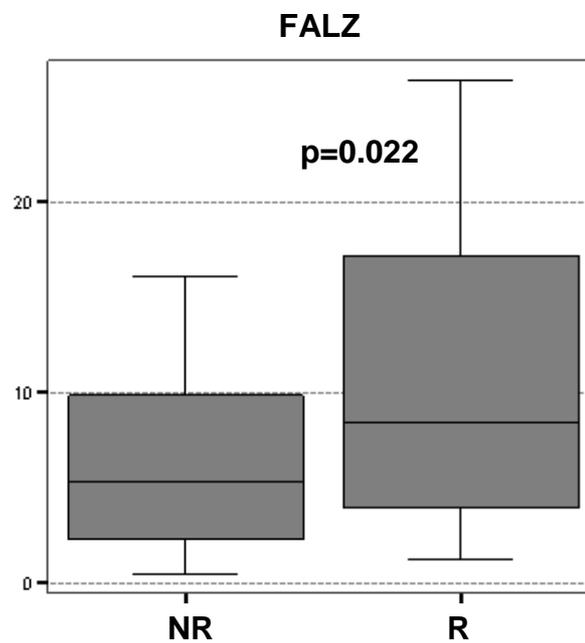
V.7. VALIDACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS GENES SOBRE-EXPRESADOS MEDIANTE qRT-PCR

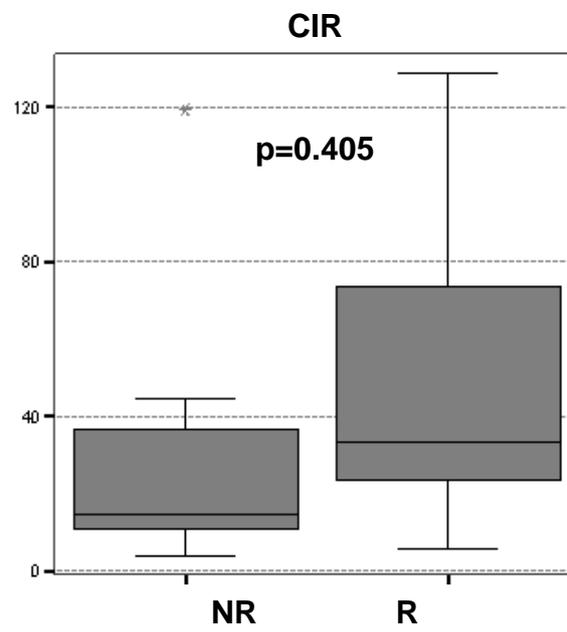
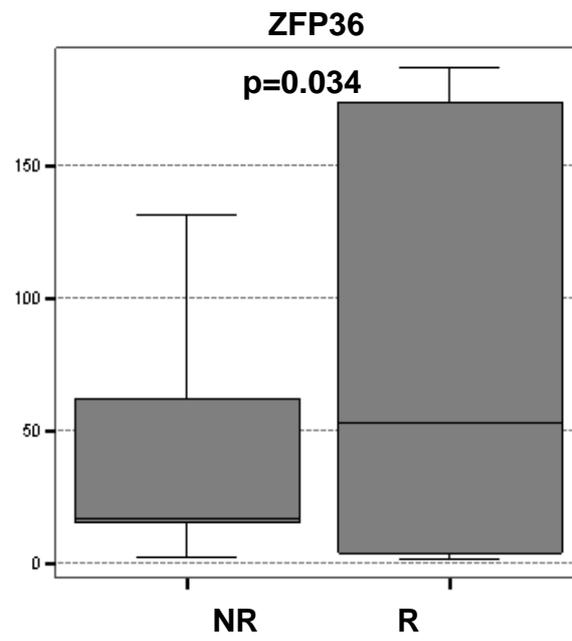
Una vez identificados los genes cuya expresión diferenciaba pacientes Respondedores de los No Respondedores, se procedió a realizar su validación mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

Los resultados obtenidos fueron concordantes con los de expresión y confirmaron una expresión diferencial entre los dos subtipos de muestras. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba T para muestras independientes proporcionada por el programa estadístico SPSS.v15.0. Los datos proporcionados por la técnica de qRT-PCR muestran un incremento de los niveles de expresión de los genes analizados concordante con el análisis de expresión obtenido de los microarrays. Se obtienen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes FALZ (BPTF) ($p=0,022$) y ZFP36 ($p=0,034$) al encontrarse sobre-expresados al efectuar comparación entre los subgrupos de respondedores y no respondedores a tratamiento neoadyuvante. Los genes CAPG ($p=0.090$), CIR ($p=0.405$), NUPL2 ($p=0.094$), and PRDM2 ($p=0.063$) tuvieron mayor expresión en el grupo de pacientes respondedores aunque no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

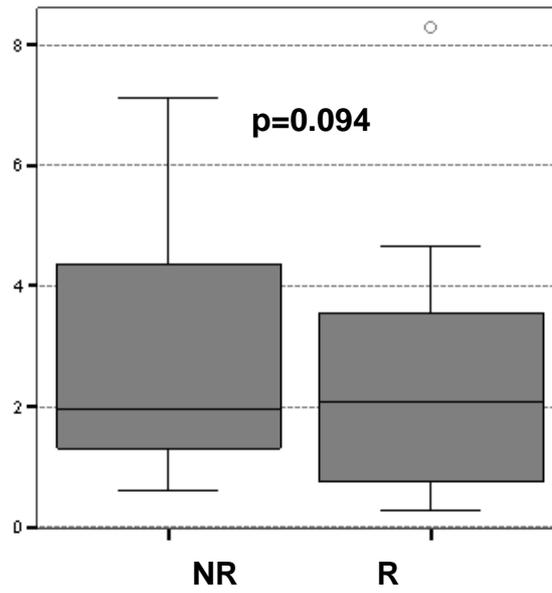
Los resultados de realizar el análisis estadístico de los datos proporcionados por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) se presentan en la figura 25.

FIGURA 25: Análisis de los genes sobre-expresados diferencialmente entre el grupo de pacientes respondedores (R) y los no respondedores (NR) mediante qRT-PCR. Los rectángulos de color gris representan los valores de expresión de los percentiles 25 y 75 para cada uno de los grupos de pacientes, las líneas horizontales representan los valores máximos y mínimos, y la mediana de los datos. Los valores atípicos aparecen con el símbolo (^o) y los valores extremos con el símbolo asterisco (*).

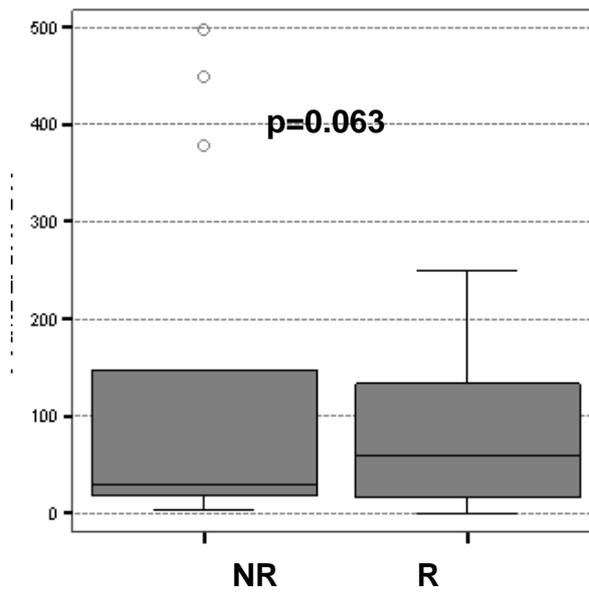


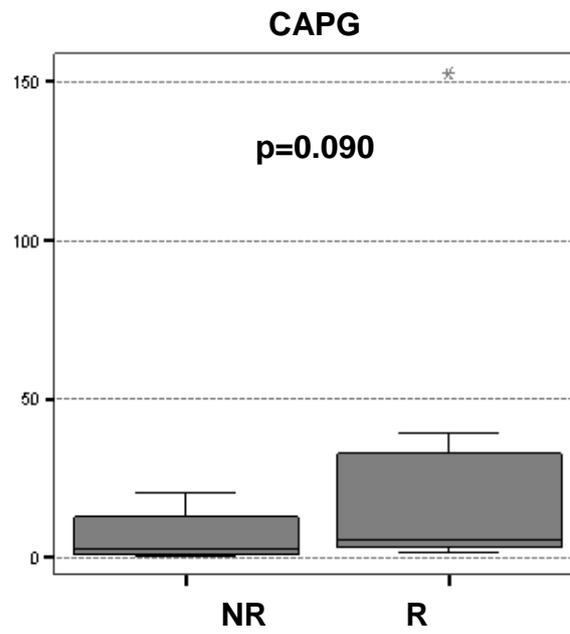


NUPL2



PRDM2





DISCUSIÓN

VI.DISCUSIÓN

VI.1. CANCER DE RECTO Y TRATAMIENTO ACTUAL

El cáncer de localización colorrectal (CCR) representa la segunda causa de muerte oncológica en los países occidentales después del cáncer de pulmón en los hombres y el de mama en las mujeres. La incidencia del cáncer rectal tanto en Europa como en EEUU es de 50 a 75 casos por 100.000 habitantes año, lo que supone un grave problema tanto desde el punto de vista sanitario como socioeconómico (1).

El tratamiento actual de esta patología combina la cirugía (con excisión total del mesorecto) con tratamientos neoadyuvantes (radioterapia para reducir la masa tumoral y quimioterapia para conseguir mayor efecto local de la radioterapia). Además, se ha demostrado la superioridad en términos de recidivas locales del tratamiento radioquimioterápico preoperatorio (neoadyuvante) frente al tratamiento postoperatorio (adyuvante). De esta manera, se aconseja un tratamiento neoadyuvante en los tumores rectales localmente avanzados (137, 140).

Las técnicas de imagen convencional, eco-endorrectal, TC (Tomografía Computarizada) y RM (Resonancia Magnética), si bien se han confirmado como pruebas indispensables en la estadificación de estos pacientes, no han demostrado predecir de forma fiable la respuesta clínica al tratamiento neoadyuvante (141-144). La exploración combinando la 18F-FDG-PET con la TC parece ser de ayuda en la detección de aquellos enfermos que muestran respuesta durante el tratamiento, sin poder ser lo suficientemente específica y sensible para detectar a aquellos pacientes con remisiones completas y por tanto tener una aplicación clínica en la actualidad (161).

La respuesta tumoral a estos protocolos de radio-quimioterapia preoperatoria está siendo objeto de intenso estudio, lo cual justifica nuestro trabajo, ya que en ello radica la importancia de intentar identificar aquellos sujetos que serán sensibles a esta terapia y, por tanto, intentar tratar a estos enfermos de forma más individualizada (196), lo que supone en definitiva un mejor coste-efectividad para los servicios sanitarios.

VI.1.1. ESTADIFICACIÓN CLÍNICA

En la estadificación clínica de los pacientes incluidos en la serie que constituye la presente Tesis Doctoral, se ha utilizado el actual sistema de clasificación por estadios (TNM) del American Joint Committee on Cancer (AJCC) y Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) (70). Estos criterios de alguna manera están consensuados por la mayoría de los grupos de trabajo, no sólo con fines de investigación sino en la práctica clínica diaria. Las técnicas para la estadificación de la enfermedad local más utilizadas son la ecografía endoanal y la RM. Nuestra población en estudio fue sometida a ambas pruebas, salvo imposibilidad técnica de las mismas (peso o claustrofobia del paciente en la RM, y tumores estenosantes en la ecografía). Si bien, en la mayoría de la bibliografía existente sobre validez diagnóstica de ambas pruebas, se afirma la superioridad de la eco-endoanal, siempre en manos de un operador experimentado, sobretodo en la valoración del T de tumores precoces (T1-2), siendo la resonancia siempre superior al poder objetivar el margen circunferencial (fascia mesorrectal) en las neoplasias localmente avanzadas (73,74).

Para la valoración de enfermedad a distancia (M) se contemplan tanto el empleo de la TC como la ecografía; dada la disponibilidad de un equipo PET/TC en nuestro centro hospitalario, y tras ser aprobado en la comisión de seguimiento del proceso asistencial integrado para cáncer colorrectal, la mayoría de los pacientes no fueron sometidos ni a ecografía abdominal ni a TC abdominal o torácico complementario para el “despistaje” de enfermedad

metastásica. Detalle sumamente importante al estar excluidos de nuestro estudio todos los estadios metastásicos (estadio UICC IV).

La tipificación y estadificación tumoral primaria no ha mostrado diferencias relevantes respecto a la mayoría de las series consultadas. Concretamente la forma histológica más frecuente en nuestra serie fue el adenocarcinoma moderadamente diferenciado. Del mismo modo esta semejanza se ha apreciado en lo referente a la ubicación anatómica de la lesión, tamaño y distancia al margen anal.

En definitiva, consideramos que nuestra población de estudio no difiere significativamente de la descrita en trabajos similares al nuestro, lo que facilita cualquier comparación que se desee establecer. Este hecho no nos sorprende en base a lo estricto de los criterios de inclusión de dichos pacientes, que a su vez se desarrollan en una situación clínica muy precisa y relativamente bien consensuada por la comunidad profesional afín.

VI.1.2. TRATAMIENTO NEOADYUVANTE

Si bien existe cierta variabilidad en el protocolo terapéutico neoadyuvante, en ocasiones ligado a las particularidades de cada centro, existe un claro consenso en el empleo concomitante de radioterapia (ciclo largo, y el tipo de fraccionamiento de la dosis) y quimioterapia (con inclusión de derivados del 5-fluoro-uracilo). En el presente trabajo se emplea con fines terapéuticos el protocolo propuesto por la EORTC (Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer) de aplicación consensuada en nuestro centro, basado en la administración de RT con intención radical (50,4 Gy a 1,8 Gy por fracción) durante 28 días y concomitancia con quimioterapia de sensibilización (140,197,198). Pese a contemplarse la posibilidad de un protocolo corto de RT (25 Gy en cinco días) en pacientes que presentan edad avanzada, mal estado general y sintomatología importante derivada de la tumoración rectal, ninguno de los pacientes incluidos en la población de estudio ha sido candidato a esta alternativa terapéutica.

En cuanto al tratamiento quimioterápico, sí se han producido modificaciones entre pacientes, dependientes de nuestra participación en un estudio de ámbito nacional. Así, 14 pacientes recibieron, además de capecitabina, oxaliplatino. Con independencia de la imposibilidad de realizar un análisis sistemático de estos pacientes, nuestra impresión general, como también la de la literatura, es que las ligeras variaciones producidas en el protocolo quimioterápico no han condicionado un impacto relevante sobre los resultados obtenidos. La razón fundamental radica en el hecho de ser la radioterapia el pilar fundamental del tratamiento, relegando a la quimioterapia a un simple sensibilizador de la célula tumoral (130).

VI.1.3. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

En el momento actual, la excisión completa del mesorrecto sigue siendo la piedra angular del tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado (134), además como se ha mencionado previamente, la radioterapia preoperatoria mejora aún más el control local de la enfermedad (135).

En todos los pacientes de nuestra serie se ha realizado excisión mesorrectal completa, siendo necesaria la amputación abdominoperineal en 6 de los 27 pacientes. Este porcentaje de amputaciones está perfectamente en concordancia con las guías médicas actuales. No contemplamos, sin embargo, realizar una resección con preservación de esfínteres en pacientes “a priori” propuestos para amputación que presentaran buena respuesta, con fibrosis o desaparición de la masa tumoral de forma macroscópica, dado que el estadiaje definitivo mediante el estudio anatomopatológico podría evidenciar un borde distal infiltrado de forma microscópica.

VI.1.4. CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Tal y como se expuso en la introducción de esta Tesis, existe cierta variabilidad en la bibliografía consultada en cuanto al procedimiento para la valoración de la respuesta al tratamiento neo-adyuvante. Lo que, sin embargo, muestra de forma fidedigna la respuesta al tratamiento es el análisis anatomopatológico.

Desde el punto de vista de la práctica clínica diaria, acaso el método más adecuado sea la modificación en la estadificación (ypTNM) inducida por el tratamiento, dado que es el lenguaje habitual con el que los clínicos se refieren al estadio clínico del paciente, con independencia de si éste es pre- o post-terapéutico. Como ya se ha comentado, la consideración exclusiva de la respuesta patológica mediante la respuesta completa frente a no respuesta completa, entendida la primera como la ausencia de células tumorales, adolece de ciertas limitaciones, principalmente, la dificultad para consensuar las distintas respuestas parciales y la falta de discriminación entre estratos titulares y ganglios afectados.

El empleo de la clasificación TRG (Grado de Regresión Tumoral) supone un esfuerzo adicional para la expresión consensuada de estos cambios en cada paciente individual. Pese a que la clasificación propuesta por Dworak, (170), pudiera considerarse más adecuada para la valoración de carcinoma rectal localmente avanzado, la mayoría de los grupos de trabajo, como en nuestro caso, se sigue empleando la de Mandard (169).

En la actualidad se discute la afectación o no del margen circunferencial como otro factor pronóstico de respuesta al tratamiento.

VI.2.TECNOLOGÍA APLICADA. UTILIDAD DE LOS MICROARRAYS

El desarrollo de un tumor es iniciado por una alteración genética en una célula y este cambio predispone a la célula para alteraciones futuras (205). Tras un número de alteraciones genéticas, un clon celular prolifera, adquiriendo una serie de ventajas frente al resto de células. En algunas ocasiones, el primer evento es una translocación cromosómica que sucede en una determinada célula. Las anomalías secundarias (mutaciones, amplificaciones, deleciones y/o translocaciones secundarias) ocurren posteriormente durante el desarrollo tumoral. Este acumulo de alteraciones genéticas modifica la composición de los transcritos en las células tumorales, de tal modo que cada clon posee un perfil de expresión característico que puede ser determinado mediante microarrays de expresión (199).

El cáncer es una enfermedad genética. Esta frase sencilla y simple tiene un alcance que ha sobrepasado cualquier tipo de aproximación científica desarrollada hasta hoy. La principal consecuencia de definir el cáncer como una enfermedad genética radica en prestar todo el protagonismo de investigación oncológica a herramientas de análisis genético (200).

La secuenciación completa del genoma humano (178, 201) ha supuesto un cambio trascendental en la manera de entender, investigar y abordar el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Se han diseñado experimentos a escala genómica para determinar todas las interacciones posibles del conjunto de genes del organismo humano, siendo el icono de estos estudios post-genómicos los sistemas denominados genéricamente como matrices, arrays, microarrays o biochips.

Los arrays están cambiando nuestra forma de plantear problemas y extraer conclusiones de los experimentos ya que, nos ofrecen una imagen compleja y completa del conjunto del genoma.

La tendencia actual va dirigida a utilizar los arrays de oligonucleótidos y dentro de estos más conocidos son los de Affimetrix (180). En esta Tesis se ha utilizado, sin embargo, la plataforma de Codelink por su disponibilidad en la Unidad de Investigación de Cirugía Experimental del HUVN de Granada. Estos arrays requieren la combinación de la fotolitografía y de la química combinatoria. Están constituidos por miles de oligonucleótidos sintetizados “in situ” sobre un chip o porta de silicio. El proceso de síntesis se lleva a cabo utilizando la luz ultravioleta y una máscara, que deja pasar la luz sólo por sitios específicos, para activar sólo los oligos que requieran su incorporación. Normalmente, se trabaja con arrays de oligos de 50 y 60 nucleótidos. Se suele emplear más de un oligo para cada gen, lo que facilita el control de la hibridación y la especificidad del oligo. También se incluyen oligos con una base cambiada para detectar posibles hibridaciones inespecíficas. En este tipo de arrays, sólo se hibrida la muestra problema en el array, evitándose errores en la incorporación de las sondas aunque existen los problemas relacionados con la eficiencia en la incorporación de la sonda.

El coste elevado de estas tecnologías, la necesidad de fluorómetros y de softwares especializados en el análisis de la información, la reproducibilidad de los datos, que no siempre es consistente, y las variaciones en el patrón de expresión observadas al repetir un mismo experimento son algunos de los inconvenientes de los arrays. A todo esto se añade el problema, común al de las distintas plataformas existentes, de la escasez de recursos bioinformáticos para el tratamiento y comprensión de los datos masivos.

Sin embargo, las ventajas de usar arrays son evidentes puesto que nos permiten identificar genes presentes en un número bajo de copias y medir simultáneamente la suma de todas las interacciones genéticas y evaluarlas al instante. Además, las técnicas de revelado por fluorescencia ofrecen una relación señal/ruido elevada incluso en casos de transcritos poco abundantes.

Por tanto, en lugar de examinar cambios fisiológicos gen a gen, se puede analizar un grupo completo de genes proporcionando una gran cantidad

de información, siendo el cáncer uno de los campos de mayor aplicabilidad de las micromatrices en diversas áreas, tales como la comprensión de las bases moleculares de la carcinogénesis (181,202), clasificación y pronóstico de los tumores (183, 203) y el seguimiento del desarrollo de metástasis (204).

Nos encontramos pues en la era de la medicina molecular; tecnologías como la proteómica o los microarrays han conducido a la identificación de firmas moleculares de valor predictivo o pronóstico para diversas enfermedades neoplásicas (205-208).

VI.3. GENÓMICA DE LA MEDICINA INDIVIDUALIZADA: MAMMAPRINT[®] Y COLOPRINT[®].

VI.3.1. MAMMAPRINT[®]

Las investigaciones en cáncer de mama van por delante de las del de recto, por tanto nos podemos fijar en su modelo para avanzar en la interpretación de nuestros resultados.

El cáncer de mama es un problema de salud pública muy importante, tanto por su alta incidencia, como por la mortalidad que ocasiona. Es la primera causa de cáncer en la mujer de entre 35 y 45 años con más 20.000 casos anuales en España, siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres.

Actualmente, cerca del 75% de las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama en España están vivas y libres de enfermedad a los 5 años. Aun más importante, se considera fundadamente que la mejoría del pronóstico continuará en los próximos años. Se reconoce unánimemente que este avance se ha debido por igual a dos factores: el diagnóstico más precoz (en gran parte debido a las campañas de cribado con mamografías de la población femenina sana) y la aparición de tratamientos médicos más eficaces (quimioterapia,

hormonoterapia, agentes biológicos), basados en los nuevos conocimientos sobre la biología de la enfermedad (209).

A medida que vamos conociendo mejor los factores pronósticos de la enfermedad, podemos ir identificando el riesgo particular de cada caso de cáncer de mama, lo que está ayudando a seleccionar el tratamiento más adecuado para cada paciente. De hecho, gracias a los avances de la biología molecular se están identificando cuáles son los factores pronósticos de la enfermedad en un paciente concreto, y por eso cada vez se tiende más a realizar tratamientos individualizados (210) en un contexto de medicina personalizada.

El desarrollo de microarrays de ADNc, que permiten el análisis simultáneo de miles de genes, y otras modernas tecnologías, nos ha permitido entrar en una nueva era del conocimiento del cáncer. Inherente a este enfoque existe la hipótesis de que todos los cánceres contienen firmas de expresión génica que en el momento del diagnóstico pueden predecir el comportamiento biológico de éstos a través del tiempo. El primer fruto de estos nuevos conocimientos es el establecimiento de una nueva taxonomía molecular del cáncer de mama (210).

MammaPrint[®] es una prueba diagnóstica, indicada para pacientes con cáncer de mama menores de 61 años, con estadio I o II, tamaño tumoral <5cm y que no tienen ningún ganglio afectado. Se basa en los valores de expresión del ácido ribonucleico de 70 genes incluidos en la micromatriz² y clasifica a los pacientes en 2 grupos de riesgo: riesgo alto de desarrollar metástasis por 10 años (probabilidad de un 50%) o riesgo bajo (probabilidad de entre un 10–15%), con la finalidad de determinar la necesidad y la adecuación de la indicación de quimioterapia (211).

De esta manera, las pruebas pronósticas basadas en arrays, como MammaPrint[®], han abierto la puerta a la medicina personalizada y podrían utilizarse por los oncólogos para decidir administrar o no quimioterapia adyuvante a un paciente en concreto y, en algunos casos, evitar tratamientos

no efectivos, como en el caso de los carcinomas de mama invasivos sin afectación ganglionar, que a pesar de su buen pronóstico se tratan con quimioterapia inespecífica citotóxica u hormonal (211).

VI.3.2. COLOPRINT[®]

La utilización del análisis de microarrays para predecir el pronóstico de los estadios II y III de los pacientes de cáncer de colon se ha demostrado en varios estudios clínicos, así como la validación del uso de perfiles pronósticos para el manejo clínico de estos pacientes. Agendia[®] (212) ha desarrollado un perfil pronóstico de cáncer de colon que se comercializa actualmente en un ensayo para su utilización clínica (ColoPrint[®]). Usando la tecnología de microarrays y métodos de clasificación de tumores, se ha identificado un subconjunto de genes que son predictivos del riesgo de recurrencia de la fase II y III de cáncer de colon. Para el desarrollo de la firma génica se recogió tejido tumoral de 188 pacientes. La mediana de seguimiento fue de 65,1 meses durante el cual 51 pacientes experimentaron una recidiva de su enfermedad. La expresión génica se midió utilizando Agilent 44k microarrays de ADN del genoma. Este clasificador (o perfil de pronóstico) se aplica a una cohorte de validación independiente de 208 pacientes con cáncer de colon en estadio II y III. En esta cohorte, aproximadamente dos tercios de todos los pacientes en estadio II se prevé que tengan un bajo riesgo con una tasa de falsos negativos del 9%. El perfil ha sido validado aún en conjuntos de datos publicados (n = 322) mostrando una separación significativa entre pacientes de bajo riesgo y pacientes de alto riesgo (213). El perfil pronóstico se tradujo en una prueba estandarizada y robusta (ColoPrint[®]).

La validación en otras 233 muestras retrospectivas de la fase II y fase III del cáncer de colon en los pacientes fue presentado recientemente en la Reunión Anual de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) y confirmando los estudios de validación anteriores (214).

En los sistemas de validación, ColoPrint[®] es más valioso que los factores clínicos recomendados por la ASCO para seleccionar a los pacientes en

estadio II con alto riesgo. Además, el análisis multivariante indica que una combinación de ColoPrint[®] y las variables clínicas podrían ser aún más potente y preciso para la identificación de pacientes de alto riesgo. Una comparación más detallada entre ColoPrint[®] y los parámetros clínicos se abordarán en el ensayo clínico PARSC.

En definitiva, ColoPrint[®] es una herramienta para predecir el pronóstico de los estadios II y III de pacientes afectados de cáncer de colon y facilita así la identificación de pacientes en estadio II que pueden ser tratados de manera segura sin quimioterapia adyuvante.

VI.4. CÁNCER DE RECTO Y GENÓMICA

Identificar marcadores moleculares que puedan predecir la respuesta tumoral a tratamientos neoadyuvantes sería trascendental tanto desde el punto de vista del paciente como desde el punto de vista económico.

En el caso concreto del cáncer de recto se han hecho esfuerzos en determinar enzimas como la timidilato-sintetasa y otras asociadas al fluorouracilo con la intención de detectar respuesta al tratamiento quimioterápico (215), pero los resultados de las mismas no han sido concluyentes, por lo que se han seguido estudiando marcadores adicionales en un intento de predecir la respuesta a la neoadyuvancia, en concreto el p53, Ki67, MSH2 (216, 217).

Como resultado de estas investigaciones, varios genes han sido identificados como marcadores de respuesta a la radioquimioterapia, pero lamentablemente su valor predictivo positivo es más bien bajo y de ahí que su relevancia clínica se discuta de forma algo más que controvertida (214, 218).

Los estudios del perfil de expresión génica mediante microarrays en tejidos enfermos han sido bien establecido (180, 219, 220) y han mostrado su

utilidad en el diagnóstico (181, 210). El valor de la determinación del perfil de expresión génica basado en tecnología de microarrays se ha testado en varios modelos de estudio incluyendo líneas celulares de cáncer colorrectal (221), en la predicción de la respuesta a la quimioterapia en pacientes afectos de cáncer de colon (222) y en respuesta a quimioterapia neoadyuvante (223). La aplicación de tales aproximaciones en el estudio de los cambios inducidos por el tratamiento terapéutico se ha localizado siempre en el tejido tumoral (193, 224, 225), aunque la utilidad de muestras de sangre de estos pacientes, como una fuente accesible de material para la identificación de marcadores moleculares, también ha sido estudiada (226, 227).

La tecnología de los microarrays facilita la medida rápida de los niveles de expresión de miles de genes en un único experimento y permite la comparación de niveles de expresión entre diversas muestras (228). Por otro lado la introducción de la PCR en tiempo real para la cuantificación de la expresión génica se ha considerado una etapa hacia la estandarización y puede mejorar la especificidad del diagnóstico cuando se defina un “valor de corte” para la expresión de genes marcadores en muestra de sangre periférica (229-231).

De esta forma encontramos en la literatura analizada tanto estudios que han demostrado que las firmas de expresión génica podrían predecir resultados clínicos en pacientes con cáncer de colon (192, 230) como también la predicción de respuesta a la radioquimioterapia en el caso del cáncer de recto localmente avanzado (193).

Si bien se ha encontrado alguna correlación entre la supervivencia y estos genes específicos (231) su expresión ha sido incapaz de predecir la respuesta al tratamiento estándar, es decir a la radioquimioterapia, quizás por su incapacidad de predecir la respuesta al tratamiento princeps que es la radioterapia (y no la quimioterapia) Especial mención requiere el trabajo pionero de Ghadimi y col, este grupo de investigación alemán, estudia el valor predictivo positivo que determinados perfiles de expresión génica tienen para

valorar la reducción en el grado de infiltración tumoral en la pared del recto (pT de la UICC), tras tratamientos neoadyuvantes con radioquimioterapia. Utilizan biopsias tumorales de 23 pacientes piloto e identifican una firma genética compuesta por 54 genes que se expresan de modo diferencial entre los respondedores y no respondedores al tratamiento. De igual forma consiguen, utilizando 39 de estos genes, una sensibilidad de un 78% y una especificidad de un 86% del grado de respuesta tumoral en 7 nuevos pacientes piloto (224).

Otros trabajos a reseñar por su importancia son los realizados por:

-Watanabe y col. (193) los cuales examinan 35 pacientes tras tratamiento solo radioterápico, esgrimiendo magníficos resultados y evitando así una mayor morbilidad quirúrgica, como consecuencia de la quimioterapia que otros asocian. Identifican una lista de 33 genes con expresión diferente entre respondedores y no respondedores (utilizando el índice de regresión tumoral anatomopatológico). El valor predictivo positivo de estos genes testados en otros 17 pacientes fue de un 88,6%. Asimismo, demuestran que un número importante de estos genes expresados están involucrados en la apoptosis.

-Kim y col. (232): consiguen establecer 95 genes expresados diferencialmente en un total de 31 pacientes, según su respuesta a regímenes de radio-quimioterapia y utilizando igualmente el índice de regresión tumoral. El valor predictivo positivo que alcanza en otra serie de 15 pacientes fue de un 84%.

-Rimkus y col (233) identifican 42 genes sobre-expresados en 43 biopsias de cáncer de recto localmente avanzado antes del tratamiento con radio-quimioterapia y establece un valor predictivo positivo de un 71% y un valor predictivo negativo de un 86% respecto a la respuesta al tratamiento.

-Ojima y col. (234): describen 159 genes involucrados en radio-resistencia mediante el análisis “*in vitro*” de líneas celulares expuestas a radiación. Posteriormente, se validaron los resultados con técnicas de RT-PCR

cuantitativa. Finalmente, seleccionaron dos de estos genes y estudiando su valor predictivo en 30 pacientes sometidos a radioquimioterapia, concluyendo que el gen *protimosina* α tiene valor predictivo positivo como marcador biológico de radio-sensibilidad en el cáncer de recto.

-Daemen y col (235): integran investigaciones de microarrays y proteómica en biopsias y en sangre periférica de 40 pacientes con cáncer de recto. De forma original tomaron muestras en tres momentos diferentes del tratamiento neoadyuvante: antes del mismo (T0), después de aplicar un anticuerpo monoclonal (T1) y después de todo el régimen de radioquimioterapia en el mismo momento de la cirugía (T2). Demuestran que la combinación de 5 genes concretos y 10 proteínas en el momento T0 y T1 consiguen un valor predictivo positivo del 91,7%, una sensibilidad del 96% y una especificidad del 80% respecto al grado de remisión tumoral tras la neoadyuvancia.

VI.5. COMPARACIÓN ENTRE EL GRUPO DE PACIENTES RESPONDEDORES Y NO RESPONDEDORES AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE

Aunque en la actualidad existen estudios sobre el valor de predicción al tratamiento neoadyuvante (radioterapia sola o combinada con quimioterapia) de los perfiles de expresión en muestras de tejido en el cáncer rectal, no encontramos sin embargo investigaciones que se centren en la determinación de estas firmas génicas en las células sanguíneas. Ésta es la razón que determina que el objetivo de este trabajo sea el intentar identificar un grupo de genes que fuesen capaces de discriminar y caracterizar pacientes con cáncer de recto entre respondedores y no respondedores a tratamiento neoadyuvante.

Los análisis de los microarrays realizados en muestras de sangre periférica obtenidas de los pacientes estudiados en la presente tesis doctoral, revelaron la existencia de 8 genes: CIR; PRDM2 (RIZ1); CAPG; FALZ (BPTF); NUPL2; y ZFP36 (TTP); BC035656.1 y HLA-DPB2; expresados diferencial y significativamente entre las muestras sanguíneas de pacientes con cáncer rectal respondedores al tratamiento y los no respondedores. Entre estos genes identificados hemos encontrado que los pacientes respondedores al tratamiento expresaban niveles más elevados.

De los genes identificados, BC035656.1 y HLA-DPB2, no se analizaron por RT-PCR cuantitativa por no tener su secuencia completamente definida, y por tratarse de un gen similar al antígeno de histocompatibilidad HLA de clase II respectivamente.

Los 6 genes restantes: CIR; PRDM2 (RIZ1); CAPG; FALZ (BPTF); NUPL2; y ZFP36 (TTP) podrían ser utilizados como nuevos biomarcadores relacionados con la respuesta al tratamiento neoadyuvante y así poder identificar antes de dar el tratamiento a aquellos pacientes susceptibles de responder.

Ésto supondría la no administración de tratamientos ineficaces, con la consiguiente disminución de reacciones adversas y costes.

Ordenándolos por orden decreciente de expresión según el resultado de los microarrays, los 6 genes serían: CIR; PRDM2 (RIZ1); CAPG; FALZ (BPTF); NUPL2; y ZFP36 (TTP). Estos genes son principalmente identificados como involucrados en procesos biológicos como la diferenciación celular, transcripción, transporte nuclear, apoptosis y anti-angiogénesis. Es por ello que representan a potenciales biomarcadores para clasificar la respuesta al tratamiento neoadyuvante en pacientes con cáncer de recto.

A continuación se procede a realizar la discusión sobre la función biológica específica de cada gen cuya expresión es estadísticamente significativa.

VI.5.1.FALZ (BPTF)

FALZ, también llamado BPTF (Bromodomain PHD finger Transcription Factor) se encuentra localizado en la región 17q24.3. Alteraciones en la región 17q están ligadas a varios tipos de tumores como pulmón (236), mama (237), próstata (238) e hígado (239). Asimismo, translocaciones en el locus 17q24.3 en células embrionarias de pulmón se correlacionan con un fenotipo pre-maligno (240). BPTF se encuentra implicado en regulación transcripcional y remodelación de la cromatina (240). Se han detectado niveles de expresión elevados de BPTF en varios tumores humanos, tales como neuroblastomas y cáncer de pulmón (240). En un reciente trabajo de Buganim y col. (240), se sugiere que la desregulación de FALZ puede conferir a las células un fenotipo pre-cancerígeno, es decir la translocación de este gen se correlacionaría con un fenotipo pre-maligno.

Este gen presentó una significación estadística ($p < 0,05$) al realizar la validación mediante qRT-PCR comparando el grupo de pacientes respondedores con los no respondedores a tratamiento neoadyuvante.

VI.5.2.ZFP36 (TTP)

El gen ZFP36, también conocido como zinc-finger 36 o tristetraprolina (TTP) y localizado en 19q13.1, es un regulador de la biosíntesis de TNF- α (Tumor Necrosis Factor) (241), y desempeña un papel clave en la inducción de la degradación del ARN mensajero de VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) (242).

La inflamación de tejidos implica la infiltración leucocitaria en el lugar donde se ha producido el daño. Esta infiltración es regulada en parte a través de la producción de citoquinas quimioatrayentes o quimioquinas. El control de la expresión de estas quimioquinas puede realizarse a través de diversas etapas, que incluyen la transcripción, la traducción del ARN mensajero o su degradación. Se ha descrito la implicación de ZFP36 en la regulación del RNAmensajero de algunas quimioquinas como CXCL11 de neutrófilos (243), así como en la supresión de la inflamación y aceleración de la degradación del ARN mensajero de determinadas citoquinas (244).

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos a partir de una red vascular preexistente. Este proceso se encuentra implicado en un amplio número de procesos patológicos, incluido el cáncer. Entre los factores angiogénicos caracterizados hasta la fecha, VEGF es el regulador más importante de la angiogénesis tanto fisiológica como patológica (245). ZFP36 realiza un papel clave en la inducción de la degradación del ARN mensajero de VEGF (246). En este sentido se ha descrito que ZFP36 disminuye la expresión de VEGF dependiente de Ras y el desarrollo de tumores vascularizados en ratones inmunodeprimidos (246).

En relación con el cáncer de colon, Carrick y Blackshear (247) observaron una expresión menor de ZFP36 en líneas celulares de cáncer de colon que en células normales de colon, sugiriendo que la sobre-expresión de ZFP36 estaría relacionado con una inhibición de la tumorigénesis (247).

En un trabajo publicado en el año 2010, Lee y col. (248) confirmaron que la expresión del gen ZFP36 se encontraba significativamente reducida en especímenes resecados de adenocarcinoma de colon. Además, confirmaron que la sobre-expresión de ZFP36 suprime el crecimiento de células de cáncer de colon xenoimplantadas “*in vivo*” en ratones inmunodeprimidos. Más aún estos autores confirmaron que niveles elevados de ZFP36 se encontraban asociados con niveles reducidos del ARNm de VEGF en células humanas de cáncer de colon. La sobre-expresión de ZFP36 disminuyó la expresión de VEGF, y viceversa, la supresión de la expresión de ZFP36, utilizando la técnica de silenciamiento de ARN (siRNA), incrementó la expresión de VEGF en células humanas de cáncer de colon (248).

Este gen presentó una significación estadística ($p < 0,05$) al realizar la validación mediante qRT-PCR comparando el grupo de pacientes respondedores con los no respondedores a tratamiento neoadyuvante.

Dada la escasez de estudios de expresión génica realizados en pacientes con cáncer de recto en muestras de sangre periférica, consideramos adecuado proceder a discutir los genes sobre-expresados mediante microarrays si bien la realización de qRT-PCR no haya proporcionado resultados estadísticamente significativos.

VI.5.3.CIR

También conocido como corepresor de CBF1, se encuentra localizado en la posición 2q31.1 del cromosoma 2. Es un gen corepresor transcripcional (249) que participa en la ruta de señalización Notch. CIR es corepresor de CBF-1, factor de transcripción ubicuo que actúa como un represor transcripcional, pero su disociación de CIR convierte a CBF-1 de ser un represor en un activador (249). CBF-1 es un miembro de la familia CSL de factores de unión a ADN, los cuales desempeñan un papel central en la señalización de Notch. La señalización Notch controla las decisiones de direccionamiento celular que se manifiestan durante desarrollo, renovación de células troncales y diferenciación. Hay evidencia que sugiere que la red de señalización Notch se encuentra habitualmente desregulada en neoplasias humanas (250). La sobreexpresión de CIR contribuye a evitar la desregulación de las señales de Notch actuando sobre CBF-1.

VI.5.4.PRDM2 (RIZ1)

El gen PRDM2, cuyo sinónimo es RIZ1, es un gen supresor de tumores que actúa metilando las histonas (251). El locus del gen RIZ1 se encuentra en la región 1p36, una región que habitualmente acoge alteraciones en muchos tipos de cánceres humanos (252). La expresión de este gen se encuentra habitualmente silenciada en muchos tipos de tumores humanos, incluyendo cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de colon, neuroblastoma, melanoma, cáncer de pulmón y osteosarcoma (252-255). RIZ1 contiene un dominio PR, indicador de función supresora de tumores y tiene la capacidad de inducir detención del ciclo celular en la fase G₂/M y la apoptosis celular suprimiendo la capacidad de generar tumores en ratones inmunodeprimidos (ratones desnudos) (254). RIZ1 se ha descrito implicado en cáncer gástrico (256) así como en carcinogénesis colorrectal (255).

VI.5.5. CAPG

El gen CAPG, también conocido como MCP, gCap39 o Mbh, se localiza en el cromosoma 2, posición 2p11.2.

Es un gen que codifica una proteína de 348 aminoácidos y que se encuentra expresado de forma ubicua en tejidos normales, siendo particularmente abundante en macrófagos (257-259). CAPG es un miembro de la familia de proteínas que modulan los filamentos de actina. Entre los miembros de esta familia se encuentran gelsolina, villina, adseverina, adevellina y supervilina (260). CAPG se encuentra implicado en señalización celular, fagocitosis y movilidad (259), y se ha descrito implicado en carcinoma oral (261).

La expresión de CAPG no se ha encontrado en tejidos y líneas celulares de cáncer humano, incluyendo la línea celular AZ521 tumorigénica de cáncer gástrico, que se convierte en no-tumorigénica mediante una expresión ectópica de la proteína CAPG (262). No obstante hay autores que sostienen una actividad para este gen como iniciador o activador de procesos neoplásicos (261). En definitiva la expresión de la proteína CAPG reduce la capacidad de las células transformadas para inducir formación de tumores, lo cual sugiere que CAPG es un gen supresor de tumores (262).

VI.5.6. NUPL2

NUPL2 (Nucleoporin hCG1) ubicado en la posición 7p15 del cromosoma 7. Es un componente del complejo de poros nucleares (NPC) implicado en procesos tales como la salida de proteínas desde el núcleo, transporte de ARN mensajero y transporte de proteínas específicamente la proteína de shock térmico Hsp70 (263). Esta proteína Hsp70 tiene funciones conocidas como promotora de respuesta inmune antitumor. La sobre-expresión de Hsp70 en cáncer colorectal con inestabilidad de microsatélites puede ser crucial para explicar la elevada inmunogenicidad de estos tumores y su mejor pronóstico (264). Por tanto una sobre-expresión de NUPL2 puede llevar a una acumulación de Hsp70.

El perfil de expresión de los genes detectados manifiesta coherencia con la literatura consultada, al tratarse de genes descritos, unos como supresores de tumores: PRDM2 (RIZ1) (251), CAPG (262), ZFP36 (TTP) (248) y otros a través de su actividad: CIR, actuando como co-represor transcripcional y evitando la desregulación de vías de señalización en neoplasias humanas (250); FALZ , cuya desregulación puede conducir a un fenotipo celular maligno (240) y NUPL2 cuya sobre-expresión conduce a una acumulación de proteínas de respuesta inmune antitumor (264).

Para investigar la posibilidad de que el perfil de expresión génica en sangre periférica sea un reflejo de los genes expresados en el propio tejido tumoral se realizó también el análisis mediante microarrays del tejido tumoral de los pacientes con cáncer de recto. No se encontró ninguno de los 8 genes expresados en sangre periférica entre pacientes respondedores y no respondedores. De esta forma la expresión génica en sangre periférica parece que no imita a la expresión génica del propio tumor primario.

Aunque la adición de oxaliplatino al tratamiento neoadyuvante de algunos pacientes sea un inconveniente de nuestro estudio, conviene decir que el principal efecto del tratamiento radioquimioterápico depende sobre todo de la radioterapia. Los resultados del estudio de Gerard en fase III (130) describen la importancia del uso de 50,4 Gy de radioterapia independientemente del agente quimioterápico usado (capecitabina sola o combinada con oxaliplatino).

¿Cómo podríamos, sin embargo, discutir la importancia del perfil génico en sangre de estos pacientes tratados principalmente de forma local?

Efectivamente, la radioterapia es el arma terapéutica fundamental para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades por medio de la radiación ionizante. Ésta deposita energía que lesiona o destruye a las células en el área de tratamiento (el tejido blanco u objetivo) al dañar el material genético (ADN) de células individuales, imposibilitándoles el seguir creciendo.

Aunque la radiación lesiona tanto a las células cancerosas como a las normales, estas últimas pueden repararse y recobrar su funcionamiento adecuado. La radioterapia sirve para tratar tumores sólidos localizados, como leucemias y linfomas (cánceres de las células que forman la sangre y el sistema linfático, respectivamente).

La razón de que el curso terapéutico para ciertos cánceres sea relativamente tan largo (2-8 semanas) es proveer un margen para la reparación normal de los tejidos después de cada exposición a la radiación, así como reducir al mínimo la lesión permanente. La dosis diaria también tiene que ser suficientemente grande como para destruir las células cancerosas en tanto ahorra a los tejidos normales los valores excesivos de radiación. Este acto de equilibrio es la base de la radioterapia moderna.

Se están buscando modos para incrementar la eficacia de las técnicas actuales de radioterapia. Se estudian dos tipos de medicamentos experimentales debido a su efecto sobre las células sometidas a radiación.

Dichos medicamentos, llamados radiosensibilizadores, permiten que sea más probable lesionar las células tumorales. Otros fármacos conocidos como radioprotectores, resguardan a los tejidos normales de las acciones de la radiación. También se estudia la hipertermia, o el empleo de calor, en cuanto a su eficacia para sensibilizar a los tejidos a la radiación.

Otras investigaciones recientes sobre la radiación se enfocan en el uso de anticuerpos radioetiquetados a fin de suministrar dosis de radiación directamente al sitio canceroso (radioinmunoterapia). Los anticuerpos son proteínas muy específicas que el cuerpo elabora como reacción ante la presencia de antígenos (sustancias reconocidas como extrañas por el sistema inmune). Las células de algunos tumores contienen antígenos específicos que activan el sistema inmune del cuerpo con el objetivo de que produzca anticuerpos específicos para el tumor. Es posible fabricar en el laboratorio cantidades considerables de tales anticuerpos y fijarlos a sustancias radiactivas (proceso llamado radioetiquetación). Una vez inyectados, los anticuerpos

buscan activamente a las células cancerosas, que son destruidas por la acción citotóxica (de destrucción celular) de la radiación. El beneficio de este método consiste en que puede reducir al mínimo el peligro de dañar por la radiación a las células sanas del cuerpo. El éxito de esta técnica depende de la identificación de sustancias radiactivas apropiadas y el establecimiento de la dosis de radiación segura y eficaz que sea factible administrar de este modo. De esta manera, el desarrollo de un tumor en un ambiente inmunocompetente representa el engaño al sistema inmune, en cuanto a la naturaleza del peligro y el tipo de respuesta necesaria para rechazar al tejido neoplásico.

Recientemente han surgido algunos estudios, en los que se explica que la radiación de un tumor produce un microambiente en el que se pueden inducir señales moleculares esenciales que desencadenan una respuesta eficaz del sistema inmune al tumor.

Los sensores del tipo de daño son complejas interacciones moleculares entre el órgano dañado y las células del sistema inmune adaptativo e innato. Los avances en la identificación de estas interacciones aclaran que las vías están específicamente alteradas en el cáncer. También proporciona una comprensión del proceso de inmunogenicidad como efecto inducido por la radiación del tumor. Así los efectos específicos inducidos por la radiación podrían ser explotados con éxito para mejorar la eficacia de la inmunoterapia (265).

El estudio de Lorimore y col (266) del año 2001, un modelo experimental de ratones sobre la respuesta inflamatoria después de la exposición a la radiación ionizante ha demostrado que la activación de los macrófagos y la infiltración de neutrófilos no fueron los efectos directos de la radiación, pero son una consecuencia del reconocimiento y liquidación de la radiación inducida por las células apoptóticas. El aumento de la actividad de células fagocíticas se mantuvo después de que los cuerpos apoptóticos se hubiesen retirado. Estos hallazgos demuestran que, contrariamente a lo esperado, el reconocimiento y eliminación de las células apoptóticas después de la exposición a la radiación

produce tanto una activación persistente de los macrófagos y una respuesta de tipo inflamatorio. También demuestran que la activación de macrófagos es genotipo dependiente, lo que indica que en las respuestas de los macrófagos in vivo debido al daño por radiación son procesos genéticamente modificados. Estas respuestas a corto plazo de los macrófagos a la radiación inducida por la apoptosis y su modificación genética es probable que sean determinantes de las consecuencias a largo plazo de la exposición a la radiación. Por otra parte, además de los efectos atribuibles a la radiación inmediata del daño inducido, los resultados de este grupo proporcionan un mecanismo para la producción de daños a través de un efecto de "espectador" que puede contribuir a la radiación inducida por la inestabilidad genómica y leucogénesis.

En la misma dirección en el año 2007 se publicó el trabajo de Apetoh y col. (267), partiendo de la idea de que el tratamiento quimiorradioterápico media su efecto a través de la eliminación directa de las células tumorales, mostraron que algunos de estos protocolos dependen de la adaptación y de la respuesta inmune antitumoral innata. Este grupo describe en ratones y en seres humanos una vía reconocida previamente para la activación de tumor de células de inmunidad específica de antígeno T que consiste en la secreción de alarmin proteínas HMGB1 al morir las células tumorales. La acción de HMGB1 es como (like) los receptores Toll 4 (TLR4) expresados por las células dendríticas. Así durante la quimioterapia o la radioterapia, las células dendríticas requieren de señalización a través de TLR4 y su adaptador MyD88 para un procesamiento eficiente y presentación cruzada de antígenos procedente de la muerte de las células tumorales. De esta forma está descrito que las pacientes con cáncer de mama que tienen una menor función del alelo TLR4 tienen una recaída tumoral más rápida después de recibir tratamiento radioquimioterápico que las que tienen una función normal de este alelo. Así, los resultados de este grupo se inclinan a favor de una vía inmunoadyuvante desencadenado por la muerte de células tumorales.

Por otro lado el grupo de Nesslinger y col. (268) estudiaron la respuesta inmune específica del cáncer de prostata al tratamiento radioterápico y

hormonal, demostrando por primera vez que estos tratamientos inducen respuestas inmunes específicas del antígeno en pacientes con el mencionado tumor. Por lo tanto, los mecanismos inmunológicos pueden contribuir a los resultados clínicos después de la terapia hormonal y radiación, un efecto que podría ser explotado como una estrategia personalizada en el tratamiento con inmunoterapia.

En esta misma línea hay que destacar las investigaciones del grupo de Schaeue y col. (269), los cuales demostraron que en pacientes con cáncer colorrectal sometidos a tratamiento radioterápico aumentaba la expresión de células T específicas del tumor (reguladoras de la secreción de survivina), por tanto este grupo plantea también la posibilidad del uso de inmunoterapia para este tipo de tumores.

Molling y col. (270) demostraron en el año 2007 que las células "Natural Killer "T desempeñan un papel importante en la patogenia del carcinoma escamoso de cabeza y cuello, de tal manera que una deficiencia de estas células se relaciona con una respuesta pobre al tratamiento radioterápico de este tipo de cáncer. Por otro lado postulan la posibilidad de evaluar los niveles de células Natural Killer T para determinar aquellos pacientes que pueden beneficiarse de terapias adyuvantes inmunoterápicas.

Por otra parte el grupo de Kitayama y col. (271), sabiendo que aún no se ha identificado ningún factor que determine la respuesta clínica al tratamiento neoadyuvante con radioterapia en el cáncer de recto, evaluaron la relación entre el recuento circulante de células sanguíneas y los efectos de la radioterapia. Este grupo evaluó 179 pacientes con cáncer rectal avanzado, examinando retrospectivamente sus tasas de hemoglobina, leucocitos, plaquetas y linfocitos, después del tratamiento radioterapéutico, e investigaron su asociación con su respuesta completa. De esta manera llegaron a la conclusión de que las tasas de linfocitos en sangre periférica en pacientes con carcinoma rectal avanzado están relacionadas con la respuesta a la radioterapia., por tanto las reacciones inmunes mediadas por los linfocitos

tienen un papel positivo en la respuesta clínica a la radioterapia en pacientes con carcinoma rectal avanzado.

De acuerdo con nuestra información hay pocos estudios focalizados en el análisis de expresión génica de sangre (226) como factor de predicción, tal y como hemos realizado en nuestro estudio. Podemos hacer referencia al estudio realizado por DePrimo y col. (226) En el año 2003, en el que se describe un método utilizado para identificar los cambios de expresión génica que podrían servir como biomarcadores indirectos de actividad de la quimioterapia. Este grupo realizó perfiles de expresión mediante microarrays a células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal avanzado participantes en un ensayo clínico (fase III). Las muestras las obtuvieron antes del tratamiento y al final del primer ciclo quimioterápico (6 semanas). Este método confirmó cuatro de estas transcripciones (CD24, lactoferrina, lipocalina 2 y MMP-9) como potenciales marcadores biológicos potenciales del tratamiento quimioterápico (226).

Los resultados descritos aquí refuerzan la idea de que las muestras de sangre humana podrían servir, de forma paralela a los estudios en tejido tumoral, para la investigación de biomarcadores en pacientes con cáncer rectal.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

El estudio de investigación que constituye la presente Tesis Doctoral nos lleva a exponer las siguientes conclusiones:

1.-Se ha detectado mediante microarrays de genoma completo humano la sobreexpresión de 8 genes en muestras de sangre periférica pre-tratamiento radioquimioterápico en pacientes con carcinoma de recto, permitiendo diferenciar el grupo de pacientes respondedores a terapia neoadyuvante frente a los no respondedores.

2.-De los 8 genes sobreexpresados 6 han podido identificarse presentando las siguientes funciones biológicas: PRDM2 (RIZ1), CAPG y ZFP36 (TTP) como supresores de tumores. CIR como corepresor transcripcional y evitando la desregulación de vías de señalización en neoplasias humanas; FALZ , cuya desregulación conduce a un fenotipo celular maligno y NUPL2 relacionado con transporte de proteínas de shock térmico.

3.-La validación mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) confirma los datos de expresión génica proporcionados por los microarrays.

4.-Según nos consta esta es la primera investigación que investiga firmas de expresión génica en sangre periférica como factor predictivo de respuesta al tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://surveillance.cancer.gov/statistics>. (http://seer.cancer.gov/fatstats/htm/inc_colorect.html).
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 1999; 49: 33.-64.
3. Nelson RL, Persky V, Turyk M. Determination of factors responsible for the declining incidence of colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1999; 42:741-752.
4. Staszewski J, Haenszel W. Cancer mortality among the Polish-born in the United States. J Natl Cancer Inst 1965; 35:291-297.
5. Kune S, Kune GA, Watson L. The Melbourne colorectal cancer study: incidence findings by age, sex, site, migrants and religion. Int J Epidemiol 1986; 15: 483-493.
6. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX. IARC Scientific Publications 2007. Nº 160, Lyon, IARC 1-895.
7. Nelson RL, Dollear T, Freels S, Persky V. The relation of age, race, and gender to the subsite location of colorectal carcinoma. Cancer 1997; 80:193-197.
8. Obrand DI, Gordon PH. Continued change in the distribution of colorectal carcinoma. Br J Surg 1998; 85:246-248.
9. Fleshner P, Slater G, Aufses AH Jr. Age and sex distribution of patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1989; 32:107-111.
10. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FR, Willet WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. N Engl J Med 1994; 331:1669-1974.

11. Burt RW, Bishop DT, Cannon LA, Dowdle MA, Lee RG, Skolnick MH. Dominant inheritance of middleage US men. adenomatous colonic polyps and colorectal cancer. *N Engl J Med* 1985; 312:1540-1544.
12. Martínez ME, Giovannucci E, Spiegleman D, Hunter DJ, Willett WC, Colditz GA. Leisure-time physical activity, body size, and colon cancer in women. Nurses Health Study Research Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:948-955.
13. Platz EA, Willett WC, Colditz GA, Rimm EB, Spiegleman DL, Giovannucci EL. Proportion of colon cancer risk that might be preventable in a cohort of middle aged US men *Causes Control* 2000; 11:579-588.
14. Mc Keown-Eyssen GE, Toronto Polyp Prevention Group: Insulin resistance and the risk of colorrectal neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5:235-247.
15. Schoen RE, Tangen CM, Kuller LH, Burke GL, Cushman M, Tracy RP, Oobs A, Savage PJ. Increased blood glucose and insulin, body size, and incident colorrectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1147-1154.
16. Wilmink AB. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1997; 40:483-493.
17. Singh PN, Fraser GE. Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Am J Epidemiol* 1998; 148:761-774.
18. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990; 323:1664-1672.
19. Key TJ, Fraser GE, Thorogood M, Appleloy PN, Beral V, Reeves G, Butt ML, Chang-Claud J, Frentzel-Beyme R, Kuzmaa JW, Mann J, McPherson K. Mortality in vegetarians and nonvegetarians: detailed findings from a collaborative analysis of 5 prospective studies. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:516S-524S.

-
20. Caderni G, Palli D, Lancioni L, Russo A, Luceri G, Saieva C, Trallori G, Manneschi L, Renai F, Zachi S, Salvadori M, Dolara P. Dietary determinants of colorectal proliferation in the normal mucosa of subjects with previous colon adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8:219-225.
21. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:916-932.
22. Burnstein MJ. Dietary factors related to colorectal neoplasms. *Surg Clin North Am* 1993; 73:13-29
23. Howe GR, Aronson KJ, Benito E, Castelleto R, Corneé J, Duffy S, Gallagher RP, Iscovic JM, Deng-ao J, Kaaks R, Kune GA, Kune S, Lee HP, Lee M, Miller AB, Peter RK, Riboli E, Slattery ML, Tridiopolus D, Tuyns A, Tzonou A, Watson LF, Whittemore AS. The relationship between dietary fat intake and risk of colorectal cancer: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *Cancer Causes Control* 1997; 8:215-228.
24. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willet WC. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 1999; 340:169-176.
25. Planck M, Anderson H, Bladstrom A, Moller T, Wenngren E, Olsson H. Increased cancer risk in offspring of women with colorectal carcinoma: A Swedish register-based cohort study. *Cancer* 2000; 89:741-749.
26. Potter JD. Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes Control* 1996; 7:127-146.
27. Willett WC. Diet and cancer. One view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:3-8.
28. Bostick RM, Fosdick L, Wood JR, Grambsch P, Grandits GA. Calcium and colorectal epithelial cell proliferation in sporadic adenoma patients: A randomized double blinded placebo controlled clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1307-1315.

29. Bergsma-Kadijk JA, Van't Veer P, Kampman E, Burema J. Calcium does not protect against colorectal neoplasia. *Epidemiology* 1996; 7: 590-597.
30. Martínez ME, Willett WC. Calcium, vitamin D, and colorectal cancer. A review of epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:163-168.
31. Whittemore AS, Wu-Williams AH, Lee M, Shu Z, Gallagher RP, Deng-ao J, Lun Z, Xianghui W, Kun C, Jung D, The C, Chengde L, Yao XJ, Paffenbager Jr RS, Henderson BE. Diet, physical activity, and colorectal cancer among Chinese in North America and China. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:915-926.
32. Seitz HK, Simanowski UA, Garzon FT, Rideout FT, Pekers TJ, Koch A, Berger MR, Einecke H, Maiwald M. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. *Gastroenterology* 1990; 98:406-413.
33. Kikendall JW, Bowen PE, Burgess MB, Magnetti C, Woodward J, Lagenberg P. Cigarettes and alcohol as independent risk factors for colonic adenomas. *Gastroenterology* 1989; 97:660-667.
34. Rosenberg L, Werler MM, Palmer JR, Kanfman DW, Warshamer ME, Stowey PD, Shapiro S. The risks of cancers of the colon and rectum in relation to coffee consumption. *Am J Epidemiol* 1989; 130:895-903.
35. Hartman TJ, Tangrea JA, Pietinen P, Malila N, Virtanem M, Taylor PR, Albono D. Tea and coffee consumption and risk of colon and rectal cancer in middle-aged Finnish men. *Nutr Cancer* 1998; 31:41-48.
36. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willet WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 1994; 121:241-246.
37. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MI, Colditz GA, Willet WC, Speiser FE. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995; 333:609-614.

38. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 1991; 325:1593-1596.
39. Rosenberg L, Louik C, Shapiro S. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and reduced risk of large bowel carcinoma. *Cancer* 1998; 82:2326-2333.
40. Volgestein B, Feron E, Hamilton S, Kem ST, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smiths AM, Bos JL. Genetic alterations during colorrectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-532.
41. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kem SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancer. *Science* 1990; 247:49-56.
42. Fearon E, Volgestein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
43. Lengauer C, Kinzler KW, Volgestein B. Genetic instability in colorrectal cancers. *Nature* 1997; 386:623-627.
44. Bodmer WR, Bailey DJ, Bodmer J, Bussey HIR, Ellis A, Gorman P, Cocibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, Sheer D, Solomon E, Spurr NK. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987; 328:614-616.
45. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostre H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampe IH, Markowitz A, Kimstra D, Jhanwar S, Winawer S, Offit K, Luce MC, Kinzler KW, Volgestein B. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 1997; 17:79-83.
46. Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Joslyn G, Gelbert L, Carlson M, Otterud B. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993; 75:951-957.
47. Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med* 1994; 331:1694-1702.

48. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Cohen Z, Tetu B. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332:839.
49. Lynch HT, Lynch JF. Genetics of colorectal cancer. *Digestion* 1998; 59: 481-92.
50. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*. 1991 May;34(5):424-5.
51. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1453-1463
52. Burt RW. Colon Cancer Screening. *Gastroenterology* 2000; 119: 837-853.
53. Brown SR, Finan PJ, Hall NR, Bishop DT. Incidence of DNA replication errors in patients with multiple primary cancers. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:765-769.
54. Haigies KM, Caya JG, Reichelderfer M, Dove WF. Intestinal adenomas can develop with a stable karyotype and stable microsatellites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:8927-8931.
55. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski M, Gratehev A, Ilyas M, Bodmer W, Riecken E, Buhr H. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:1603-1608.
56. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. Deleted in colorectal cancer (DCC) encodes a natriin receptor. *Cell* 1996; 87:175-185.

57. Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Shai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastases. *Oncogene* 1999; 18:3098-3103.
58. Hamamoto T, Beppu H, Okada H, Kawabata M, Kitamura T, Miyazono K, Kato M. Compound disruption of Smad2 accelerated malignant progression of intestinal tumors in Apc knockout mice. *Cancer Res* 2002; 62:5955-5961.
59. Dietrich WF, Lander ES, Smith JS, Mosser AR, Gould KA, Luongo C, Borenstein N, Dove W. Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* 1993; 75:631-639.
60. Hawkins NJ, Bariol C, Ward RL. The serrated neoplasia pathway. *Pathology* 2002; 34:548-555.
61. Jass JR, Whitehall VL, Young J, Deggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 123:862-876.
62. Chan TL, Zhao W, Cancer Genome Project, Leung SY, Yuen ST. BRAF&KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenoma. *Cancer Res* 2003; 63:4878-4881.
63. Stein W, Farina A, Gaffney K, Lundenn C, Wagner K, Wachtel T. Characteristics of colon cancer at time of presentation. *Fam Pract Res J* 1993; 13:355-363
64. Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:3039-3045.
65. William F.R, Nader H, Philip D, Alfred M.C. "Cáncer de Recto". *Oncología Clínica*. 3ªed. Elsevier España, 2005.1943-1965.
66. Bailey HR, Huval WV, Max E, Smith KW, Butts DR, Zamora LF. Local excision of carcinoma of the rectum for cure. *Surgery* 1992; 111(5):555-561.

-
67. Taylor RH, Hay JH, Larsson SN. Transanal local excision of selected low rectal cancer. *Am J Surg* 1998; 175(5):360-363.
68. Compton CC. Surgical pathology of colorectal cancer. En: *Colorectal cancer: multimodality management*. Leonard B. Saltz Ed. 2002 Cap.14, pag 247-264. Humana press, New Jersey, USA.
69. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Veki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd, Halminton SR. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344:1196-1206.
70. American Joint Committee on Cancer. Colon and rectum. *AJCC cancer staging manual* 6^o edicion. Philadelphia: Lippincott–Raven, 2002:113-137.
71. Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954:139-846.
72. Mac Donald JS. Adjuvant therapy of colon cancer. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:202-219.
73. Glaser F, Schlag P, Herfarth C. Endorectal ultrasonography for the assessment of invasion of rectal tumours and lymph node involvement. *Br J Surg* 1990;77(8):883-887.
74. Solomon MJ, McLeod RS. Endoluminal transrectal ultrasonography: Accuracy, reliability, and validity. *Dis Colon Rectum* 1993; 36(2):200-205.
75. Kim NK, Kim MJ, Yun SH, Sohn SK, Min JS. Comparative study of transrectal ultrasonography, pelvic computerized tomography, and magnetic resonance imaging in preoperative staging of rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1999; 42(6):770-775.
76. Gerard A, Buyse M, Nordlinger B. Preoperative radiotherapy as adjuvant treatment in rectal cancer. Final results of a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Ann Surg*.1998; 208:606-614.

77. Stockholm Rectal Cancer Study Group. Preoperative short-term radiation therapy in operable rectal carcinoma. A prospective randomized trial. *Cancer*. 1990; 66:49-55.

78. Llamas-Elvira JM, Rodríguez Fernández A, Gutiérrez-Sainz J. Gomez Rio M, Bellón Guardia M, Ramos Font C, Rebollo-Aguirre AC, Cabello-Garcia D, Ferrón Orihuela A. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET in the preoperative staging of colorectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007; 34 :859-867.

79. Delbeke D. Oncological applications of FDG PET imaging: Brain tumors, colorectal cancer, lymphoma and melanoma. *J Nucl Med*. 1999; 40: 591-603.

80. Yasuda S, Fujii H, Nakahara T. 18F-FDG PET detection of colonic adenomas. *J Nucl Med*.2001; 42:989-992.

81. Cohade C, Osman M, Leal J, Wahl RL. Direct comparison with conventional of 18F-FDG and PET/CT in patients with colorectal carcinoma. *J Nucl Med*. 2003; 44:1797-1803.

82. Durdey P, Williams NS. Pre-operative evaluation of patients with low rectal carcinoma. *World J Surg* 1992; 16 (3):430-436.

83. Haggit R, Gletzbach R, Soffer E, Wrubble LD. Prognostic Factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polipectomy. *Gastroenterology* 1985; 89:328-336.

84. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*, 8th ed. St Louis, MO, Mosby, 1996, USA pag 754-799.

85. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Coopen HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hatcher RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willet C. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:979-994.

86. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Bossola M, Vechio FM. Accurate lymph-node detection in colorectal specimens resected for cancer is of prognostic significance [Discussion]. *Dis Colon Rectum* 1999; 42:143-158.
87. Wong JH, Severino R, Honnebier MB, Tom P, Namiki TS. Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:2896-2900.
88. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg* 1997; 185:55-59.
89. Nagtegaal ID, Marijnen CAM, Kranenbarg E.K, Van de Velde CJH, Krieken JHJM. Circumferencial margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:350-7.
90. Palma P, Freudenberg S, Samel S, Post S. Transanal endoscopic microsurgery: indications and results after 100 cases. *Colorectal Dis.* 2004 Sep; 6(5):350-355.
91. Mellgren A, Sirivongs P, Rothenberger DA, Madoff RD, Garcia-Aguilar J. Is local excision adequate therapy for early rectal cancer? *Dis Colon Rectum.* 2000 43 (8): 1064-1071.
92. Palma P, Horisberger K, Joos A, Rothenhoefer S, Willeke F, Post S. Local Excision of Early Rectal Cancer: Is Transanal Endoscopic Microsurgery an Alternative to Radical Surgery. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009 Mar; 101(3):172-8.
93. Borschitz T, Heintz A, Junginger T. The influence of histopathologic criteria on the long-term prognosis of locally excised pT1 rectal carcinomas: results of local excision (transanal endoscopic microsurgery) and immediate reoperation. *Dis Colon Rectum.* 2006 Oct;49(10):1492-1506.
94. Head RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excisión for rectal cancer. *Lancet* 1986; 1(8496):1479-1482.

-
95. Havenga K, Enker WE, Mc Dermott K, Ghen AM, Minsky BD, Guillen J. Male and female sexual and urinary function after total mesorectal excision with autonomic nerve preservation for carcinoma of the rectum. *J Am Coll Surg* 1996; 182(6):495-502.
96. Enker WE, Thaler HT, Cranor ML, Polyak T. Total mesorectal excision in the operative treatment of carcinoma of the rectum. *J Am Coll Surg* 1995; 181:335-346.
97. Kapiteijn E, Marijne CAM, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJT, Pahlman L, Glimelius B, Van Kriekem HJM, Leer JWH, Van de Velde CJH. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001; 345:638-646.
98. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkan R, Martus P, Tschmelitsch J, Hoyer E, Hess CF, Karstens JH, Lie T. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 21;351(17):1731-1740.
99. De Haas-Kock DF, Baeten CGMI, Japer JJ, Langedijk JA, Schonten L, Volovics A, Arends JW. Prognostic significance of radial margins of clearance in rectal cancer. *Br J Surg* 1996; 83(6):781-785.
100. Ng IO, Is MK, ST Yuen, Lan Pw, Pritchett CJ, Ny M, Poon GP, Ho J. Surgical lateral clearance in resected rectal carcinomas. A multivariate analysis of clinicopathologic features. *Cancer* 1993; 71(6):1972-1976.
101. Hanna NN, Guillem J, Doseretz A, Steckelman E, Minsky BD, Cohen AM. Intraoperative parasympathetic nerve stimulation with tumescence monitoring during total mesorectal excision for rectal cancer. *J Am Coll Surg* 2002; 195(4):506-512.
102. Pikarsky AJ, Rosenthal R, Weiss EG, Werner SD. Laparoscopic total mesorectal excision. *Surg Endosc* 2002;16(4):558-562.

103. Scheidbach H, Schneider C, Konradt J, Bärlehner E, Köhler L, Wittenkind C, Köckeling F Laparoscopic abdominoperineal resection and anterior resection with curative intent for carcinoma of the rectum. *Surg Endosc* 2002; 16(1):7-13.

104. Williams NS. The rationale for preservation of the anal sphincter in patients with low rectal cancer. *Br JSurg* 1984;71(8):575-581.

105. Shirouzu K, Isomoto H, Kakegawa T. Distal spread of retal cancer and optimal distal margin of resection for sphincter-preserving surgery. *Cancer* 1995;76(3):388-392.

106. Vernava AM 3rd, Moran M, Rothenberger DA, Wong WD . A prospective evaluation of distal margins in carcinoma of the rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1992; 175(4):333-336.

107. Rider WD, Palmer JA, Mahoney LJ, Robertson CT. Preoperative irradiation in operable cancer of the rectum:Report of the Toronto trial. *Can J Surg* 1977; 20(4):335-338.

108. Stearns MW Jr, Deddish MR, Quan SH Leaming RH. Preoperative roentgen therapy for cancer of the rectum and rectosigmoid. *Surg Gynecol Obstet* 1974; 138(4):584-586.

109. Higgins GA, Humphrey EW, Dwight RW, Roswit B, Lee LE, Keehn RJ. Preoperative radiation and surgery for cancer of the rectum. Veterans Administration Surgical Oncology Group Trial II. *Cancer* 1986; 58(2):352-359.

110. Gerard A, Buyse M, Nordlinger B, Loygue J, Pene F, Kempf P, Bosset DF, Gignoux R, Arnaud JP, Desai C. preoperative radiotherapy as adjuvant treatment in rectal cancer. Final results of a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Ann Surg* 1988;208(5):606-614

111. Swedish Rectal Cancer Trial. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 1997; 336:980-987.

112. Camma C, Giuntam, Fiorica F, Pagliaro L, Craxi A, Cottone M. Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. *JAMA* 2000; 284(8):1008-1015.
113. Chen ET, Mohinddin M, Brodovsky H, Fishbein G, Marks G. Downstaging of advanced rectal cancer following combined preoperative chemotherapy and high dose radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30(1):169-175.
114. Janjan NA, Abbruzzese J, Pardur R, Khoo VS, Cleany K, Dubrow R, Ajani J, Rich TA, Goswitz MS, Evetts PA, Aller PK, Lynch PM, Skibber JM. Prognostic implications of response to preoperative infusional chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Radiother Oncol* 1999;51(2):153-160.
115. Kaminsky-Forrett MC, Conroy T, Luporosi E. Prognostic implications of downstaging following preoperative radiation therapy for operable T3-T4 rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42(5):935-941.
116. Mohiuddin M, Hayne M, Regine WF, Hagiya PF, McGrath P, Marks GM. Prognostic significance of postchemoradiation stage following preoperative chemotherapy and radiation for advanced/recurrent rectal cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48(4):1075-1080.
117. Onaitis MW, Robert B, Noone MD, Noone RB, Fields B, Hurwitz H, Morse M, McGrath K, Le C, Ahsher MS, Clary B, Mantynh C, Pappas TN, Ludwig K, Seigler HF, Tyler DS. Complete response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer does not influence survival. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(10):801-806.
118. Ahmad NR, Marks G, Mohiuddin M. High-dose preoperative radiation for cancer of the rectum: Impact of radiation dose on patterns of failure and survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 27(4):773-778.
119. Mohiuddin M, Lingareddy V, Rakinic J, Marks G. Reirradiation for rectal cancer and surgical resection after ultra high doses. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 27(5):1159-1163.

120. Mohiuddin M, Regine WF, John WJ, Hagihara PF, McGrath PC, Kenady DE, Marks G. Preoperative chemoradiation in fixed distal rectal cancer: Dose time factors for pathological complete response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46(4):883-888.

121. Lee JH, Ahn JH, Bahng H. Randomized train of postoperative adjuvant therapy in stage II and III rectal cancer to define the optimal sequence of chemotherapy and radiotherapy: A preliminary report. *J Clin Oncol* 2002; 20(7):1751-1758.

122. Francois Y, Nemoz CJ, Banelienx J. Influence of the interval between preoperative radiation therapy and surgery on downstaging and on the rate of sphincter-sparing surgery for rectal cancer. The Lyon R90-01 randomized trial. *J Clin Oncol* 1999; 17(8):2396-2417.

123. Frykholm G, Glimelius B, Pahlman L. Preoperative irradiation with and without chemotherapy (MLF) in the treatment of primarily nonresectable adenocarcinoma of the rectum. Results from two consecutive studies. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25(11):1535-1541.

124. Nathanson DR, Espat NJ, Nash GM, D'Alessio M, Thaler H, Minsky B, Enker W, Wong D, Guillem J, Cohen A. Evaluation of preoperative and postoperative radiotherapy on long-term functional results of straight coloanal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2003; 46:888-894.

125. Holyoke ED. Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma. Gastrointestinal Tumor Study Group. *N Engl J Med* 1985; 312(23):1465-1472.

126. NIH Consensus Conference: Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990; 264(11):1444-1450.

127. Wolmark N, Wieand HS, Hyams DM, Colangelo L, Nikolay U, Edward H. Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without

radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and bowel Project Protocol r-02. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(5):388-396.

128. O'Connell MJ, Martenson JA, Wieand HS, Krook JE, McDonald JS, Haller DJ. Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-infusion fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med* 1994; 331(8):502-507.

129. Douglass HO Jr, Moertel CG, Mayer RJ. Survival after postoperative combination treatment of rectal cancer. *N Engl J Med* 1986; (20) 315-327.

130. Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S. Results of the phase III Trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *J Clin Oncol*, 2010; 28:1638-1644.

131. Matheme H, Pahlman L, Glimelius B. Prognosis after surgery in patients with incurable rectal cancer: A population-based study. *Br J Surg* 1996; 83(8):1116-1120.

132. Assersohn L, Worman A, Cunningham D. Influence of metastatic site as an additional predictor for response and outcome in advanced colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 79(11-12):1800-1805.

133. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis RD, Eisner MP, Stinchcomb /csr/1975_2006/.

134. Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1986; 1:1479-1482

135. Kapiteijn E, Marijnen CAM, Colenbrander ACI. Local recurrence in patients with rectal cancer diagnosed between 1988 and 1992: a population-based study in the west Netherlands. *Eur J Surg Oncol* 1998; 24:528-535

136. Bosset JF, Collette L, Calais G. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *New Engl Med* 2006; 355:1114-1123.

-
137. Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouchet O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, Untereiner M, Leduc B, Francois E, Maurel J, Bedenne L. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol* 2006; 24:4620–4625.
138. Glynne-Jones R, Dunst J, Sebag-Montefiore D: The integration of oral capecitabine into chemoradiation regimens for locally advanced rectal cancer: how successful have we been? *Ann Oncol* 2006, 17:361-371.
139. Rodel C, Anorld D, Hipp MI. Phase I-II trial of cetuximab, capecitabine, oxaliplatin, and radiotherapy as preoperative treatment in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*2008;70:1081-1086.
140. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittenkind C, Fiedcau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidwenger H, Raab R. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351:1731–1740.
141. Hiotis SP, Webwe SM, Cohen AM, Minsky BD, Paty PH, Guillem J, Wagman R, Saltz LB, Wong WD. Assessing the predictive value of clinical complete response to neoadjuvant therapy for rectal cancer: An analysis of 488 patients. *J Am Coll Surg* 2002; 194:131-136.
142. Chen CC, Lee RC, Lin JK, Wang LW, Yang SH. How accurate is magnetic resonance imaging in restaging rectal cancer in patients receiving preoperative combined chemoradiotherapy? *Dis Colon Rectum.* 2005; 48:722–728.
143. Rau B, Hunerbein M, Barth C. Accuracy of endorectal ultrasound after preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. *Surg Endosc.* 1999; 13:980–984.
144. Hoffmann KT, Rau B, Wust P. Restaging of locally advanced carcinoma of the rectum with MR imaging after preoperative radio-chemotherapy plus regional hyperthermia. *Strahlenther Onkol* 2002; 178:386–392.

145. Oku S, Nakagawa K, Momose T. FDG-PET after radiotherapy is a good prognostic indicator of rectal cancer. *Ann Nucl Med* 2002; 16:409–416
146. Wieder H, Ott K, Zimmermann F. PET imaging with [¹¹C]methyl Lmethionine for therapy monitoring in patients with rectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29:789–796.
147. Calvo FA, Domper M, Matute R. ¹⁸F-FDG positron emission tomography staging and restaging in rectal cancer treated with preoperative chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58:528–535.
148. Schiepers C, Haustermans K, Geboes K. The effect of preoperative radiation therapy on glucose utilization and cell kinetics in patients with primary rectal carcinoma. *Cancer* 1999; 85:803–811.
149. Guillem JG, Puig-La Calle J Jr, Akhurst T, Ticko S, Ruo L, Minsky BD, Golluv MJ, Paty PB, Macapinlac H, Elsak L, Fink R, Hum J, Cohem AM, Larson S. Prospective assessment of primary rectal cancer response to preoperative radiation and chemotherapy using 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Dis Colon Rectum* 2000; 43:18–24.
150. Capirci C, Rubello D, Chierichetti F. Restaging after neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal adenocarcinoma: role of F18-FDG PET. *Biomed Pharmacother* 2004; 58:451–457.
151. Brucher BL, Weber W, Bauer M. Neoadjuvant therapy of esophageal squamous cell carcinoma: response evaluation by positron emission tomography. *Ann Surg* 2001; 233:300–309.
152. Flamen P, Van Cutsem E, Lerut A. Positron emission tomography for assessment of the response to induction radiochemotherapy in locally advanced oesophageal cancer. *Ann Oncol* 2002; 13:361–368.
153. Jones DN, McCowage GB, Sostman HD. Monitoring of neoadjuvant therapy response of soft-tissue and musculoskeletal sarcoma using fluorine-18-FDG PET. *J Nucl Med* 1996; 37: 1438–1444.

-
154. Weber WA, Ott K, Becker K. Prediction of response to preoperative chemotherapy in adenocarcinomas of the esophagogastric junction by metabolic imaging. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3058–3065.
155. Smith IC, Welch AE, Hutcheon AW. Positron emission tomography using [(18)F]-fluorodeoxy-D-glucose to predict the pathologic response of breast cancer to primary chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18:1676–1688.
156. Schelling M, Avril N, Nahrig J. Positron emission tomography using [(18)F]Fluorodeoxyglucose for monitoring primary chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18:1689–1695.
157. Koike I, Ohmura M, Hata M,. FDG-PET scanning after radiation can predict tumor regrowth three months later. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57:1231–1238.
158. Moehler M, Dimitrakopoulou-Strauss A, Gutzler F, Raeth U, Strauss LG, Stremmel W. 18F-labeled fluorouracil positron emission tomography and the prognoses of colorectal carcinoma patients with metastases to the liver treated with 5-fluorouracil. *Cancer* 1998; 83:245-53.
159. Price P, Jones T. Can positron emission tomography (PET) be used to detect subclinical response to cancer therapy? The EC PET Oncology concerted Action and the EORTC PET Study Group. *Eur J Cancer*. 1995; 31:1924-1927.
160. Anderson GS. FDG positron emission tomography in the surveillance of hepatics tumors treated with radiofrecuency ablation. *Clin Nucl Med*. 2003; 28:192-197.
161. Palma P, Conde Muiño R, Rodriguez-Fernández A., Segura-Jiménez I., Sánchez Sanchez R., Martín Cano, J., Manuel Gómez Rio, Ferrón JA, Llamas Elvira JM. The value of metabolic imaging to predict tumour response after chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Radiation Oncology* 2010 15;5:119.
-

162. Janjan NA, Khoo VS, Abbruzzese J, Pazdur R, Dubruw R, Cleary KR, Allen PK, Lynch PM, Guber G, Wholff R, Richt TA, Skibber J. Tumor downstaging and sphincter preservation with preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer: The M.D. Anderson Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44:1027-1038.

163. Theodoropoulos G, Wise WE, Padmanabhan A, Kerrner BA, Taylor CW, Aguilar PS, Khanduja KS. T-level downstaging and complete pathologic response after preoperative chemoradiation for advanced rectal cancer result in decreased recurrence and improved disease-free survival. *Dis Colon Rectum* 2002;45:895-903.

164. Guillem JG, Moore T, Akhurst T. Sequential FDG-PET imaging for detecting subclinical rectal cancer response to preoperative combined modality therapy. *J Am Coll Surg* 2004; 199:1–7.

165. Capirci C, Rampin L, Erba PA. Sequential FDG-PET/CT reliability predicts response of locally advanced rectal cancer to neoadjuvant chemo-radiation therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34:1583–1593.

166. Kalff V, Duong C, Drummond EG. Findings on 18F-FDG PET scans after neoadjuvant chemoradiation provides prognostic stratification in patients with locally advanced rectal carcinoma subsequently treated by radical surgery. *J Nucl Med* 2006; 47:14–22.

167. Konski A, Li T, Sigurdson E. Use of molecular imaging to predict clinical outcome in patients with rectal cancer after preoperative chemotherapy and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74:55-59.

168. Cascini GL, Avallone A, Delrio P. 18F-FDG PET is an early predictor of pathologic tumour response to preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. *J Nucl Med* 2006; 47:1241–1248.

169. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, Roussel A, Jacob JH, Segol P, Samama G. Pathologic assessment of tumor

regression after preoperative chemoradiation therapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994;73:2680-2686.

170. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorect Dis* 1997 12: 19–23.

171. Phimister B. The chipping forecast vol 1. *Nature Genetics* 1999. Vol 21. 60 pags.

172. Phimister B. The chipping forecast II. *Nature Genetics* 2002. Vol 32. 92 pags.

173. Barrero PR. Aplicaciones de la técnica de microarrays en ciencias biomédicas: presente y futuro. *Química viva*. 2005, 3: 91-100.

174. Phimister B. The chipping forecast III. *Nature Genetics* 2005. Vol 37. 45 pags.

175. The Gene Expression Omnibus (GEO): A Gene Expression and Hybridization Repository. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

176. Microarrays: chipping away at the mysteries of science and medicine. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html#microarrays>

177. Miller LD, Long PM, Wong L, Mukherjee S, McShane LM, Liu T. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell* 2002; 2: 353-361.

178. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.

179. Pinkel D, Segev R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207-211.

180. Goulb TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531-537.
181. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-511.
182. Ship MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC . Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8: 68-74.
183. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R. Aas T, Geisler S, Johnsen H. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-10874.
184. Sotiriou C, Powles TJ, Dowsettt M, Jazaeri AA, Feldman AL, Assersohn L, Gadisetti C, Libutti SK, Liu ET. Gene expression profiles derived from needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4: R3.
185. Chen X, Cheung ST, So Samuel, Fan S, Barry C. Higgins J, Lai K, Ji K, Dudoit S, Ng IOL, Van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 2002, 13:1929-1939.
186. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; 1: 133-143.
187. Ferrrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002; 1: 75-87.

188. Garber MED, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M . Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13784-13789.

189. Virtanen C, Honjoh D, Kimura M, Shimane M, Miyoshi T, Nomura H. Integrated classification of lung tumors and cell lines by expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12357-12362.

190. Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behaviour. *Cancer Cell* 2002;21:114-1123.

191. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Lloriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero J-R, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histochlinical parameters. *Oncogene* 2004, 23: 1377-1391.

192. Bandrés E, Malumbres R, Cubedo E, Honorato B, Zarate R, Labarga A, Gabisu U, Sola JJ, García-Foncillas J. A signature of 8 genes could identify the risk of recurrence and prtogression in Duke's B colon cancer patients. *Oncology Reports* 2007, 17: 1089-1094.

193. Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, Tanaka T, Yamamoto Y, Shirane M, Muto T, Nagawa H. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res* 2006; 66: 3370-3374.

194. Tusher V, Tibshirani R, Chu C. Significance analysis of microarrays applied to ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001.24; 98(9):5116-5121.

-
195. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
196. Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W. Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-term results. *Ann Surg* 2004; 240:711-8.
197. EORTC Radiotherapy Group: Phase III Randomized Study of preoperative Radiotherapy with or without 5FU combined with leucovorin and/or postoperative 5FU in patients with resectable adenocarcinoma of the rectum, EORTC-22921, Clinical Trial. 2005.
198. Hyams C, Mamounas H. A clinical trial to evaluate the worth of preoperative multimodality therapy in patients with operable carcinoma of the rectum: a progress report of NSABP R-03. *Dis Colon Rectum* 1997 40(2):131-139.
199. Miller LD, Long PM, Wong L, Mukherjee S, McShane LM, Liu ET. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell* 2002; 2: 353-361.
200. Cigudosa JC, The microarray revolution in biomedical research: types of platforms, uses and perspectives in oncology *Programas de Biotecnología y Patología Molecular*. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. 2004;27(1):11-20.
201. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207-211.
202. Ship MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8: 68-74.

203. Sotiriou C, Powles TJ, Dowsett M, Jazaeri AA, Feldman AL, Assersohn L. Gene expression profiles derived from needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002.

204. Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Mocellin S, Perez-Diez A, Petersen D. Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. *Cancer Res* 2002; 62: 3581-3586.

205. Van 't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer, *Nature*, 2002; 415: 530–536.

206. Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA. Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: A multi-site, blinded validation study, *Nat Med*, 2008; 14: 822–827.

207. Chung CH, Parker JS, Karaca G. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression, *Cancer Cell* 5 (2004), pp. 489–500.

208. Bild AH, Yao G, Chang JT. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies, *Nature*, 2006; 439: 353–357.

209. Asociación Española contra el cancer (AECC) (2011). Disponible en <http://www.muchoxvivir.org/index.jsp?seccion=34>.

210. Lexe G, Monaco J, Doyle S, Basavanhally A, Reddy A, Seiler M, Ganesan S, Bhanot G, Madabhushi A. Towards improved cancer diagnosis and prognosis using analysis of gene expression data and computer aided imaging. *Exp Biol Med* 2009 Aug;234(8): 860-879.

211. Cuadros M, Llanos A. Validez clínica y analítica de MammaPrints® en tratamiento del cáncer de mama: una revisión sistemática. *Medicina Clínica* 2011;136(14):627-632.

212. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, Lopez-Doriga A, Santos C, Marijnen C, Westerga J, Bruin S, Kerr D, Kuppen P, Van

de Velde C. Gene expression profiling identifies high risk colon cancer risk. 2011;29(1):17-24.

213. Salazar R. *Anales de Oncología* 2009, Suplemento 7; vii16 .

214. Saw RP, Morgan M, Koorey D, Painter D, Findlay M, Stevens G, Clarke S, Chapair P, Sadm MJ. p53, deleted in colorectal cancer gene, and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2003; 46:192–202.

215. Pasche B, Mulcahy M, Benson AB. Molecular markers in prognosis of colorectal cancer and prediction of response to treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16:331–345.

216. Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Porr AI, Kirsch I, Kim G, Klein P, Jonston PG, Wolmark N. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol* 2003; 21:241–250.

217. Okonkwo A, Musunuri S, Talamonti M, Benson A 3rd, Small W Jr, Stryker SJ, Rao MS. Molecular markers and prediction of response to chemoradiation in rectal cancer. *Oncol Rep* 2001; 8:497–500.

218. Spitz FR, Giacco GG, Hess K, Larry L, Rich TA, Janjan N, Cleary KR, Skibber JM p53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1685–1690.

219. Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999, 286: 531-537.

220. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johansen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A,

Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.

221. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C, Aranes MJ, Lesser M, Schwartz EL, Augenlicht LH. Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res* 2003, 63: 8791-8812.

222. Vlems FA, Diepstra JHS, Cornelissen IMHA, Ruers TJM, Ligtenberg MJL, Punt CJA, van Krieken JHJ, Wobbles Th, van Muijen GNP. Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: expression in controls and downregulation in tumour tissue. *Mol Pathol* 2002; 55: 156-163.

223. Inoue Y, Shirane M, Miki C, Hiro J, Tanaka K, Kobayashi M, Mori K, Yanagi H, Kusunoki M. Gene expression profiles of colorectal carcinoma in response to neo-adjuvant chemotherapy. *Int J Oncol* 2004; 25 (6): 1641-1649.

224. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Füzesi L, Langer C, Becker H, Liersch T, Ried T. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005; 23 (9): 1826-1838

225. Ogawa K, Murayama S, Mori M. Predicting the tumor response to radiotherapy using microarray analysis (Review). *Oncology Reports* 2007; 18: 1243-1248.

226. DePrimo SE, Wong LM, Khattry DB, Nicholas SL, Manning WC, Smolich BD, O'Farrell A-M, Cherrington JM. Expression profiling of blood samples from an SU5416 phase III metastatic colorectal cancer clinical trial: a novel strategy for biomarker identification. *BMC Cancer* 2003; 3:3,1-12.

227. Findeisen P, Röckel M, Nees M, Röder C, Kienle P, von Knebel Doeberitz M, Kalthoff H, Neumaier M. Systematic identification and validation of candidate

genes for detection of circulating tumor cells in peripheral blood specimens of colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 2008; 33: 1001-1010.

228. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC; Folletie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1675-1680.

229. Champelovier P, Mongelard F, Seigneurin D. CK20 gene expression: technical limits for the detection of circulating tumor cells. *Anticancer Res* 1999; 19: 2073-2078.

230. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Loriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero J-R, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histochlinical parameters. *Oncogene* 2004; 23: 1377-1391.

231. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22:529–536.

232. Kim IJ, Lim S-B, Kang HC, Lee TH, Jeany YJ. Microarray gene expression profiling for predicting complete preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis colom rectum*, 2007; 50: 1-12.

233. Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AI, Theisen J, Mageo J, Becker K, Nekarda H, Rosemberg R, Jansen K, Siewert JR. Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008; 6: 53-61.

234. Ojima E, Inoue Y, Miki C, Mor M, Kusunoki M. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal cancer to preoperative radioterapy. *J. Gastroenterol* 2007; 42: 730-736.

-
235. Daemen A, Geavert O, De Bie, T, et al. Integrating microarray and proteomics data to predict the response on cetuxmab in patients with rectal cancer. *Pacific symposium on Biocomputing*, 2008; 13: 166.
236. Yen CC, Ling SC, Jong YJ, Lin CH, Chen YM, Wu YC, Su WC, Huang CY, Tseng SW, Whang-Peng J. Chromosomal aberration of malignant pleural effusions of lung adenocarcinoma: different cytogenetic changes are correlated with genders and smoking habits. *Lung Cancer* 2007; 57: 292-301.
237. Beser AR, Tuzlali S, Guzey D, Dolek Guler S, Hacıhanefioglu S, Dalay N. HER-2, TOP2A and chromosome 17 alterations in breast cancer. *Pathol Oncol Res* 2007; 13: 180-185.
238. Levin AM, Machiela MJ, Zuhlke KA, Ray AM, Cooney KA, Douglas JA. Chromosome 17q12 variants contribute to risk of early-onset prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6492-6495.
239. Raidl M, Pirker C, Schulte-Hermann R, Aubele M, Kandioler-Eckersberger D, Wrba F, Micksche M, Berger W, Grasl-Kraupp B. Multiple chromosomal abnormalities in human liver (pre)neoplasia. *J Hepatol* 2004; 40:660-668.
240. Buganim Y, Goldstein I, Lipson D, Milyavsky M, Polar-Charcon S, Mardoukh C, Solomon H, Kalo E, Madar S, Brosh R, Perelman M, Navon R, Goldfinger N, Barshack I, Yakhini Z, Rotter V. A novel translocation breakpoint within the BPTF gene is associated with a pre-malignant phenotype. *PLOS One* 2010,5 (3): e9657: 1-12.
241. Fairhurst AM, Connolly JE, Hintz KA, Goulding NJ, Rassias AJ, Yeager MP, Rugby W, Wallace PK. Regulation and localization of endogenous human tristetraprolin. *Arthritis Research & Therapy* 2003; 5 (4): 214-225.
242. Ciais D, Cherradi N, Bailly S, Grenier E, Berra E, Pouyssegur J, LaMarre J, Feige JJ. Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene* 2004; 23: 8673-8680.

243. Datta S, Biswas R, Novotny , Pavicic Jr PG., Herjan T, Mandal P, Hamilton TA. Tristetraprolin regulates cxcl1 (KC) mRNA stability. *J Immunol* 2008, 180: 2545-2552.
244. Sandler H, Stoecklin G. Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraprolin. *Biochem Soc Trans* 2008; 36: 491-496.
245. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
246. Essafi-Benkhadir K, Ornesto C, Stebe E, Moroni C, Pagès G. Tristetraprolin inhibits Ras-dependent tumor vascularization by inducing vascular endothelial growth factor mRNA degradation. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 4648-4658.
247. Carrick DM, Blackshear PJ. Comparative expression of tristetraprolin (TTP) family members transcripts in normal human tissues and cancer cell lines. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462: 278-285.
248. Lee HH, Son YJ, Lee WH, Park YW, Chae SW, Cho WJ, Kim YM, Choi H-J, Choi DH, Jung SW, Min YJ, Park SE, Lee BJ, Cha HJ, Park JW. Tristetraprolin regulates expression of VEGF and tumorigenesis in human colon cancer. *Int J Cancer* 2010; 126: 1817-1827.
249. Hsieh JJ, Zhou S, Chen L, Young DB, Hayward SD. CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 23-28.
250. Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signalling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 2003; 22: 6598-6608.
251. Kim KC, Geng L, Huang S. Inactivation of a histone methyltransferase by mutations in human cancers. *J Cancer Res* 2003; 63: 7619-7623.

252. Huang S. The retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene RIZ in 1p36-linked cancers. *Front Biosci* 1999; 4: 528-532.
253. He L, Yu JX, Buyse IM, Wang MS, Yang QC, Nakagawara A, Brodeur GM, Shi YE, Huang S. RIZ1 but not the alternative RIZ2 product of the same gene is underexpressed in breast cancer, and forced RIZ1 expression causes G₂-M cell cycle arrest and/or apoptosis. *Cancer Res* 1998; 58: 4238-4244.
254. Jiang G-L, Liu L, Buyse I, Simon D, Huang S. Decreased RIZ1 expression but not RIZ2 in hepatoma and suppression of hepatoma tumorigenicity by RIZ1. *Int.J.Cancer* 1999; 83: 541-547.
255. Chadwick RB, Jiang GL., Bennington GA, Yuan B, Johnson CK, Stevens MW, Niemann TH, Peltomaki P, Huang S, de la Chapelle A. Candidate tumor suppressor RIZ is frequently involved in colorectal carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 2662-2667.
256. Pan KF, Lu YY, Liu WG, Zhang L, You WC. Detection of frameshift mutations of RIZ in gastric cancers with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2004; 10 (18): 2719-2722
- 257 Yu FX, Johnston P.A, Sudhof TC, Yin HL. gCap39, a calcium ion- and polyphosphoinositide-regulated actin capping protein. *Science* 1990; 250: 1413-1415.
258. Prendergast GC, ZIF EB. Mbh 1: a novel gelsolin/severin-related protein which binds actin in vitro and exhibits nuclear localization in vivo. *EMBO J* 1991; 10:757-766.
259. Dabiri GA, Young CL, Rosenbloom J, Southwick FS. Molecular cloning of human macrophage capping protein cDNA. A unique member of the gelsolin/villin family expressed primarily in macrophages. *J Biol. Chem.* 1992; 267: 16545-16552

-
260. Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, Stergiopoulos N, Yin H.L, Hayoz D. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2614-2623
261. Nomura H, Uzawa K, Ishigami T, Kouzu Y, Koike H, Ogawara K, Siiba M, Bukawa H, Yokoe H, Kubosawa H, Tanzawa H. Clinical significance of gelsolin-like actin-capping protein expression in oral carcinogenesis: an immunohistochemical study of premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *BMC Cancer* 2008; 8:39: 1-8.
262. Watari A, Takaki K, Higashiyama S, Li Y, Satomi Y, Takao T, Tanemura A, Yamaguchi Y, Katayama I, Shimakage M, Miyashiro I, Takami K, Kodama K, Yutsudo M. Suppression of tumorigenicity, but not anchorage independence, of human cancer cells by new candidate tumor suppressor gene CapG. *Oncogene* 2006; 25: 7373-7380.
- 263 Kendirgi F, Rexer DJ, Alcázar-Román AR, Onishko HM, Wentz SR. Interaction between the shuttling mRNA export factor Gle1 and the Nucleoporin hCG1: a conserved mechanism in the export of Hsp70 mRNA. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4304-4315.
264. Banerjee A, Feakins R.M, Nickols C.D, Phillips S.M, Powar M.P, Bustin S.A, Dorudi S. Immunogenic Hsp-70 is overexpressed in colorectal cancers with high-degree microsatellite instability. *Diseases of the Colon and Rectum* 2005; 48 (12): 2322-2328.
265. Demaria S, Formenti SC. Sensors of ionizing radiation effects on the immunological microenvironment of cancer. *Int J Radiat Biol* 2007; 83 (11-12): 819-825.
266. Lorimore SA. Coates PJ, Scobie GE, Milne G, Wright EG: Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects?. *Oncogene* 2001; 20 (48):7085-7095.

267. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigarena S, Ryllel B, Barrat FJ, Safting P: Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007; 13 (9):1050-1059.

268. Nesslinger NJ, Sahota RA, Stone B, Johnson K, Chima N, King C, Rasmussen D, Bishop D, Rennie PS, Gleave M. Standard treatments induce antigen-specific immune responses in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008, 13(5):1493-1502.

269. Schaeue D, Comin-Anduix B, Ribas A, Zhang L, Goodglick L, Sayre JW, Debucquoy A, Haustermans K, McBride WH: T-cell responses to surviving in cancer patients undergoing radiation therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14(15):4883-4890.

270. Molling JW, Langius JA, Langendijk JA, Kemans CR, Bontkess HJ, VanderVliet HJ, Van Blanger BM Low levels of circulating invariant natural Killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 2007; 25: 862-868.

271. Kitayama J, Yasuda K, Kawai K, Sunami E, Nagawa H. Circulating lymphocyte is an important determinant of the effectiveness of preoperative radiotherapy in advanced rectal cancer. *BMC Cancer* 2011; 11:64-83.

ANEXOS

IXI.-ANEXOS

ANEXO I

DOCUMENTO INFORMATIVO DE PARTICIPACION EN ESTUDIO CLINICO

Redactado según el Real Decreto 561/1993 de 16 de abril, BOE de 13 de mayo de 1993, y teniendo en consideración los requerimientos establecidos en la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (*LOPD 15/1999 de 13 de diciembre, BOE de 14 de diciembre de 1999*).

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE RESPUESTA TUMORAL AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CARCINOMA DE RECTO

Objetivos del proyecto:

El objetivo de este estudio es encontrar marcadores genéticos y de imagen que nos permitan detectar que los pacientes con neoplasia de recto responden al tratamiento con radio-quimioterapia. Mediante estos marcadores se podrá en un futuro adaptar estos largos y costosos tratamientos a los distintos pacientes con el objetivo final de mejorar los resultados oncológicos.

Metodología:

El estudio se realizará mediante análisis por chip de la expresión génica de biopsias en pacientes con neoplasia maligna de recto a los que por su estadio se les recomiende recibir tratamiento con radio-quimioterapia antes de la cirugía. Se analizará también sangre periférica. Paralelamente se comparará el PET-TAC realizado para la estadificación con un segundo inmediatamente realizado antes de la intervención quirúrgica.

La participación en el estudio, como paciente, consiste en la toma de biopsias del recto y de sangre periférica. Las biopsias serán tanto del tumor como de la zona no tumoral del recto. Se tomarán antes y después de la radioquimioterapia. Las anteriores se realizarán junto con la ecografía endorectal y las posteriores se tomarán de la pieza quirúrgica resecada.

Las muestras sólo y exclusivamente se utilizarán para el estudio de este proyecto.

Los resultados obtenidos en el estudio no podrán ser utilizados más que con el fin de profundizar en el conocimiento científico del objetivo de trabajo.

Beneficios esperados y Riesgos Potenciales:

No hay ningún riesgo descrito en las tomas de biopsias ni en la extracción de sangre.

Voluntariedad en la Participación:

La negativa a participar en este estudio NO tiene ninguna repercusión en la atención médico-quirúrgica que se necesita.

La participación en este estudio es absolutamente VOLUNTARIA y, en cualquier momento del estudio, puede interrumpirse a voluntad del participante.

Confidencialidad:

La información de este estudio es CONFIDENCIAL y solamente será utilizada a efectos de publicaciones científicas.

Sección de Coloproctología

Servicio de Cirugía General y Ap. Digestivo

ANEXO II**CONSENTIMIENTO INFORMADO****PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE RESPUESTA TUMORAL AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CARCINOMA DE RECTO

Objetivos del proyecto:

Encontrar marcadores genéticos y de imagen que nos permitan detectar que pacientes con neoplasia de recto responden al tratamiento con radioquimioterapia antes de la resección quirúrgica. Mediante estos marcadores se podrá en un futuro adaptar estos tratamientos a los distintos pacientes con el objetivo final de mejorar los resultados oncológicos.

D./D^a. _____ **con D.N.I. nº** _____

de _____ **años de edad, con domicilio en**

Nº. Historia Clínica:

DECLARO:

Que el Dr./Dra. _____ **me ha explicado que por mi proceso neoplásico de localización rectal, soy susceptible de recibir tratamiento con radio-quimioterapia antes de la intervención quirúrgica y**

CONSIENTO:

Participar en el estudio en el que se me van a extraer biopsias del tumor rectal y zona adyacente antes de la radio-quimioterapia. Estas biopsias se repetirán una vez resecada la pieza quirúrgica. Se me extraerán 20 ml. de sangre periférica durante la extracción de las biopsias pre-terapéuticas y durante la intervención quirúrgica.

Se me comunica que no hay descritos en la literatura científica efectos negativos por las biopsias, toma de sangre o técnicas realizada.

Si por alguna razón lo deseo, puedo rechazar que se me tome una biopsia o extraiga sangre en cualquier momento del proceso.

La información de este estudio será confidencial y solamente usada a efectos de publicaciones científicas.

**Fdo.: El Paciente /o Representante Legal
Médico**

Fdo.: El

