

# **PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA**



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

*Tesis doctoral*



## **Estudio de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia y su relación con el desarrollo y pronóstico de cáncer colorrectal**

Memoria presentada por Don **Francisco José García Verdejo** para optar a la  
mención de Doctor por la Universidad de Granada

Director: Dr. Juan Sainz Pérez  
Director: Dr. Pedro Sánchez Rovira

**Granada, 2024**



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Francisco José García Verdejo  
ISBN: 978-84-1195-710-6  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/102618>

*Los grandes logros requieren  
trabajo y perseverancia,  
pero es la sabiduría de quienes nos inspiran  
lo que realmente nos impulsa hacia el éxito.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de investigación que me ha permitido finalizar mi tesis doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional, la guía y la inspiración de varias personas. A todas ellas les doy las gracias por formar parte de mi vida.

Gracias a mis amigos y compañeros, especialmente a Fernando Gálvez, José Antonio López y Carmen González, por el apoyo que nos hemos dado durante estos años para conseguir avanzar en nuestras tesis y poder llegar a nuestro objetivo.

Gracias a mi hermano Pedro Pablo y gracias a mis padres, Pedro Pablo y Gloria Josefa, por permitirme ser médico, creer en mí desde el principio y darme todo el apoyo posible para conseguir mis metas. Ojalá pueda ser igual con mis tres hijas.

Gracias a mis hijas, María, Gloria y Paula, porque habéis sido la calma, la risa, la alegría y el descanso durante el trabajo. Vuestra inocencia y amor incondicional han hecho que el camino de esta tesis sea más llevadero y, junto con vuestra madre, siempre me habéis recordado lo que realmente importa.

Gracias a mi esposa, María, por estar a mi lado, por comprenderme e inspirarme, por sacrificar tu tiempo por mí para terminar este proyecto. Tu apoyo es lo más importante de mi vida y, como siempre, has estado ahí en todo momento.

Gracias a mi codirector y amigo, Pedro Sánchez Rovira, por confiar en mí desde que era residente y darme tantas oportunidades para crecer en lo personal y lo profesional. Esta tesis es, en gran parte, el resultado de tu orientación y de la fe que has depositado en mí desde el comienzo.

Gracias a mi director, Juan Sainz Pérez, por ser una persona que impulsa a los demás a crecer y alcanzar su máximo potencial. Conmigo lo has conseguido y estoy profundamente agradecido por tu ayuda constante. Esta tesis marca los comienzos de un largo camino que espero hacer contigo, como amigos y como compañeros de equipo en el campo de la investigación en oncología.



# *ÍNDICE*



|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ÍNDICE .....</b>                                                 | <b>9</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                | <b>15</b> |
| <b>RESUMEN.....</b>                                                 | <b>20</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                                           | <b>25</b> |
| <b>1. CÁNCER.....</b>                                               | <b>27</b> |
| 1.1 CONCEPTO Y CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER .....                     | 27        |
| 1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER .....                                  | 28        |
| <b>2. CÁNCER COLORRECTAL.....</b>                                   | <b>29</b> |
| 2.1 CONCEPTO Y PATOGÉNESIS.....                                     | 29        |
| 2.2 EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.....                         | 33        |
| 2.3 DIAGNÓSTICO Y ESTADIAJE .....                                   | 35        |
| 2.4 HISTOLOGÍA.....                                                 | 40        |
| 2.5 CLASIFICACIÓN MOLECULAR.....                                    | 44        |
| 2.6 PRONÓSTICO .....                                                | 45        |
| 2.7 TRATAMIENTO .....                                               | 46        |
| <b>3. AUTOFAGIA.....</b>                                            | <b>53</b> |
| 3.1 CONCEPTO.....                                                   | 53        |
| 3.2 BASE MOLECULAR DE LA AUTOFAGIA.....                             | 54        |
| 3.2.1 <i>Las proteínas ATG</i> .....                                | 54        |
| 3.2.2 <i>El proceso de la autofagia</i> .....                       | 56        |
| 3.2.2.1 La inducción de la autofagia.....                           | 56        |
| 3.2.2.2 El ensamblaje y la formación del autofagosoma .....         | 59        |
| 3.2.2.3 Acoplamiento y fusión del autofagosoma con lisosomas.....   | 60        |
| 3.3 ENFERMEDADES NO ONCOLÓGICAS RELACIONADAS CON LA AUTOFAGIA ..... | 62        |
| <b>4. LA AUTOFAGIA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER .....</b>            | <b>66</b> |
| 4.1 LA AUTOFAGIA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER COLORRECTAL .....      | 67        |

|                                                                                                                                             |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>HIPÓTESIS .....</b>                                                                                                                      | <b>71</b>  |
| <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                      | <b>76</b>  |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>                                                                                                              | <b>80</b>  |
| <b>1. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....</b>                                                                                                        | <b>82</b>  |
| <b>2. SELECCIÓN DE GENES Y SNPS, GENOTIPADO, ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN Y META-ANÁLISIS .....</b>                                               | <b>84</b>  |
| 2.1 SELECCIÓN DE GENES .....                                                                                                                | 84         |
| 2.2 GENOTIPADO Y ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN EN LA COHORTE DACHS.....                                                                            | 90         |
| 2.3 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS DE LA AUTOFAGIA CON EL RIESGO DE CCR, META-ANÁLISIS Y VALIDACIÓN .....               | 91         |
| 2.4. REPLICACIÓN: GENOTIPADO DE SNPs IMPUTADOS EN LAS COHORTES DE CORSA Y CCS .....                                                         | 92         |
| 2.5. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS DE LA AUTOFAGIA CON LA SG DE LOS PACIENTES CON CCR, META-ANÁLISIS Y VALIDACIÓN..... | 92         |
| <b>3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL.....</b>                                                                                                    | <b>93</b>  |
| 3.1 ASOCIACIÓN FUNCIONAL DE LAS VARIANTES RELACIONADAS CON LA AUTOFAGIA CON LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS .....                               | 93         |
| 3.2 CORRELACIÓN ENTRE LOS SNPs RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA Y LOS NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDES SÉRICAS.....                              | 95         |
| 3.3 CORRELACIÓN DE LOS SNPs DE LA AUTOFAGIA CON EL RECuento DE CÉLULAS SANGUÍNEAS Y EL PERFIL PROTEÓMICO SÉRICO/PLASMÁTICO .....            | 96         |
| 3.4 IMPACTO DE LAS VARIANTES RELACIONADAS CON LA AUTOFAGIA EN EL FLUJO DE AUTOFAGIA .....                                                   | 97         |
| 3.5 ANÁLISIS FUNCIONAL “IN SILICO” Y EQTL .....                                                                                             | 98         |
| <b>RESULTADOS .....</b>                                                                                                                     | <b>101</b> |
| <b>1. ASOCIACIÓN DE SNPS DE GENES DE AUTOFAGIA CON EL RIESGO A DESARROLLAR CCR.....</b>                                                     | <b>103</b> |

|                                                                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>2. META-ANÁLISIS DE LAS 4 COHORTES: REPLICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE SUSCEPTIBILIDAD.....</b>               | <b>104</b> |
| <b>3. ASOCIACIÓN DE SNPS EN <i>NRG3</i>, <i>TP73</i> Y <i>EGFR</i> CON EL RIESGO A DESARROLLAR CCR.....</b>    | <b>104</b> |
| <b>4. ASOCIACIÓN DE SNPS DE GENES DE AUTOFAGIA CON LA SG DE LOS PACIENTES CON CCR.....</b>                     | <b>105</b> |
| <b>5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL.....</b>                                                                       | <b>108</b> |
| 5.1 SUSCEPTIBILIDAD: FUNCIONALIDAD DE LA VARIANTE GENÉTICA EN EL GEN <i>DAPK2</i> ..                           | 108        |
| 5.2 SUSCEPTIBILIDAD: FUNCIONALIDAD DE LA VARIANTE GENÉTICA EN EL GEN <i>ATG5</i> .....                         | 108        |
| 5.3 SUPERVIVENCIA: FUNCIONALIDAD DE LAS VARIANTES EN LOS GENES <i>GRID2</i> , <i>UVRAG</i> Y <i>TP73</i> ..... | 110        |
| <b><i>DISCUSIÓN</i> .....</b>                                                                                  | <b>113</b> |
| <b><i>CONCLUSIONES</i> .....</b>                                                                               | <b>127</b> |
| <b><i>GLOSARIO</i> .....</b>                                                                                   | <b>131</b> |
| <b><i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....</b>                                                                               | <b>138</b> |
| <b><i>MATERIAL SUPLEMENTARIO</i>.....</b>                                                                      | <b>177</b> |



# ***ABSTRACT***



## **ABSTRACT**

Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent tumors and represents one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide. Despite advances in understanding the molecular biology of this tumor, which have led to improvements in diagnostic and therapeutic processes, the mortality rate remains high. This highlights the urgent need to further enhance our understanding of the molecular and genetic mechanisms underlying the carcinogenesis of this cancer type. Identifying and better understanding these processes is crucial for developing more effective prevention strategies and more personalized treatments.

Autophagy, a cellular catabolic process that allows the degradation and recycling of cellular components, is involved in the regulation of cellular homeostasis and the response to stress conditions. This mechanism has a dual role in the carcinogenesis process: on the one hand, it can prevent cellular damage that leads to malignant transformation, and on the other hand, especially in advanced stages of cancer, tumor cells can use this mechanism to survive under adverse conditions. In this context, and specifically in CRC, autophagy not only influences tumor formation and progression but may also impact the tumor's response to treatments, such as chemotherapy.

To determine the relationship between autophagy and CRC, our work focuses on identifying single nucleotide polymorphisms (SNPs) in autophagy-related genes and their association with susceptibility to develop CRC. Through a meta-analysis of genome-wide association study (GWAS) data from four large European cohorts, we investigated the influence of these variants on CRC risk. Understanding how these genetic variants may not only predispose to cancer development but also influence prognosis and treatment response would provide a framework for future therapeutic approaches.

We found a significant association between a specific genetic variant in the *DAPK2* gene and the risk of developing CRC. Carriers of the G allele of the *DAPK2*rs11631973 SNP showed increased susceptibility to developing the disease. Although the study did not observe a direct impact of this variant on autophagy flux, we found that the *DAPK2*rs11631973G allele was associated with interleukin-1 beta (IL1 $\beta$ ) levels after the stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with *Staphylococcus aureus*,

CD24+CD38+CD27+IgM+ B cell levels in blood and serum levels of en-RAGE, which suggested a possible connection between this gene and immune responses in genetically susceptible individuals.

The analysis of the *ATG5* gene revealed that the *ATG5*rs546456 variant was also associated with CRC risk. This variant appears to influence inflammatory responses, as evidenced by its correlation with levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and IL1 $\beta$  following stimulation of PBMCs with lipopolysaccharide (LPS) in carriers of the T allele. Additionally, this variant had an impact on the regulation of classical monocytes (CD14+CD16- cells) and serum levels of CCL19 and cortisol, which could be relevant in CRC development.

Finally, we also analyzed whether autophagy-related variants could influence overall survival (OS). Our results showed that genetic variants within the *TP73*, *UVRAG* and *GRID2* associated with OS of CRC patients. These results pointed to a role of these genes in determining disease progression and underlined their importance as potential therapeutic targets for CRC treatment.

In conclusion, this work highlights the importance of investigating the relationship between genetic variants in autophagy-related genes and CRC risk. The findings suggest that the *DAPK2* and *ATG5* loci may play a role in CRC pathogenesis through the modulation of host immune responses, which could have prognostic implications for patients. On the other hand, we found that the *TP73*, *UVRAG* and *GRID2* loci were associated with OS, which suggested that these genes might constitute potential new targets for disease treatment and patient management. According to these results, it seems to be interesting to continue working on this research line and to explore the therapeutic potential related to these molecular pathways in CRC.



# ***RESUMEN***



## RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores con mayor incidencia y representa una de las principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial. A pesar de los avances en el conocimiento de la biología molecular de este tumor que ha llevado a una mejora en los procesos diagnósticos y terapéuticos, la tasa de mortalidad sigue siendo alta, lo que implica la necesidad urgente de mejorar aún más nuestra comprensión de los mecanismos moleculares y genéticos que subyacen a la carcinogénesis de este tipo de cáncer. Identificar y comprender mejor estos procesos es crucial para desarrollar estrategias de prevención más eficaces y tratamientos más personalizados.

La autofagia, un proceso catabólico celular que permite la degradación y el reciclaje de componentes celulares, está involucrada en la regulación de la homeostasis celular y la respuesta a situaciones de estrés. Este mecanismo tiene una relación dual en el proceso de la carcinogénesis: por un lado, puede prevenir el daño celular que conduce a la transformación maligna y, por otro lado, sobre todo en etapas avanzadas del cáncer, las células tumorales pueden utilizar este mecanismo para sobrevivir a condiciones adversas. Con relación a esto y en el contexto del CCR, la autofagia no solo influye en la formación y progresión del tumor, sino que también podría impactar en la respuesta del tumor a los tratamientos, como la quimioterapia (QT).

Para determinar la relación entre la autofagia y el CCR, nuestro trabajo se centra en la identificación de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en genes relacionados con la autofagia y su relación con la susceptibilidad al desarrollo de CCR y el pronóstico de los pacientes. Mediante un meta-análisis de datos de estudios de asociación del genoma completo (GWAS) en cuatro grandes cohortes europeas, se investigó la influencia de estas variantes en el riesgo de CCR. Comprender cómo estas variantes genéticas podrían no solo predisponer al desarrollo del cáncer, sino también influir en el pronóstico y la respuesta a los tratamientos, proporcionaría un marco para futuros enfoques terapéuticos.

Encontramos una asociación entre determinadas variantes genéticas en el gen *DAPK2* y el riesgo de desarrollar CCR. Los portadores del alelo G de *DAPK2*rs11631973 mostraron una mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, posiblemente debido a la modulación

de respuestas inmunitarias del huésped. Aunque el estudio no observó un impacto directo de estas variantes sobre el flujo de autofagia, observamos una correlación entre el alelo G de *DAPK2*rs11631973 y los niveles de interleuquina-1 beta (IL1 $\beta$ ) tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con *Staphylococcus aureus*, el número de células B CD24+CD38+CD27+IgM+ circulantes y los niveles serológicos de en-RAGE. Estos datos sugerían una posible conexión entre el gen *DAPK2* y la respuesta inmune en individuos genéticamente susceptibles.

El análisis del gen *ATG5* reveló que la variante *ATG5*rs546456 también está asociada con el riesgo de CCR. Esta variante parece influir en las respuestas inflamatorias, como se evidenció por los niveles aumentados del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e IL1 $\beta$  tras la estimulación de PBMCs con lipopolisacárido (LPS) en portadores del alelo T. Además, se observó que esta variante podría tener un impacto en la regulación de ciertas subpoblaciones celulares (CD14+CD16-) y en los niveles de ciertas proteínas inflamatorias en suero (CCL19) y hormonas (cortisol), lo que podría ser relevante en la progresión del CCR.

Finalmente, el análisis del impacto de las variantes genéticas de la autofagia sobre el pronóstico de la enfermedad definido a través de la supervivencia global (SG) de los pacientes con CCR reveló que ciertos polimorfismos en los genes *TP73*, *UVRAG* y *GRID2* asociaban con la SG de los pacientes. Estos resultados sugieren la implicación de estos genes en los mecanismos que determinan la progresión de la enfermedad y ponen de relevancia su importancia como posibles dianas terapéuticas.

En definitiva, este trabajo destaca la importancia de investigar la relación entre las variantes genéticas en genes relacionados con la autofagia y el CCR. Los hallazgos sugieren que los loci *DAPK2* y *ATG5* podrían jugar un papel en la patogénesis del CCR a través de la modulación de las respuestas inmunitarias del huésped. Por otra parte, descubrimos que los loci *TP73*, *UVRAG* y *GRID2* se asociaban con la SG y, por tanto, con el pronóstico de los pacientes, lo que sugería que estos genes podrían constituir nuevas dianas potenciales para el tratamiento de la enfermedad y el manejo de los pacientes. Considerando estos datos, resulta fundamental seguir trabajando en esta línea de investigación y explorar el potencial terapéutico relacionado con la autofagia en CCR.



# ***INTRODUCCIÓN***

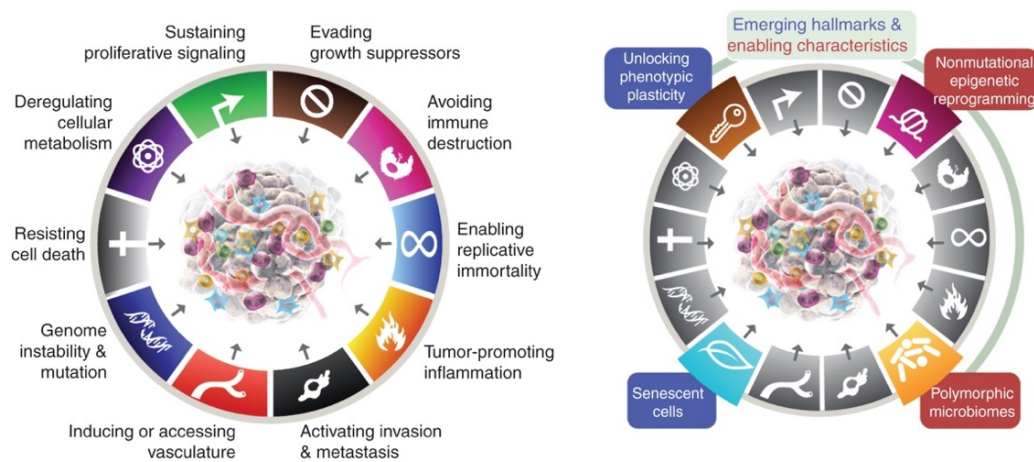


## INTRODUCCIÓN

### 1. CÁNCER

#### 1.1 Concepto y características del cáncer

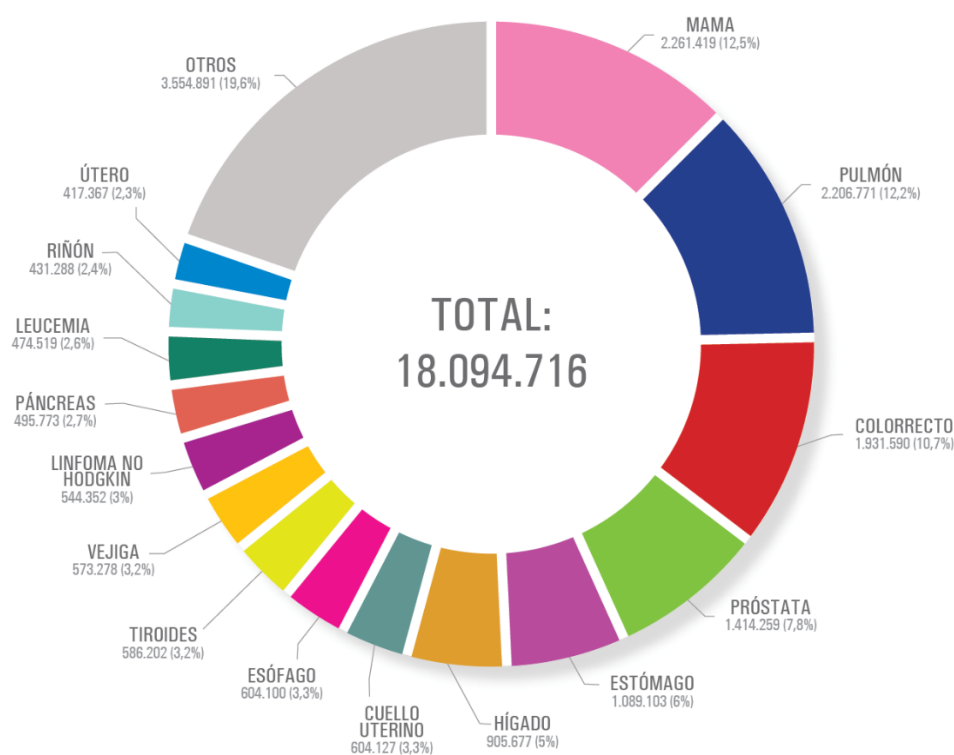
Comprender el cáncer implica conocer la complejidad y profundidad de los diferentes mecanismos y procesos biológicos que adquieren las células cuando pasan de la normalidad al crecimiento incontrolado neoplásico que conduce a la formación del tumor y las metástasis. Todos estos procesos no son comunes a todos los tumores, pero se han estudiado aquellos mecanismos o características subyacentes que podrían ser inherentes a la transformación neoplásica de las células humanas. Estas características propuestas son las siguientes: la capacidad adquirida para mantener una señal proliferativa continua, la capacidad para eludir los mecanismos de supresión tumoral, inducir la vascularización y la angiogénesis, el estado proinflamatorio, la inestabilidad genómica y mutacional, evitar la muerte celular, reprogramar el metabolismo celular, la inmortalidad replicativa, activar los mecanismos de invasión y metástasis y eludir el sistema inmunológico (Hanahan, 2022) (Figura 1). La comprensión y el estudio exhaustivo de estas características de conceptualización del cáncer ha permitido el desarrollo de numerosos fármacos, algunos de cuales han conseguido demostrar su eficacia contra diversos tipos de cáncer y se utilizan actualmente.



**Figura 1:** diferentes características propuestas que definen el cáncer (Hanahan, 2022).

### 1.2 Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las enfermedades que mayor impacto tiene en salud pública y constituye una de las principales causas de morbilidad en el mundo. En el año 2020 se diagnosticaron 18,1 millones de casos nuevos de cáncer y se estima esa cifra llegue a los 27 millones en el año 2040, lo que supondría un incremento de un 50% en 20 años. Los tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo en el año 2020 fueron mama, pulmón, colorrectal, próstata y estómago, con más de un millón de casos cada uno de ellos (Ferlay et al., 2021) (Figura 2).



**Figura 2:** Gráfico circular que representa los tumores más frecuentemente diagnosticados en el año 2020, independientemente del sexo.

*Fuente:* GLOBOCAN 2020. *Gráfico:* Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer 2022.

En España, el cáncer constituye igualmente una de las principales causas de morbimortalidad. El número de nuevos casos en 2022 fue de 280.000 y se espera que en el año 2040 supere los 340.000, lo que supone un incremento del 21% aproximadamente. Los cánceres más frecuentemente diagnosticados ese año en España han sido los de colon y recto (43.370 nuevos casos), mama (34.750), pulmón (30.948), próstata (30.884) y vejiga urinaria (22.295) (Guevara et al., 2022). En los últimos años, han existido importantes avances que permiten diagnosticar de forma precoz ciertos tipos de tumores. En definitiva, existe un screening más óptimo. Esto incrementa la incidencia de algunos tumores como el CCR, mama, cérvix y próstata, pero reduce la mortalidad al permitir un tratamiento curativo (Ladabaum et al., 2020). Otros factores que pueden explicar el aumento de la incidencia son el envejecimiento, el aumento poblacional y factores de riesgo carcinogénicos, tales como el tabaco o el alcohol.

## **2. CÁNCER COLORRECTAL**

### **2.1 Concepto y patogénesis**

El CCR consiste en una proliferación incontrolada de células en las paredes del intestino grueso. Estas paredes están formadas por glándulas productoras de moco llamadas criptas o glándulas de Lieberkühn. Este crecimiento celular dará lugar a la formación de un pólipo, que es una lesión precursora del cáncer y que evolucionará hacia cáncer en un periodo de aproximadamente 10 a 20 años. En la actualidad, se conoce que las células madre que se encuentran en las criptas son el origen del CCR y para que su evolución al cáncer se produzca, estas células sufren cambios genéticos y epigenéticos a lo largo del tiempo que concluyen en la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (R. Gupta et al., 2019).

La formación de CCR desde una lesión precursora o premaligna se produce por 3 vías diferentes: la formación adenoma – carcinoma (70-80% de los casos de CCR), la vía de la neoplasia serrada (10-20%) y la vía de la inestabilidad de microsatélites (3-7%) (Dekker et al., 2019). Como se ha dicho anteriormente, la mayoría de los tumores colorrectales surgen

de pólipos precancerosos llamados adenomas tubulares o pólipos serrados. En el colon se produce continuamente una renovación de las células que componen la mucosa intestinal y estos adenomas o pólipos se forman cuando se alteran los mecanismos moleculares que regulan el crecimiento y la proliferación celular. Esto hace que una renovación epitelial fisiológica pase a ser un proceso hiperproliferativo, adquiriendo características histológicas y genéticas que les confieren un potencial maligno con el paso del tiempo (Muleris et al., 2008). Conocer las 3 vías de formación del cáncer resulta de especial interés (Figura 3).

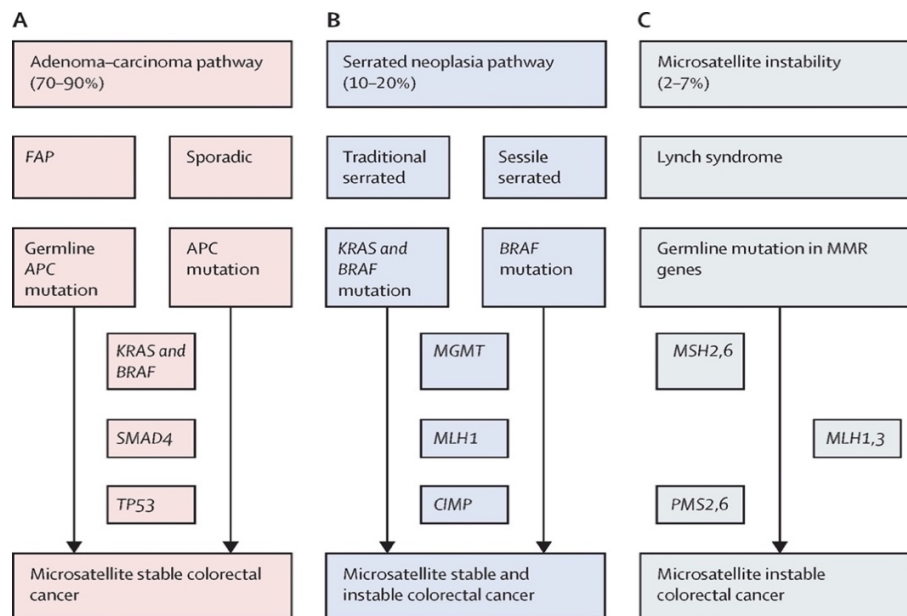
La vía adenoma – carcinoma también es conocida como secuencia de inestabilidad cromosómica al caracterizarse por defectos en la segregación cromosómica y es la causa del 70-80% del total de los cánceres colorrectales esporádicos (Grady & Carethers, 2008). Los tumores originados por esta vía son considerados no hipermutados. Sin embargo, en el 80% de los casos, existen mutaciones en los genes supresores de tumores *APC* y *TP53* y mutaciones activadoras en *RAS* y *PI3K* (Dariya et al., 2020). Todo esto permite la activación de la vía WNT, que es importante en la regulación de la proliferación de células endoteliales intestinales y cuya activación promueve la tumorigénesis (H. Zhao et al., 2022). La mutación germinal en *APC* causa la poliposis adenomatosa familiar (PAF), un síndrome caracterizado por la formación de cientos de pólipos en el intestino (Aghabozorgi et al., 2019). La mutación de *RAS* (*KRAS* o *NRAS*) también está presente en más del 40% de los cánceres colorrectales que surgen de esta vía. *RAS* es una proteína quinasa que forma parte de una conocida vía de señalización que comienza con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que cuando se activa, a su vez activa *RAS*-*RAF*-*MEK*-*ERK*-*mTOR*-*PI3K* y finalmente factores de transcripción como *NF-kB*, que promueven el crecimiento y la proliferación celular. Cuando existe una mutación en alguno de los genes que codifican estas proteínas, como *RAS*, se produce una activación constitutiva de esta vía. Es la causa de que tratamientos eficaces en CCR, como inhibidores de EGFR, no lo sean en pacientes con mutaciones de *RAS* (Chan et al., 2017; Janssens et al., 2023). Finalmente, el gen *TP53*, y su proteína *P53*, tiene un papel importante en la reparación de ácido desoxirribonucleico (ADN) y la mutación de este gen se encuentra frecuentemente en el CCR (X. L. Li et al., 2015).

La vía de inestabilidad de microsatélites (IMS) es la menos frecuente, pero tiene algunas características a destacar, como es la formación de cánceres colorrectales con alto

número de mutaciones de pares de bases (tumores hipermutados). Se produce como consecuencia de mutaciones en genes reparadores de ADN como son *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* y *EPCAM* que terminan produciendo inestabilidad genómica dentro de los microsatélites, que son secuencias de ADN de varios nucleótidos que se repiten a lo largo del ADN. Las mutaciones germinales de alguno de estos genes causan el conocido síndrome de Lynch, un síndrome hereditario caracterizado por la alta probabilidad de desarrollar CCR y cáncer de endometrio, entre otros tumores (De'angelis et al., 2018; Gelsomino et al., 2016). Conocer el estado de inestabilidad de los microsatélites es fundamental para determinar el pronóstico y el tratamiento de los pacientes con CCR. En la práctica clínica, la determinación se realiza por inmunohistoquímica o PCR y la pérdida de expresión de uno (IMS “bajo” o IMS-L) o dos o más marcadores (IMS “alto” o IMS-H) confirma el estado de IMS del tumor. Los pacientes con CCR estadio II con IMS tienen un excelente pronóstico y no se benefician del tratamiento adyuvante con fluoropirimidinas, y aquellos pacientes con CCR estadio IV con IMS se benefician ampliamente de la inmunoterapia, un tratamiento que ha cambiado el paradigma de la terapia tumoral (A. Fan et al., 2021).

La vía de la neoplasia serrada es la causante de un 10 al 20% del CCR, teniendo su origen en la formación de pólipos serrados (lesiones con formas de dientes de sierra). La forma principal de pólipos serrados son los pólipos hiperplásicos, que rara vez sufren transformación maligna, y la segunda forma más frecuente son los pólipos o adenomas serrados sésiles. Es importante destacar que, a través de esta vía serrada, la progresión de lesión precancerosa a CCR ocurre de forma rápida (3-5 años) y esto se explica por el mecanismo de carcinogénesis, que comparte características con la vía adenoma – carcinoma y la vía IMS (Crockett & Nagtegaal, 2019). Una de las características más destacables es la adquisición temprana de la mutación *BRAFV600E* en la mayor parte de los adenomas serrados, lo que permite la activación constitutiva de la vía MAPK-ERK que conduce a una proliferación celular incontrolada (Neary et al., 2018). Además, los tumores serrados se pueden transformar a CCR a través de dos rutas diferentes. Por un lado, los tumores serrados, con mutaciones en *BRAF*, pueden además adquirir mutaciones en *TP53* y activar otras vías oncogénicas como la señalización de WNT, la vía de señalización del factor de crecimiento

transformante beta (TFG  $\beta$ ) o la vía de la transformación epitelial a mesenquimal, todas ellas produciendo un CCR con un fenotipo estable (sin IMS). Por otro lado, la ruta o vía IMS, que se produce mediante la mutación en genes reparadores de microsatélites conduce a un CCR con fenotipo de IMS. A través de esta vía serrada, se produce con frecuencia la metilación en islas CpG (grupos de nucleótidos citosina/guanina), presentes en las regiones de unión a promotores, lo que conduce al silenciamiento de genes supresores como *MLH1*, que pueden promover la formación de CCR. El fenotipo CIMP (fenotipo metilador de islas CpG) puede ser alto o bajo en función del número de genes o marcadores metilados, habitualmente menor o mayor de tres. Se han identificado varios genes que puede estar metilados en CCR y, por tanto, se asocian con un fenotipo CIMP, que puede llegar a ser hasta un 20% del total de los cánceres colorrectales diagnosticados. El gen que más frecuentemente se metila es *MLH1* y la mutación más frecuente es la de *BRAF*, que explica el CCR esporádico con IMS (Bateman, 2014).



**Figura 3.** Las tres vías principales de formación de CCR desde una lesión precancerosa o premaligna: la formación adenoma – carcinoma (70-80% del CCR), la vía de la neoplasia serrada (10-20%) y la vía de la inestabilidad de microsatélites (3-7%) (Dekker et al., 2019).

En este apartado de patogénesis, es importante destacar la división entre colon derecho y colon izquierdo. La lateralidad del colon es tenida en cuenta por las diferencias moleculares, embrionarias, biológicas y anatómicas que hay entre el lado izquierdo del colon y el lado derecho. El colon tiene aproximadamente 150 cm de longitud y se extiende desde la válvula ileocecal hasta el ano. Se divide en: ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoide, recto y ano. Estas divisiones se basan en el origen embrionario del colon, y el CCR de lado derecho se considera ciego, colon ascendente y el transverso proximal, mientras que el CCR de lado izquierdo es el que se origina del transverso distal, colon descendente, sigmoide y recto. Los tumores del lado derecho suelen ser adenomas serrados sésiles o adenocarcinomas mucinosos, mientras que los tumores del lado izquierdo son, con mayor frecuencia, adenocarcinomas tubulares o vellosos (S. Y. Yang et al., 2018). Debido a su morfología polipoide, los tumores del lado izquierdo son más fáciles de detectar en etapas tempranas mediante colonoscopia.

También hay diferencias desde un punto de vista genómico, ya el CCR derecho muestra más frecuentemente inestabilidad de microsatélites, mientras que el CCR lado izquierdo son tumores con alta inestabilidad cromosómica. Todo ello tiene implicaciones pronósticas y terapéuticas. Las metástasis del CCR izquierdo suelen ser hepáticas y pulmonares, mientras que las del CCR derecho son, con mayor frecuencia, peritoneales. El pronóstico del CCR de lado derecho es peor que el CCR lado izquierdo, con una peor supervivencia (G. H. Lee et al., 2015; S. Y. Yang et al., 2018). Además, es un factor para tener en cuenta a la hora de seleccionar el tratamiento de la enfermedad metastásica, ya que los tumores del lado derecho sin mutaciones de RAS no parecen beneficiarse de las terapias anti-EGFR, a diferencia del CCR de lado izquierdo (D. Li et al., 2017).

## **2.2 Epidemiología y factores de riesgo**

A nivel mundial, el CCR es el tercer tumor más frecuentemente diagnosticado por detrás del cáncer de mama y de pulmón, con 2 millones de casos nuevos diagnosticados solo en el año 2022. En España, ocupa el primer lugar en incidencia si tenemos en cuenta ambos sexos, con 44000 nuevos casos diagnosticados en 2022. En varones, ocuparía el segundo

lugar con 27000 nuevos casos, sólo por detrás del cáncer de próstata. En mujeres, es el segundo con mayor incidencia detrás del cáncer de mama, con 17000 nuevos casos ese mismo año (Fernández Montes et al., 2023; Mármol et al., 2017).

En las últimas décadas, ha aumentado considerablemente el número absoluto de CCR diagnosticados, debido a varios factores entre los que destacan el progresivo aumento poblacional, el envejecimiento de la población como consecuencia del aumento de la media de vida, la implantación y puesta en marcha del diagnóstico precoz mediante test de sangre oculta en heces y la colonoscopia y la exposición a los conocidos factores de riesgo (S. G. Patel et al., 2022).

Entre los factores de riesgo que se conocen, debemos diferenciar los factores ambientales y los no ambientales. Entre los primeros, han demostrado su relación con el CCR, el tabaco, el consumo excesivo de carne roja o procesada, la ingesta del alcohol, la baja ingesta de vegetales y fruta, la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad inflamatoria intestinal. Excepto estos dos últimos, el resto son factores de riesgo modificables. También merece la pena destacar los factores de riesgo modificables que reducen el riesgo de CCR como el ejercicio físico, la dieta rica en fibra o vitaminas, y la ingesta de pescado, frutos secos, cereales y lácteos. Hay otros factores que se han asociado con la reducción de riesgo, como el uso de la aspirina, estatinas o terapia hormonal sustitutiva (X. He et al., 2018; Sninsky et al., 2022).

Por otro lado, merecen especial mención los factores hereditarios. Básicamente, existen dos síndromes diferentes en CCR hereditario, los síndromes polipósicos y los síndromes no polipósicos. Éste último incluye el síndrome de Lynch y el CCR familiar. El síndrome de Lynch es consecuencia de mutaciones germinales en genes reparadores de ADN o MMR (mismatch repair), como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* y da lugar a tumores con inestabilidad de microsatélites y fenotipo hipermutado. A parte de CCR, los pacientes con síndrome de Lynch tienen más riesgo de otros tumores como el cáncer de endometrio, intestino delgado, tumores uroteliales, pancreático-biliares, gástrico, ovario y menos frecuente mama y próstata (Hampel et al., 2022). Existen otros genes relacionados con el CCR, es decir, cuyas mutaciones o alteraciones patogénicas germinales predisponen a un mayor riesgo de desarrollarlo a lo largo de la vida y es importante estudiarlos para descartar

un síndrome de predisposición a cáncer familiar. Algunos de estos genes son *BML*, *POLE*, *POLD1*, *SMAD4*, *STK11*, *MUTYH*, entre otros. Entre los síndromes hereditarios polipósicos, destaca la PAF, de herencia autosómico dominante que se produce por una mutación germinal en el gen *APC*, que juega un papel importante en la activación de la vía WNT, esencial en la vía adenoma – carcinoma. Los pacientes con PAF tienen un fenotipo caracterizado por numerosos pólipos (>100) que aparecen en todo el colon a una media de edad media de 30 años y que, si no son tratados, inciden en el CCR en el 100% de los casos a lo largo de la vida. Existen otros síndromes hereditarios polipósicos, como la poliposis adenomatosa atenuada o la poliposis causada por mutación germinal en el gen *MUTYH*, que también aumenta el riesgo de CCR entre un 43% y un 100% en los individuos que la padecen (Abdel-Rahman & Peltomäki, 2004; Hampel et al., 2022).

Sin embargo, el componente hereditario en CCR no sólo se explica por estos síndromes hereditarios causados por mutaciones o alteraciones genéticas en genes concretos que juegan un papel específico en la vía de formación del cáncer. Hoy sabemos que sólo un 5-7% del total de CCR está causado por estas mutaciones germinales (Cunningham et al., 2022; Vasen et al., 2015). Los antecedentes familiares de CCR en una persona confieren un mayor riesgo de desarrollar CCR a lo largo de la vida, siendo este riesgo variable en función del número de antecedentes familiares y la edad de diagnóstico en cada uno de ellos. Para estimar la heredabilidad del CCR, se han publicado estudios realizados en familias con gemelos que han estimado que el porcentaje de heredabilidad oscila entre el 12 y el 35% (Czene et al., 2002; Lichtenstein et al., 2000). Sin embargo, los factores de heredabilidad del cáncer no son conocidos con exactitud, incluyendo los SNPs en genes de susceptibilidad al CCR. Este es, sin duda, un campo con gran interés científico ya que conocer estos factores nos permitiría estimar el riesgo de un individuo a desarrollar la enfermedad, pudiéndose entonces establecer pautas de seguimiento personalizadas y diseñar un tratamiento más precoz y adaptado al perfil genético.

## **2.3 Diagnóstico y estadiaje**

El diagnóstico y el estadiaje correcto son esenciales para poder definir un tratamiento

adecuado para el paciente. La colonoscopia es la herramienta considerada “*gold standard*” en diagnóstico del CCR (Vleugels et al., 2016). Es importante destacar que la precisión de la colonoscopia puede verse influenciada por diversos factores, como la calidad del examen, la preparación adecuada del paciente, la experiencia del endoscopista y la ubicación y el tamaño de las lesiones. Teniendo en cuenta esto, la sensibilidad varía entre un 60% y un 90% y la especificidad es mayor del 90%. A parte de ser útil para el diagnóstico de un CCR, la colonoscopia sirve como herramienta terapéutica permitiendo la extirpación de lesiones precancerosas o incluso de carcinomas in situ o que infiltren la submucosa del colon (P. S. Liang & Dominitz, 2019). En aquellas lesiones no extirpables endoscópicamente, por dificultad técnica o por invasión de una capa más profunda, el tratamiento de elección será la cirugía (Moore & Aulet, 2017).

Una vez realizada la colonoscopia y confirmado el CCR desde un punto de vista histológico, es fundamental realizar un correcto diagnóstico y estadiaje por imagen. Para ello, se disponen de varias pruebas de imagen que tienen un papel en el CCR, dependiendo de la localización, presencia de metástasis etc.

La tomografía axial computarizada (TAC) con contraste oral e intravenoso se emplea de manera habitual en la evaluación inicial y el estadiaje, tanto antes como después de la cirugía, y permite valorar la extensión local del tumor, la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales y a distancia, así como posibles complicaciones. La TAC tiene una mayor sensibilidad para detectar metástasis a distancia (75 - 87%) en comparación con la detección de afectación ganglionar (45 - 73%) o la invasión transmural del tumor (aproximadamente 50%) (Nasseri & Langenfeld, 2017). Una dificultad para tener en cuenta en la evaluación previa a la cirugía es la aparición en la TAC de lesiones inespecíficas en cualquier órgano y que pueden requerir un estudio adicional. Hasta el 9% de los pacientes sometidos a estadificación después del diagnóstico de CCR presentaban nódulos pulmonares indeterminados en la TAC de tórax, de los cuales hasta un 80% resultaron ser metástasis colorrectales en el seguimiento (Kijima et al., 2014; Shin et al., 2008a).

La Resonancia Magnética (RM) con contraste intravenoso puede detectar más lesiones a nivel hepático que la TAC. Sin embargo, las TAC de última generación y la utilización de imágenes de triple fase durante la administración de contraste han mejorado la

sensibilidad de la TAC para la detección de metástasis hepáticas. En la práctica actual, tanto la RM hepática como la ecografía hepática con contraste se reservan para pacientes con hallazgos sospechosos, pero no concluyentes en la TAC, especialmente cuando se necesita una mejor caracterización de la carga de enfermedad hepática para tomar decisiones sobre la posible resección hepática (van der Paardt & Stoker, 2018; Zeinali-Rafsanjani et al., 2020).

La colonografía por TAC, también conocida como colonoscopia virtual, ofrece una visualización endoluminal del colon distendido mediante simulación por computadora. Tiene su utilidad en el diagnóstico inicial de pacientes con síntomas sugestivos de CCR en los que la colonoscopia no es posible realizar por diferentes motivos. La adquisición de imágenes se realiza mediante TAC, y a través de software avanzado de procesamiento, se generan imágenes que permiten navegar a lo largo del colon. Requiere una preparación similar a un enema de bario y está contraindicada en pacientes con obstrucción. A pesar de su utilidad, estudios comparativos no han demostrado una superioridad diagnóstica de la colonografía por TAC sobre la colonoscopia. Dado que la colonoscopia puede eliminar o biopsiar lesiones durante el procedimiento, sigue siendo el “*gold standard*” para el diagnóstico inicial (Pickhardt & Kim, 2007).

La ultrasonografía endorrectal (ERUS) se recomienda para la estadificación inicial del cáncer de recto en estadios iniciales (T1-T2 N0) y la RM pélvica para guiar el tratamiento preoperatorio y determinar la extensión de la cirugía (Pfau & Chak, 2002).

Las tomografías por emisión de positrones (PET) con o sin TAC integrado (PET-TAC) no parecen agregar información sustancial a la proporcionada por la TAC en la estadificación rutinaria del CCR. Sin embargo, pueden ser útiles para evaluar hallazgos dudosos en la TAC, cuando la administración de contraste intravenoso está contraindicada, para obtener información adicional sobre la enfermedad fuera de la pelvis en el cáncer de recto, en combinación con RM hepática y TAC con contraste intravenoso en el cáncer de recto que muestra características asociadas con un alto riesgo de metástasis (por ejemplo, extensa invasión vascular), para identificar un carcinoma sincrónico potencialmente curable mediante cirugía, para localizar la recurrencia de la enfermedad en pacientes con aumento del nivel sérico del antígeno carcinoembrionario (CEA) y resultados no claros en otras

pruebas de imagen después del tratamiento inicial y para evaluar a pacientes considerados candidatos presentes o futuros para la resección de metástasis hepáticas aisladas de CCR. Es importante tener en cuenta que la QT reciente puede afectar la sensibilidad de la PET para la detección de metástasis hepáticas colorrectales, ya que reduce la actividad metabólica celular del tumor. Sin embargo, en general, la PET es beneficiosa para detectar metástasis fuera del hígado en pacientes que se considera que son candidatos para la resección hepática (Shin et al., 2008).

Solo se recomienda realizar exploraciones óseas, como puede ser una gammagrafía ósea, y cerebrales, como la TAC o la RM cerebral, si los síntomas sugieren la presencia de metástasis en esas áreas (Rodríguez-Fraile et al., 2020; Staib et al., 2000).

La PET-RM de cuerpo entero puede proporcionar información sobre la anatomía y el metabolismo, y se están realizando estudios para evaluar si puede mejorar el diagnóstico del CCR y proporcionar información adicional sobre el fenotipo y la biología de la enfermedad en comparación con las técnicas de imagen convencionales (D. H. Lee & Lee, 2017).

En cuanto al estadiaje del CCR, la clasificación TNM del cáncer es un sistema ampliamente utilizado para evaluar y describir la extensión y el estadio de un cáncer en función de tres variables principales. La primera variable es “T” (tumor) y se refiere al tamaño y la extensión del tumor primario. En el caso del CCR, se refiere a la invasión de las distintas capas de la pared del colon. La segunda es “N” (nódulos linfáticos) y permite describir si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos locorregionales. Y la tercera es “M” (metástasis) e indica si el cáncer se ha diseminado a otros órganos. Estas tres letras se combinan para determinar el estadio del cáncer, que proporciona información sobre la extensión de la enfermedad. Cuanto mayor sea el número en cada categoría (T, N, M), mayor será la extensión, lo que implica un peor pronóstico para el paciente. El sistema TNM es esencial para la planificación del tratamiento adecuado junto con las características moleculares y genéticas del tumor.

La clasificación TNM más reciente del CCR corresponde a la 8ª edición de la *American Joint Committee on Cancer*, de 2016 (Kong et al., 2018; J. Li et al., 2016):

### **Infiltración del tumor (T)**

**TX:** el tumor primario no se puede evaluar.

**T0:** no hay evidencia de tumor primario.

**Tis:** carcinoma in situ, carcinoma intramucoso (afectación de lámina propia sin extensión a través de la muscularis mucosa).<sup>1</sup>

**T1:** el tumor invade la submucosa (a través de la muscularis mucosa pero no en la muscularis propia).

**T2:** el tumor invade la muscularis propia.

**T3:** el tumor invade a través de la muscularis propia en los tejidos pericólorrectales.

**T4:** el tumor invade el peritoneo visceral o invade o se adhiere al órgano o estructura adyacente <sup>2,3</sup>.

- **T4a:** el tumor invade a través del peritoneo visceral (incluida la perforación macroscópica del intestino a través del tumor y la invasión continua del tumor a través de áreas de inflamación en la superficie del peritoneo visceral).
- **T4b:** el tumor invade directamente o se adhiere a órganos o estructuras adyacentes.

### **Nódulos linfáticos regionales (N)**

**Nx:** los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar.

**N0:** no hay metástasis ganglionares regionales.

**N1:** de uno a tres ganglios linfáticos regionales son positivos (tumor en los ganglios linfáticos midiendo  $\geq 0.2$  mm), o depósitos tumorales presentes.

- **N1a:** un ganglio linfático regional es positivo.
- **N1b:** dos o tres ganglios linfáticos regionales son positivos.
- **N1c:** no hay ganglios linfáticos regionales positivos, pero hay depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio, pericólico (no en peritoneo) o en tejidos perirrectales/mesorrectales.

**N2:** cuatro o más ganglios linfáticos regionales son positivos.

- **N2a:** cuatro a seis ganglios linfáticos regionales son positivos.
- **N2b:** siete o más ganglios linfáticos regionales son positivos.

### **Metástasis a distancia (M)**

**M0:** No hay metástasis a distancia por imágenes. No hay evidencia de tumor en órganos distantes.

**M1:** Se identifica metástasis en uno o más sitios u órganos distantes o metástasis peritoneales.

- **M1a:** Metástasis a un sitio u órgano, sin metástasis peritoneal.
- **M1b:** Metástasis a dos o más sitios u órganos, sin metástasis peritoneal.
- **M1c:** Metástasis en la superficie peritoneal con o sin otras localizaciones metastásicas.

<sup>1</sup> Tis incluye las células tumorales confinadas dentro de la membrana basal glandular (intraepitelial) o la lámina propia de la mucosa (intramucosa) sin extensión a través del muscularis mucosa en la submucosa.

<sup>2</sup> La invasión directa en T4 incluye la invasión de otros órganos u otros segmentos del colon o recto como resultado de la extensión directa a través de la serosa, confirmada en examen microscópico (por ejemplo, invasión del colon sigmoide por un carcinoma del ciego) o para cánceres en una localización retroperitoneal o subperitoneal, directa invasión de otros órganos o estructuras en virtud de la extensión más allá de la muscularis propia (es decir, respectivamente, un tumor en la pared posterior del colon descendente que invada el riñón izquierdo o la pared abdominal lateral; o un cáncer de recto medio o distal con invasión de próstata, vesículas seminales, cuello uterino o vagina).

<sup>3</sup> A nivel macroscópico, el tumor que se adhiere a otros órganos o estructuras se clasifica cT4b. Sin embargo, si no hay un tumor presente en la adhesión, microscópicamente, la clasificación debe ser pT1-4a dependiendo de la profundidad anatómica de la invasión de la pared.

<sup>4</sup> Las clasificaciones V y L se deben usar para identificar la presencia o ausencia de invasión vascular o linfática, mientras que PN se debe utilizar para la invasión perineural.

## **2.4 Histología**

Las características histológicas más importantes del CCR incluyen el tamaño tumoral, el “*budding*” tumoral, la existencia de linfocitos infiltrantes de tumor (*TILS*), la afectación de los ganglios linfáticos, la invasión linfovascular, la invasión perineural y el grado tumoral (Chen et al., 2021).

El tamaño del tumor se refiere al diámetro máximo del tumor. Este diámetro tiene una implicación pronóstica claramente establecida en otros tumores como mama o pulmón y forma parte de la clasificación TNM. Sin embargo, en CCR no está claramente asociado a un peor pronóstico y para definir la T, del TNM, se tiene en cuenta la invasión de las distintas

capas del intestino. Algunos estudios han asociado un mayor tamaño tumoral a una peor supervivencia, sin embargo, tumores pequeños pero clasificados como T4 por afectación del peritoneo tienen un peor pronóstico que tumores más grandes que sólo afectan la capa muscular, definidos como T2. En definitiva, es importante determinar el diámetro del tumor, pero no necesariamente está relacionado con el pronóstico del CCR (Paik et al., 2023; B. Xu et al., 2016).

El “*budding*” tumoral, también conocido como “*tumor budding*” es un fenómeno observado en el CCR y en otros tipos de cáncer. Se refiere a la presencia de grupos o pequeños racimos de células cancerosas individuales (habitualmente de una a cuatro células tumorales) que se desprenden del tumor principal e infiltran los tejidos circundantes. Estas células tienden a ser menos diferenciadas y más agresivas que las que componen el tumor primario. La implicación pronóstica del “*budding*” tumoral es significativa (Betge et al., 2012). Se ha encontrado que un alto grado de “*budding*” tumoral está asociado con un peor pronóstico en pacientes con CCR estadio II y estadio III y algunas guías de práctica clínica ya lo han incorporado como un factor de riesgo para tener en cuenta para plantear QT adyuvante en CCR estadios II. Además, el “*budding*” tumoral puede indicar una mayor resistencia al tratamiento y una mayor probabilidad de recurrencia (Basile et al., 2022).

Los TILs son un hallazgo histológico que representa la inmunogenicidad del paciente frente al tumor. Se trata de linfocitos que se encuentran dentro del tejido del tumor con el objetivo de destruir células tumorales y suprimir el crecimiento tumoral. Se ha observado que la presencia y la cantidad de TILs en el tumor está relacionada con el pronóstico de los pacientes (L. Guo et al., 2020). El CCR con abundantes TILs está asociado a una mayor supervivencia, supervivencia libre de progresión (SLP) y características histológicas favorables como la ausencia de invasión linfovascular y perineural, menor grado de afectación ganglionar y menor capacidad de metastatizar (L. Ye et al., 2019). Por otro lado, la falta de TILs o su escasa presencia puede indicar una respuesta inmunológica deficiente y un peor pronóstico. Los estudios sugieren que la evaluación de los TILs en el CCR puede influir en la decisión de indicar un tratamiento de QT adyuvante en estadios localizados. Además, los tratamientos de inmunoterapia, que estimulan la respuesta inmunológica contra

el cáncer, podrían beneficiar a pacientes con una alta presencia de TILs (Bai et al., 2022). En definitiva, los TILs son linfocitos que se infiltran en el tumor y su cantidad en el tejido tumoral puede tener implicaciones pronósticas en pacientes con CCR, sirviendo como un indicador de la respuesta inmunológica y de agresividad tumoral.

Los ganglios linfáticos son las estructuras del sistema inmunológico que primero se ven afectadas por la diseminación de las células tumorales. Por ello, su afectación representa el principal factor de riesgo de recaída y deben ser siempre valorados para una decisión pronóstica y terapéutica. Las principales guías de práctica clínica consideran que una valoración de al menos 12 ganglios linfáticos es necesaria para una correcta estadificación. La proporción de ganglios linfáticos con afectación tumoral es directamente proporcional al pronóstico del paciente y así se refleja en la clasificación TNM, en la que un mayor número implica un peor estadiaje (Benedek et al., 2020; Fulop et al., 2019). Es importante aclarar y diferenciar los ganglios linfáticos locorregionales de los ganglios linfáticos a distancia, en función de la localización del tumor primario, es decir, dependiendo de la localización del tumor primario a lo largo del colon (recto, sigma, colon descendente, colon transverso, colon ascendente o ciego), los ganglios locorregionales van a ser aquellos localizados junto al tumor y que pueden ser extirpados quirúrgicamente y no aquellos localizados en cualquier otra parte del cuerpo, que ya serán definidos como metástasis ganglionares a distancia o M1.

La invasión linfovascular (ILV), también conocida como invasión linfática o vascular, es una característica histológica que describe la capacidad de las células tumorales de penetrar en los vasos sanguíneos (sobre todo venosos) o linfáticos circundantes. Esta invasión es un marcador importante de la agresividad del cáncer, se considera un factor de riesgo adverso por aumentar el riesgo de metástasis y tiene implicaciones significativas en el pronóstico y la decisión del tratamiento de la enfermedad localizada. Representa uno de los factores de riesgo que son tenidos en cuenta en los estadios II para clasificarlos de alto o bajo riesgo y sólo con la presencia de ILV puede estar indicada la administración de QT adyuvante con el objetivo de reducir el riesgo de recaída de la enfermedad y mejorar el pronóstico de los pacientes (Lim et al., 2010).

La invasión perineural (IPN) se refiere a la propagación de células tumorales a lo largo de los nervios periféricos que rodean el tumor primario y esta invasión puede producirse

dentro, alrededor o a través de cualquiera de las capas nerviosas. Esta forma de propagación puede ser insidiosa, ya que las células cancerosas pueden extenderse a áreas distantes a lo largo de los nervios, incluso cuando el tumor principal no sea de gran tamaño. Además, puede hacer que la extirpación quirúrgica completa del tumor sea más complicada, ya que las células tumorales pueden estar extendidas a lo largo de los nervios en una red compleja. Esto puede tener implicaciones significativas para el pronóstico y el tratamiento de los pacientes (Qin et al., 2023). La incidencia de esta característica histológica oscila entre un 10 a un 40%, aumentando la probabilidad de estar presente conforme avanza el estadio tumoral. Constituye otro de los factores de riesgo en CCR y se tiene en cuenta a la hora de decidir administrar un tratamiento adyuvante en los estadios II (van Wyk et al., 2017).

El grado tumoral, también conocido como grado histológico o grado de diferenciación, es un factor histológico importante en la evaluación, no sólo del CCR, sino también de otros tipos de cáncer. Se refiere al grado en el que las células cancerosas se asemejan a las células normales del tejido del que se originaron (Barresi et al., 2015). El grado tumoral se clasifica en tres niveles principales en el CCR. En el grado bien diferenciado o grado 1, las células cancerosas se parecen mucho a las células normales del tejido colorrectal (más de un 95% de formación de glándulas) y tienen una apariencia y estructura más cercana a las células sanas. En el grado moderadamente diferenciado o grado 2, las células cancerosas muestran algunas diferencias en su apariencia y estructura en comparación con las células normales (entre un 50 y un 95% de formación glandular). Y en el grado pobremente diferenciado o grado 3, las células cancerosas tienen una apariencia significativamente diferente de las células normales y muestran una falta de diferenciación (menos de un 50% de formación de glándulas e incluso ausencia de ella). El grado tumoral es importante porque puede tener implicaciones en el pronóstico y el tratamiento del CCR. Por lo general, los tumores grado 1 o bien diferenciados tienden a ser menos agresivos y tienen un pronóstico más favorable. En contraste, los tumores grado 3 o peor diferenciados suelen ser más agresivos, se han asociado a una peor supervivencia y mayor probabilidad de recurrencia (Shivji et al., 2020). De hecho, en la decisión de la QT adyuvante en los estadios localizados, es otro factor más para tener en cuenta.

### **2.5 Clasificación molecular**

En el año 2015, se publica una clasificación de CCR utilizando múltiples muestras de tejido de pacientes y analizando características biológicas y moleculares que incluían diferentes datos genéticos, epigenéticos y proteómicos (mutaciones, alteraciones en número de copias, expresión génica, metilación, microARN, expresión proteica etc.). Esta clasificación realizada por el consorcio de subtipos de CCR (*CCR Subtyping Consortium*), permitió definir 4 subtipos de CCR (CMS1, CMS2, CMS3 y CMS4) con diferencias notables e implicación pronóstica.

El CMS1 se caracteriza por una alta tasa de mutaciones, muestra un alto perfil de metilación, una respuesta inmune fuerte, mayor frecuencia de IMS, baja prevalencia de alteraciones en el número de copias del ADN, y sobreexpresión de proteínas relacionadas con la reparación del daño del ADN. Desde el punto de vista clínico, es más frecuente en mujeres, en el lado derecho del colon y presenta un grado histopatológico más alto. Además, muestra una supervivencia pobre tras la recaída.

El CMS 2 muestra una mayor inestabilidad cromosómica, con más alteraciones en el número de copias en genes oncogénicos y supresores de tumores y, además, tiene una mayor frecuencia de mutaciones en el gen *BRAF*. Está relacionado con la diferenciación epitelial y una fuerte activación de las vías WNT y MYC. Predominantemente se localiza en el lado izquierdo del colon y los pacientes tienen una supervivencia superior después de la recaída, con una proporción mayor de supervivientes a largo plazo.

El CMS3 muestra una menor inestabilidad cromosómica que CMS2, un patrón de hipermetilación y mutaciones en el gen *KRAS*. Tiene una firma metabólica característica, lo que sugiere una destacable adaptación metabólica y un perfil de metilación con una prevalencia de CIMP bajo.

Finalmente, el CMS4 también presenta inestabilidad cromosómica y tiene un mayor número de alteraciones en genes asociados con la transición epitelio-mesénquima. Muestra activación de vías de señalización como el TGF  $\beta$ , angiogénesis y remodelación de la matriz.

En cuanto a las características clínicas, tiende a ser diagnosticado en estadios más avanzados (III y IV) y muestra una peor supervivencia y SLP.

Es importante destacar que, en el estudio que determinó esta clasificación molecular no se encontraron mutaciones únicas que definieran un subtipo específico, lo que sugirió que la heterogeneidad genética es alta en el CCR. Esta clasificación no es empleada en la práctica clínica habitual, pero, sin duda, da un paso más allá en la clasificación clásica del CCR que utiliza sólo biomarcadores como *RAS*, *BRAF* o *MSI* y que no refleja la gran heterogeneidad del CCR desde un punto de vista genético, molecular, clínico y pronóstico (Guinney et al., 2015) (Figura 4).

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

**Figura 4:** Clasificación molecular del CCR propuesta basada en la expresión génica (Guinney et al., 2015).

CIMP, fenotipo metilador de isla CpG; MSI: inestabilidad de microsatélites; SCNA, alteraciones del número de copias somáticas; TGF, factor de crecimiento transformante.

## 2.6 Pronóstico

El pronóstico de los pacientes con CCR está directamente relacionado con el estadio tumoral, aunque existen otros factores que influyen en la supervivencia de los pacientes, como la edad, comorbilidades, carga tumoral (sobre todo en los pacientes con enfermedad

metastásica), lateralidad del tumor y diversas características histológicas y moleculares. Si tenemos en cuenta sólo el estadio tumoral, obtenemos una supervivencia relativa a 5 años del 91% en el cáncer de colon localizado (estadio I y estadio II), 72% en el localmente avanzado (estadio III) y del 15% para los estadios IV. Existen pequeñas diferencias con el cáncer de recto, con una supervivencia relativa a 5 años del 90% en los pacientes con tumores localizados (estadios I y II), 74% en estadios III y del 17% en estadios IV (Petrelli et al., 2017; Siegel et al., 2023).

### **2.7 Tratamiento**

Es esencial destacar que el tratamiento del cáncer, y en este caso del CCR, debe ser multidisciplinar y, por tanto, la decisión debe ser consensuada en un comité multidisciplinar, que incluya especialistas en radiología, anatomía patológica, cirugía, digestivo, medicina nuclear, oncología radioterápica y oncología médica, como mínimo. Esto tiene un impacto, incluso, en el pronóstico de los pacientes (Milana et al., 2022; Pillay et al., 2016).

#### **2.7.1 Tratamiento endoscópico**

Gracias a los programas de detección precoz, la resección endoscópica permite un tratamiento radical del CCR en algunos casos. Los pólipos malignos pueden ser extirpados endoscópicamente de manera precisa, lo que permite evaluar características de alto riesgo (invasión submucosa, diferenciación, invasión linfática y crecimiento tumoral) y márgenes profundos y laterales. En los tumores T1, se pueden utilizar diversas técnicas de resección endoscópica, como la resección endoscópica mucosa en bloque, la disección endoscópica submucosa y la resección endoscópica de margen o espesor completo. Estas técnicas requieren habilidades técnicas avanzadas y deben realizarse en centros especializados. Las ventajas de la resección endoscópica frente a otras técnicas son claras ya que se trata de una opción segura y menos costosa en comparación con la cirugía. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, muchos pacientes con lesiones malignas no pueden ser curados con la resección endoscópicamente y deben ser intervenidos quirúrgicamente, para garantizar una extirpación

completa del tumor (Aarons et al., 2014; Rex et al., 2019).

### **2.7.2 Tratamiento quirúrgico**

La cirugía es fundamental en el tratamiento curativo del CCR y para ello, la calidad de la resección es esencial. La cirugía del CCR se ha optimizado a lo largo de los últimos años facilitando una extirpación mesocólica completa y una linfadenectomía que permita una valoración adecuada de los ganglios linfáticos. La laparoscopia se ha convertido en la técnica estándar para el cáncer de colon en muchos países, permitiendo reducir la comorbilidad y asegurando unos resultados similares a la cirugía abierta, si el equipo quirúrgico es experto (Athanasίου et al., 2016). La cirugía para el cáncer de recto es más compleja debido a la anatomía de la pelvis, siendo la escisión total del mesorrecto el enfoque estándar (Simunovic et al., 2009). La extensión de la resección depende de la afectación del complejo esfinteriano y otras estructuras circundantes. Hay que tener en cuenta que el CCR puede debutar clínicamente como una obstrucción o perforación. En este caso, el papel de la cirugía es fundamental mediante resección, colostomía descompresiva o incluso, la endoprótesis endoscópica. También hay que destacar el papel de la cirugía en pacientes metastásicos, sobre todo la resección de metástasis hepáticas, pulmonares y peritoneales, que permite incrementar la supervivencia de los pacientes que son seleccionados para este tipo de cirugía (Vogel et al., 2022).

### **2.7.3 Radioterapia**

El tratamiento de la radioterapia (RT) es fundamental en el cáncer de recto localizado o localmente avanzado. Numerosos estudios han demostrado el beneficio de la RT antes de la cirugía para reducir el riesgo de recurrencia local en el cáncer de recto, aunque la reducción absoluta del riesgo depende del estadio y la calidad de la cirugía (Vendrely et al., 2022). En este contexto, la RT está indicada para tumores de riesgo intermedio a alto basados en la estadificación por RM (Vendrely et al., 2022). La terapia más utilizada implica una dosis de 45-50 grays en 25-28 fracciones, junto con una fluoropirimidina como sensibilizador a la

radiación. Esto permite reducir la extensión del tumor en la mayoría de los pacientes y produce una respuesta completa patológica en al menos el 15-20%. El momento de la cirugía después de la RT generalmente es de 8-10 semanas. También existe la opción, en casos seleccionados, de administrar la RT a una dosis de 25 grays en 5 fracciones (5x5 Gy). En los últimos años, se han publicado nuevos esquemas que combinan RT con QT más intensiva e incluso esquemas que permiten administrar todo el tratamiento combinado o secuencial antes de la cirugía, mejorando el beneficio en pacientes seleccionados, sobre todo de alto riesgo (T4, N2, y afectación vascular extramural). Es lo que se conoce como terapia neoadyuvante total o TNT (S. Liu et al., 2021).

También se ha demostrado como una estrategia válida el “*Watch and Wait*” o “ver y esperar”, que implica la observación de una respuesta clínica completa después de la QT y la RT, lo que permite omitir la cirugía radical en pacientes muy seleccionados (van der Valk et al., 2018). En definitiva, la RT tiene un papel clave en el cáncer de recto, aunque su utilización permite diferentes estrategias de tratamiento en función de cada paciente. Existen otras modalidades de RT como la radioterapia estereotáxica o SBRT, que permite tratar las lesiones metastásicas únicas, principalmente en hígado y pulmón, con intención radical. La RT también tiene un papel importante en el tratamiento paliativo del CCR, por ejemplo, para el tratamiento del dolor refractario o para tratar un sangrado, al conseguir una hemostasia (Tam & Wu, 2019).

### **2.7.4 Otras opciones de tratamiento local**

Existen otras técnicas de tratamiento empleadas, sobre todo en el CCR metastásico (CCRm), que permiten prolongar la supervivencia de los pacientes e incluso, el intervalo libre de tratamiento sistémico. Técnicas como la termoablación por radiofrecuencia o microondas, quimioembolización, la radioembolización o la SBRT, ya mencionada anteriormente, permiten un control local con un alto porcentaje de éxito en pacientes seleccionados y deben ser tenidas en cuenta como parte del tratamiento multidisciplinar del CCR (Al Bandar & Kim, 2017).

### **2.7.5 Tratamiento sistémico**

El tratamiento sistémico del CCR dependerá del estadiaje, de las características histológicas y moleculares del tumor y de las condiciones, preferencias y características del paciente.

#### **Enfermedad localizada**

Los pacientes con cáncer de colon estadio II, una vez intervenido el tumor primario, serán tratados, si no hay contraindicación y si existen factores de riesgo, con QT basada en fluoropirimidinas durante 6 meses (Argilés et al., 2020). Estos factores de riesgo son, fundamentalmente, el T4, la invasión linfovascular, la invasión perineural y un número de ganglios inferior a 12 en la pieza quirúrgica. En algunos casos, puede estar justificado añadir oxaliplatino al esquema de tratamiento.

Los pacientes con cáncer de colon estadio III, una vez intervenido el tumor primario, serán tratados, si no hay contraindicación, con QT basada en fluoropirimidinas y oxaliplatino durante 6 meses. No se ha demostrado beneficio en supervivencia el añadir oxaliplatino a los pacientes mayores de 70 años (Batra et al., 2020).

El tratamiento del cáncer de recto localizado, como ya se ha explicado previamente, incluye la RT en los casos indicados. La QT, también basada en fluoropirimidinas con o sin oxaliplatino, puede ser administrada de forma perioperatoria (antes y después de la cirugía) o administrada de forma completa antes de la cirugía, como TNT (S. Liu et al., 2021).

Existen biomarcadores con valor predictivo y pronóstico en la enfermedad localizada tales como la determinación de ADN tumoral circulante (ADNtc) y la determinación de IMS. La existencia de ADNtc en el paciente que ha sido intervenido es un biomarcador de mal pronóstico y puede justificar la necesidad de QT tras la cirugía (Sahin et al., 2022). Existen algunas plataformas validadas en el mercado, pero su uso está restringido al ámbito privado y aún no está establecido su uso en la práctica clínica en España de forma rutinaria. La IMS, por el contrario, sí es un biomarcador necesario para la toma de decisiones en los pacientes con CCR estadio II. Estos pacientes con CCR estadio II con IMS tienen un excelente

pronóstico y no se van a beneficiar del tratamiento adyuvante con las fluoropirimidinas (Argilés et al., 2020b).

### **Enfermedad metastásica**

El 25% de los pacientes con CCR tienen metástasis en el momento del diagnóstico. Además, alrededor del 50% desarrollará enfermedad local irresecable o metástasis en algún momento de su evolución. A parte de los tratamientos locales y quirúrgicos, ya mencionados anteriormente y que tienen su papel en el CCRm, existen varias opciones de tratamiento sistémico para estos pacientes. En la actualidad, se han introducido nuevas terapias que han mejorado las tasas de respuesta, el intervalo libre de progresión y la supervivencia de los pacientes con CCRm (Boccaccino et al., 2022; Z. Huang et al., 2024; Y. Wang et al., 2023). Antes de iniciar cualquier tratamiento, es esencial determinar el objetivo terapéutico para cada paciente, considerando tanto factores relacionados con la enfermedad, como biomarcadores histológicos y moleculares, y la extensión de las metástasis. También se deben evaluar aspectos del paciente, como su estado general, comorbilidades y preferencias. Una vez se han evaluado estos factores, se puede definir el objetivo terapéutico y clasificar al paciente según la posibilidad de resear las metástasis (enfermedad reseable, potencialmente reseable o irresecable). Para tomar estas decisiones, es fundamental discutir cada caso en el comité multidisciplinar. También es fundamental tener en cuenta la posibilidad de incluir a los pacientes en ensayos clínicos, ya que es una opción que podría mejorar el beneficio del tratamiento con respecto al tratamiento estándar.

Los biomarcadores que, sin duda, deben ser tenidos en cuenta para realizar un correcto enfoque terapéutico son las mutaciones de *RAS* y *BRAF*, *HER2* e IMS (Cervantes et al., 2023).

Los pacientes con metástasis reseables son aquellos cuya cirugía es factible de entrada, pero la elección entre la cirugía inicial o un tratamiento sistémico previo o neoadyuvante es compleja. Normalmente, la decisión se basa en diversos factores pronósticos como el intervalo libre de metástasis menor de 12 meses (en enfermedad metacrónica), niveles de CEA mayores de 200, presencia de más de 3 metástasis, tamaño de

al menos una lesión metastásica mayor de 5 cm y metástasis ganglionares locorregionales en el tumor primario (en enfermedad metastásica sincrónica). En términos generales, si hay dos o menos factores pronósticos, se podría considerar la cirugía inicial de las metástasis. Si hay tres o más factores pronósticos, se optaría por un tratamiento sistémico neoadyuvante que incluiría la combinación de una fluoropirimidina y el oxaliplatino, como primera opción, si es posible (Cervantes et al., 2023; Leowattana et al., 2023; Morris et al., 2023).

En los pacientes con metástasis potencialmente resecables se recomienda administrar un tratamiento sistémico de conversión con el objetivo de reducir al máximo la carga tumoral y así poder realizar, si existe respuesta, una cirugía completa para reseca toda la enfermedad.

El tratamiento se basa en combinaciones de oxaliplatino o irinotecán con fluoropirimidinas, que pueden ser administradas en forma de doblete o triplete, con o sin la adición de un agente biológico. En pacientes sin mutaciones del gen *RAS* y tumores del lado izquierdo del colon, se debe considerar la utilización de un anticuerpo monoclonal contra EGFR, como cetuximab o panitumumab, en combinación con QT (Cervantes et al., 2023; Leowattana et al., 2023; Morris et al., 2023). En los demás casos, se puede optar por un antiangiogénico, como bevacizumab, en combinación con un doblete o incluso triplete si la condición general del paciente lo permite (Cervantes et al., 2023) (Leowattana et al., 2023)

Los pacientes con enfermedad irresecable tienen un pronóstico variable en función de la carga de enfermedad, estado general del paciente y las características moleculares del tumor (Guinney et al., 2015b).

El tratamiento de elección en primera línea de los pacientes sin inestabilidad de microsatélites es una combinación de oxaliplatino o irinotecan combinados con fluoropirimidinas, en forma de doblete o triplete, con un agente biológico. La localización del tumor primario también influye en el tratamiento, ya que los tumores del lado izquierdo responden mejor a ciertos agentes biológicos. En pacientes con tumores *RAS* nativos y localización izquierda, se utilizan anticuerpos monoclonales contra EGFR, como cetuximab o panitumumab, en combinación con QT. Para el resto de los casos, el tratamiento de elección es un antiangiogénico, como bevacizumab, en combinación con QT. La mutación *BRAF V600E*, presente en un pequeño porcentaje de los pacientes, se asocia con un pronóstico pobre

y resistencia a los anti-EGFR (Gu et al., 2024). Los pacientes con IMS deben ser tratados, si no hay contraindicación, con inmunoterapia. En España, el tratamiento de elección es pembrolizumab, un anti-PD1 (André et al., 2020).

La elección del tratamiento de segunda línea en pacientes con buen estado general depende del tratamiento previo y biomarcadores moleculares. Para aquellos pacientes *RAS* nativo y tratamiento previo con anti-EGFR, se puede utilizar QT y un antiangiogénico, como bevacizumab (aunque se haya utilizado en primera línea) o aflibercept. Los pacientes con mutación en *BRAF* (*V600E*) se benefician de cetuximab combinado con encorafenib (un inhibidor de BRAF) como tratamiento estándar en segunda línea (Kopetz et al., 2019).

Aproximadamente la mitad de los pacientes llegan a recibir una tercera línea. En aquellos pacientes con tumores *RAS* nativos que fueron tratados en primera línea con un anti-EGFR y en segunda línea con un tratamiento sin anti-EGFR, una opción de tratamiento aceptable es el retratamiento con anti-EGFR, si se constata, mediante biopsia líquida, que la enfermedad sigue siendo *RAS* nativa. Esto es lo que se conoce como “*rechallenge*” (Ciardiello et al., 2024). Regorafenib es un inhibidor tirosina quinasa con acción anti-angiogénica y es un tratamiento indicado en tercera línea (Zhong et al., 2024). Recientemente se han publicado datos muy positivos con la combinación de TAS-102 (antimetabolito que inhibe la timidilato sintetasa) junto con bevacizumab y actualmente se ha convertido en un tratamiento de elección en estos pacientes (Prager et al., 2023). *HER2* se puede detectar sólo en el 4% de los pacientes, la mayoría *RAS/BRAF* nativos y se asocia con una mala respuesta a la terapia anti-EGFR. Se puede plantear tratamiento combinado con fármacos anti-*HER2* en aquellos pacientes politratados *HER2* positivos (Strickler et al., 2023). Aunque la fusión *NTRK* sólo está presente en el 0,2% de los pacientes con CCR metastásico, su detección permite la administración de Larotrectinib o Entrectinib, inhibidores de *NTRK* (Drilon et al., 2018).

En definitiva, el tratamiento sistémico ha evolucionado mucho en los últimos años, mejorando la supervivencia de los pacientes. Es fundamental tener en cuenta las características del tumor y del propio paciente para decidir el tratamiento sistémico y siempre se debe contemplar la opción de un ensayo clínico, teniendo en cuenta el rápido avance de la terapia en CCR.

### **3. AUTOFAGIA**

#### **3.1 Concepto**

La autofagia es un proceso celular que permite la degradación de diferentes materiales dentro de la célula para la obtención adicional de nutrientes y energía y así, mantener su funcionamiento y la supervivencia celular (Glick et al., 2010; W. Li et al., 2020). Su definición ha evolucionado a lo largo del tiempo. Originalmente, en la década de 1860, la autofagia se refería a la idea de que el cuerpo humano tiene un sistema de autoalimentación que le permite sobrevivir alimentándose de sus propios recursos cuando hay escasez de nutrientes (Schulte-Hermann et al., 1997). Sin embargo, fue en 1963 cuando Christian de Duve utilizó el término autofagia para referirse al proceso celular en el cual los materiales dentro de la célula son degradados por el lisosoma o la vacuola para la obtención de nutrientes y energía. Este proceso de autofagia comienza con la formación de una estructura llamada fagóforo y culmina con la degradación del autofagosoma. Involucra la degradación de varios tipos de materiales, como proteínas, complejos celulares y orgánulos con membranas, como las mitocondrias (Glick et al., 2010).

En 2016, Yoshinori Ohsumi recibe el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de los mecanismos subyacentes de la autofagia y la identificación de varios genes relacionados con la autofagia (Harnett et al., 2017). En los últimos años, se ha obtenido un conocimiento significativo sobre la autofagia, especialmente a través del estudio de levaduras y otros organismos eucariotas. Esto ha permitido identificar proteínas claves relacionadas con la autofagia, conocidas como proteínas ATG y el descubrimiento de los tres tipos principales de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas, cada uno con su propio mecanismo de degradación. La macroautofagia, también llamada autofagia degradativa clásica, es el principal mecanismo catabólico utilizado por las células eucariotas y a lo largo del trabajo nos centraremos en el proceso de la macroautofagia, que llamaremos autofagia (Choi et al., 2024; Rahman et al., 2024)

### **3.2 Base molecular de la autofagia**

#### **3.2.1 Las proteínas ATG**

Las proteínas ATG (siglas derivadas de *AuTophagy*) son esenciales para la formación del autofagosoma y cada una tiene una función específica durante todo el proceso de la autofagia, incluyendo la nucleación de múltiples de estas proteínas ATG en la estructura pre-autofagosome (EPA), la maduración del autofagosoma, el tráfico y el acoplamiento de autofagosomas maduros, la fusión con membranas lisosomales y la degradación del contenido intraautofagosome en el autofagolisosoma, entre otros procesos (Holzer et al., 2024). En definitiva, estas proteínas son las encargadas de organizar y mediar la formación de una estructura de doble membrana, el autofagosoma, que permita el transporte y el desplazamiento de contenido intracelular al lisosoma para su degradación (Ortega et al., 2024). Se han descrito numerosos genes que codifican estas proteínas en levaduras y la mayoría de estos genes están también presentes en los mamíferos. Teniendo en cuenta esto, se puede decir que la autofagia es un proceso evolutivamente conservado. Existen diferentes complejos de proteínas con funciones específicas y necesarias para que se produzca todo el proceso de la autofagia, como el complejo ULK (complejo quinasa serina-treonina que incluye ULK1, ULK2, ATG13, RBCC1/FIP200, ATG 101) (Turco et al., 2020), el complejo quinasa lipídica de clase III que produce el fosfatidilinositol 3-fosfato (PIK3C3/VPS34, PIK3R4/p150, BECN1/Beclin 1, ATG14) (Z. Wang et al., 2024), el efector de fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P) (Safaroghli-Azar et al., 2023), las proteínas WIPI (Grimmel et al., 2015) y dos complejos de conjugación similares a la ubiquitina, uno que conjugan ATG12 a ATG5 en asociación con ATG16L1 (Gammoh, 2020) y otro sistema de conjugación LC3 (Tanida et al., 2008). En definitiva, las proteínas ATG tienen un papel clave en los diferentes pasos necesarios para que se complete el proceso de autofagia.

A continuación, se presenta una descripción de las principales proteínas y sus funciones en este complejo proceso (Gil et al., 2018; Glick et al., 2010; Imai et al., 2016; Levine & Kroemer, 2019; W. Li & Zhang, 2019; X. Li et al., 2020; Zachari & Ganley, 2017) (Tabla 1):

ULK1/2 es parte del complejo ULK1-2 (equivalente a ATG1 en levaduras), ATG13 (homólogo a ATG13 en levaduras), RBCC1/FIP200 (equivalente a ATG17 en levaduras) y ATG101 (sin homólogo en levaduras). Este complejo proteico es esencial para iniciar la autofagia en la EPA, ya que responde a señales de activación celular bajo estrés. Así, facilita el reclutamiento de más proteínas ATG esenciales en la EPA, la organización, dirección y formación del fagóforo, la fijación de vesículas lipídicas y la creación del autofagosoma.

ATG2A/B es crucial para la formación del autofagosoma como parte del complejo proteico ATG9/12-WIPI, necesario para el reclutamiento de ATG9.

ATG3 forma el complejo ATG12-ATG3, importante para mantener la homeostasis mitocondrial.

ATG4A-D es una cisteína proteasa que modifica ATG8, eliminando su último aminoácido y activando LC3.

ATG5 es esencial en la formación y elongación del autofagosoma al formar el complejo ATG12-ATG5 e interactúa con ATG16.

Beclin 1 forma parte del complejo VPS34-PI3K e interactúa con Bcl-2, facilitando la unión de lípidos y la formación de membranas.

ATG7 participa en la conjugación de LC3 y ATG12, y se une a ATG8.

MAP1, LC3A-C, GABARAPs y GATE-16 son fundamentales en la formación y anclaje de la membrana del autofagosoma.

ATG9L1/L2 es una proteína transmembrana que colabora con el complejo ATG2-WIPI y es vital para la formación y expansión del fagóforo.

ATG10 es clave en la conjugación de ATG12 con ATG5.

ATG12 forma un complejo con ATG5 y ATG16.

ATG13 es parte del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200, necesario para el inicio de la autofagia, interactuando con ATG1 y ATG101, entre otros.

ATG14L interviene en la formación y curvatura de membranas y promueve su fusión, siendo parte del complejo VPS34-PI3K e interactuando con Beclin1.

ATG16L1/L2 se asocia al complejo ATG5-ATG12, que forma parte del complejo enzimático E3.

RB1CC1/FIP200 contribuye al inicio de la autofagia y la formación y curvatura de la membrana, siendo parte del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200.

WIPI1-4 facilita el reclutamiento de ATG9 en el autofagosoma como integrante del complejo ATG2-WIPI.

ATG101 interactúa con ATG13 y es parte del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200, participando en el inicio de la autofagia.

### **3.2.2 El proceso de la autofagia**

Como se ha descrito, la autofagia es un proceso evolutivamente conservado en las células y se compone de varios pasos relacionados entre sí, que incluyen la inducción de la autofagia, el ensamblaje y la formación del autofagosoma, el acoplamiento y la fusión del autofagosoma con membranas lisosomales, y la degradación y recirculación del contenido intraautofagosómico en el autofagolisosoma (Glick et al., 2010; Yamamoto & Matsui, 2024) (Figura 5).

#### **3.2.2.1 La inducción de la autofagia**

La inducción de la autofagia puede ser desencadenada por varios estímulos tanto intracelulares como extracelulares, como la carencia de nutrientes (falta de aminoácidos, por ejemplo). También hay otras circunstancias que pueden dar lugar a la inducción de la autofagia, como el estrés oxidativo, que induciría la autofagia para reciclar orgánulos dañados, como las mitocondrias. El inicio de la formación de la membrana de aislamiento o fagóforo, una estructura precursora de los autofagosomas, cuando existe una situación de estrés celular, ocurre en la membrana del retículo endoplasmático (RE), aunque es necesaria la contribución de otros compartimentos intracelulares, como el aparato de Golgi.

En condiciones de abundancia de nutrientes, la quinasa mTORC1 hiperfosforila activamente a ATG13 y bloquea la interacción de ATG13 con ULK1 y FIP200, impidiendo la formación del complejo ULK (Nazio & Cecconi, 2017). Sin embargo, cuando las células son estimuladas por factores intracelulares y extracelulares inductores de la autofagia, se inicia un proceso que permite la formación de la EPA, un sitio crucial para la formación de

autofagosomas, donde casi todas las proteínas relacionadas con la autofagia se reúnen jerárquicamente, y de esta forma se inicia la autofagia. Esta estructura desempeña un papel crítico como una estructura de acoplamiento para el reclutamiento de proteínas ATG durante la inducción de la autofagia. La formación de la EPA requiere la activación del complejo quinasa ULK1/2-ATG13-RBCC1/FIP200-ATG101. Este complejo es fundamental en el inicio de la autofagia en la EPA al permitir el reclutamiento de más proteínas ATG. FIP200 llega en primer lugar a la EPA y adopta una forma que permite su unión a ULK1/2-ATG13. ATG13 se une a ATG 17 y a ULK 1-2. Estas uniones permiten la activación final de este complejo central con actividad quinasa. Bajo condiciones inductoras de la autofagia, el complejo ULK actúa como el complejo de inicio de la autofagia, siendo ATG13 una proteína crucial para la localización de ULK1 en esta EPA y la interacción de FIP200 con ULK1. A medida que se forma la EPA, otras unidades funcionales, como el complejo PI3KC3, el sistema ATG9, el sistema de conjugación ATG12 y el sistema de conjugación LC3, se dirigen a la EPA de manera jerárquica y participan en la formación y ensamblaje de autofagosomas (Imai et al., 2016; Levine & Kroemer, 2019; X. Li et al., 2020).

Después de la formación del complejo ULK, el reclutamiento de vesículas citoplasmáticas que contienen ATG9 es el siguiente paso y estas vesículas son esenciales en la nucleación de autofagosomas. La fosforilación de ATG9 por el complejo ULK permite el reclutamiento de proteínas como LC3/ATG8 y WIPI1/2/ATH18, necesarias para la expansión y elongación del fagóforo. Una vez que los autofagosomas se fusionan con las vacuolas, las vesículas ATG9 se reciclan como nuevas vesículas ATG9. La cantidad de ATG9 expresada en las células se relaciona con la frecuencia de formación de autofagosomas. Se ha observado que las vesículas ATG9 se originan y se transportan desde el aparato de Golgi en condiciones fisiológicas normales. Estudios recientes sugieren que el inicio de la formación de autofagosomas ocurre cuando las vesículas ATG9 se unen con el RE (Hu & Reggiori, 2022).

**Tabla 1:** resumen de las principales proteínas implicadas en la autofagia y su función.

| Proteína                                | Función                                                                                                                            |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ATG</b>                              | Esenciales para la formación del autofagosoma y cada una tiene una función específica durante todo el proceso de la autofagia      |
| <b>ULK1/2</b>                           | Forma parte del complejo ULK1-2, crucial en el inicio de la autofagia en la EPA                                                    |
| <b>ATG2A/B</b>                          | Fundamental para la formación del autofagosoma, al formar parte del complejo proteico ATG9/12-WIPI                                 |
| <b>ATG3</b>                             | Forma el complejo ATG12-ATG3, necesario para mantener la homeostasis mitocondrial                                                  |
| <b>ATG4A-D</b>                          | Proteína cisteína proteasa que actúa sobre ATG8, eliminando su último aminoácido y activando LC3                                   |
| <b>ATG5</b>                             | Crucial en el proceso de formación y elongación del autofagosoma, al formar el complejo ATG12-ATG5                                 |
| <b>Beclin 1</b>                         | Forma parte del complejo VPS34-PI3K e interactúa con Bcl-2, permitiendo la unión de lípidos y la formación de membranas            |
| <b>ATG7</b>                             | Participa en la conjugación de LC3 y ATG12 y se une a ATG8                                                                         |
| <b>MAP1, LC3A-C, GABARAPs y GATE-16</b> | Proteínas fundamentales en la formación y anclaje de la membrana del autofagosoma                                                  |
| <b>ATG9L1/L2</b>                        | Proteína transmembrana que interactúa con el complejo ATG2-WIPI, fundamental en la formación y expansión del fagóforo              |
| <b>ATG 10</b>                           | Enzima clave en la conjugación de ATG12 con ATG5                                                                                   |
| <b>ATG 12</b>                           | Forma un complejo con ATG5 y ATG16                                                                                                 |
| <b>ATG13</b>                            | Forma parte del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200, necesario para el inicio de la autofagia                                         |
| <b>ATG14L</b>                           | Participa en la formación y la curvatura de membranas y promueve la fusión de estas. Forma parte del complejo VPS34-PI3K           |
| <b>ATG16L1/L2</b>                       | Se une al complejo ATG5-ATG12 y forma parte de complejo enzimático E3                                                              |
| <b>RB1CC1/FIP200</b>                    | Participa en el inicio de la autofagia y la formación y curvatura de la membrana. Forma parte del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200 |
| <b>WIPI1-4</b>                          | Permite el reclutamiento de ATG9 en el autofagosoma ya que forma parte del complejo ATG2-WIPI                                      |
| <b>ATG101</b>                           | Interactúa con ATG13 y forma parte del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200, implicado en el inicio de la autofagia                    |

### **3.2.2.2 El ensamblaje y la formación del autofagosoma**

El ensamblaje y la formación final de un autofagosoma maduro implica la nucleación de múltiples proteínas ATG en la EPA, la elongación de la membrana de aislamiento y la maduración del autofagosoma. Como se ha descrito anteriormente, la EPA recluta múltiples proteínas ATG para la coordinación y formación de la membrana de aislamiento o fagóforo (J. Wang et al., 2017). Este reclutamiento o nucleación se inicia por el complejo ULK1/ATG1 y, cuando se producen circunstancias que inducen la autofagia, ULK1/ATG1 forma otro complejo de proteínas con ATG13, FIP200/ATG17, ATG29 y ATG31, y este complejo cambia de estructura para generar el complejo “andamio” de la EPA. Posteriormente, en la EPA se une el complejo PI3K que participa en la formación del fagóforo a través de la interacción y unión de ATG14L con ATG13 (H. Huang et al., 2023). La activación del complejo quinasa lipídica de clase III (PI3K de clase III o PI3KC3) en el RE es un paso crucial en todo el proceso y regulación de la autofagia, produciendo unas estructuras llamadas omegasomas. Estas estructuras, precursoras de los fagóforos, tienen una disposición que permiten el reclutamiento, a su vez, de otras proteínas como PtdIns3P, proteínas WIPI, y ATG12-ATG5-ATG17L1. El complejo PI3KC3 tiene dos formas distintas: el complejo 1 (PI3KC3-C1) y el complejo 2 (PI3KC3-CII). Ambos contienen las subunidades VPS34, VPS15 y Beclin1. Además, PI3KC3-C1 contiene el complejo ATG14L/Barkor y PI3KC3-C2 contiene VPS38. El complejo PI3KC3-CI se localiza en la EPA y es responsable de la producción de fosfatidilinositol 3 fosfato, que es esencial para el alargamiento y la finalización de los autofagosomas y su unión a ATG18. El complejo PI3KC3-CII se localiza en las membranas vacuolares y endosómicas y desempeña un papel en el transporte de vesículas. En las células de mamíferos, Beclin1 es un regulador central que interactúa con una multitud de proteínas, incluyendo ATG14L, VPS34, entre otras, permitiendo regular el tamaño y el número de autofagosomas (H. Huang et al., 2023) (J. Wang et al., 2017). Por otra parte, la proteína ATG9A se asocia con el complejo ATG2-WIPI y mediante la interacción con FIP200 se unen a la EPA (van Vliet et al., 2022). Estas complejas

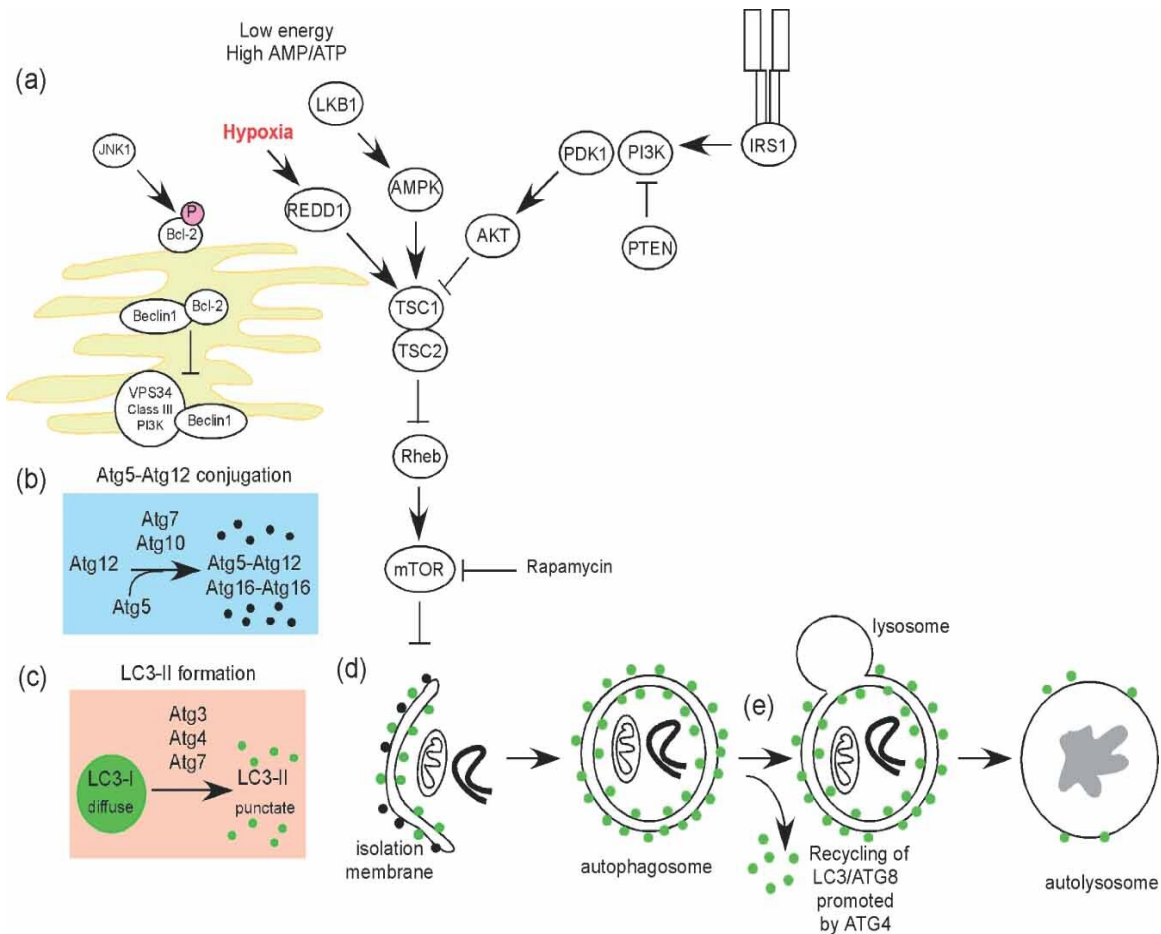
interacciones permiten la formación del fagóforo o membrana de aislamiento que, una vez formado, se alarga, envuelve y engulle porciones del citoplasma y los orgánulos.

Finalmente, la formación final de esta membrana de aislamiento y como consecuencia del autofagosoma, requiere, además, la participación de dos sistemas de conjugación similares a la ubiquitina en los que están implicadas varias proteínas ATG, entre las que destacan, ATG12 y LC3. ATG12 se activa gracias a la enzima E1 (ATG7) y se conjuga con ATG5 mediante la enzima E2 (ATG10). Finalmente, se forma el complejo ATG12-ATG5-ATG16L, crucial para la formación del sistema de conjugación LC3. LC3, proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3, es el homólogo en levadura de ATG8. LC3 se sintetiza como una proteína precursora llamada proLC3. El péptido C-terminal de proLC3 se separa mediante la acción de enzimas homólogas a ATG4B de mamíferos, creando LC3-I. LC3-I, que es una proteína soluble en el citosol, se activa mediante la enzima E1 (ATG7) y se transfiere a la enzima E2 (ATG3). Luego, LC3-I se modifica y se convierte en una proteína unida a la membrana, conocida como LC3-II. El complejo ATG12-ATG5-ATG16L actúa como una enzima en la reacción de conjugación de LC3-II. Este complejo es esencial para el proceso de autofagia, ya que facilita la unión de LC3 a membranas (van Vliet et al., 2022). El proceso de conjugación y modificación es esencial para que LC3 cumpla su función en la elongación de la membrana de los autofagosomas y la formación de un autofagosoma maduro con una membrana bilaminar cerrada, es decir, una membrana interna y externa (Schaaf et al., 2016).

### **3.2.2.3 Acoplamiento y fusión del autofagosoma con lisosomas**

Para el acoplamiento y la fusión de los autofagosomas con las membranas lisosomales es necesario que los autofagosomas maduros sean transportados a la región perinuclear, donde se encuentran los lisosomas para la fusión autofagosoma-lisosoma. Una vez se produce este desplazamiento a la región perinuclear, se acoplan y fusionan inmediatamente con los lisosomas, formando así el autofagolisosoma (Lőrincz & Juhász, 2020).

Los lisosomas ejercerán su función de degradación de las macromoléculas (membrana, proteínas u orgánulos) que contiene el autofagosoma, ya unido al lisosoma,



**Figura 5:** Las vías moleculares y los mecanismos de señalización que controlan la autofagia (Glick et al., 2010)

La autofagia es un proceso autodegradativo complejo que se desarrolla en varias etapas fundamentales:

- (a) la formación del fagóforo es regulada por Beclin-1/VPS34 en el retículo endoplásmico y otras membranas en respuesta a señales de estrés;
- (b) se produce la conjugación de ATG5 con ATG12, que interactúa con ATG16L y se multimeriza en el fagóforo;
- (c) el procesamiento de LC3 permite su incorporación en la membrana en expansión del fagóforo;
- (d) se capturan objetivos, tanto aleatorios como selectivos, para su degradación, se completa el autofagosoma, y algunas moléculas de LC3-II/ATG8 son recicladas por ATG4, seguido de:
- (e) la fusión del autofagosoma con el lisosoma permite que las proteasas lisosomales degraden las moléculas ingeridas.

mediante enzimas como las hidrolasas lisosómicas, y de esta forma se obtienen aminoácidos y péptidos que pueden ser reutilizados por las células (Tian et al., 2021).

Previamente se ha mencionado que uno de los orgánulos que también tiene una gran implicación en el proceso de la autofagia es el complejo de Golgi. A través de su superficie, que contiene numerosos receptores para vesículas, se produce el transporte bidireccional de las mismas. Su papel es esencial para la formación y almacenamiento de vesículas que puedan, ante una situación de estrés, liberarse para permitir la formación de autofagosoma (De Tito et al., 2020).

### **3.3 Enfermedades no oncológicas relacionadas con la autofagia**

La autofagia es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular, tisular y del propio organismo, ya que permite la adaptación al estrés celular y metabólico, la degradación de orgánulos disfuncionales, proteínas y microorganismos intracelulares patógenos y la prevención del daño genómico. Una deficiencia del proceso de la autofagia, causada por ejemplo por mutación en algún gen *ATG*, se relaciona con enfermedades humanas, como trastornos neurodegenerativos, infecciosos o el cáncer. Por ello, la autofagia y su regulación se ha convertido en un objetivo potencial en medicina. Merece la pena mencionar algunos genes que desempeñan un papel crucial en la regulación de la autofagia y cuyas alteraciones pueden alterar el proceso y ser la causa del desarrollo de enfermedades (Tabla 2):

*ATG16L1* en la enfermedad de Crohn. Las personas con variantes genéticas de este gen tienen niveles más bajos de la proteína *ATG16L1* y se ha relacionado con efectos negativos en la regulación de la autofagia y la respuesta inmunitaria (Amre et al., 2009). Los estudios en ratones con esta variante muestran una disminución en la depuración de bacterias intestinales y otros efectos perjudiciales en la mucosa intestinal (Homer et al., 2010).

*ATG16L2* en lupus eritematoso sistémico. El alelo *ATG16L2* R114W se ha relacionado con una mayor incidencia de esta enfermedad autoinmune (Lessard et al., 2016).

*ATG5* en ataxia infantil y esclerosis sistémica. Alteraciones en este gen que produzcan una pérdida de su función se asocian con ataxia en niños. Se han descrito, además, alteraciones en *ATG5* que asocian con una mayor susceptibilidad a la esclerosis sistémica y el lupus eritematoso sistémico (Mayes et al., 2014).

*ATP6AP2* relacionada con trastornos tipo Parkinson. Mutaciones en *ATP6AP2*, que tiene un papel en la función lisosomal y la autofagia, incluyendo deleciones de exones, están relacionadas con el desarrollo de parkinsonismo y trastornos del movimiento (H. V. Gupta et al., 2015).

*CLEC16A* en diabetes (Soleimanpour et al., 2014) y esclerosis múltiple. Alteraciones en *CLEC16A* se asocian con múltiples enfermedades autoinmunes. Estudios en ratones han demostrado que pérdidas en la función de este gen producen defectos en la autofagia, ataxia de Purkinje y otras enfermedades autoinmunes (Smits et al., 2023).

*CTNS* en cistinosis. Esta enfermedad causada por un defecto en el almacenamiento lisosomal y que produce afectación renal, entre otros órganos, se ha relacionado con alteraciones en este gen y defectos en la vía de la autofagia (Jaradat et al., 2015).

*EPG5* en el síndrome de Vici. Mutaciones recesivas en *EPG5* causan el síndrome de Vici, un trastorno neurológico multisistémico que afecta la fusión autofágica (Mahjoubi et al., 2022).

*GBA* en la enfermedad de Gaucher y Parkinson. Las mutaciones en *GBA1* causan la enfermedad de Gaucher. Además, las mutaciones heterocigotas en *GBA1* predisponen a la enfermedad de Parkinson debido a defectos en la función lisosomal y la autofagia (Smith & Schapira, 2022).

*GRN* en demencia frontotemporal y lipofuscinosis neuronal ceroid. Las mutaciones de pérdida de función en *GRN* comprometen la función lisosomal y la autofagia, lo que se asocia con estas dos entidades clínicas (Gerrits et al., 2022).

*LAMP2* en la cardiomiopatía de Danon. La pérdida de la función del gen *LAMP2* en el cromosoma X da como resultado la cardiomiopatía de Danon, una enfermedad caracterizada por la acumulación de autofagosomas y disfunción autofágica (D. Liu et al., 2023).

*PIK3R4* (VPS15) en la atrofia cortical y epilepsia. Las mutaciones en *PIK3R4*, un componente del complejo Beclin 1, están asociadas a trastornos neuromusculares y del movimiento (Y. Liu et al., 2022).

*SNX14* en la ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva. *SNX14* tiene un papel relevante en la formación del autofagosoma y una mutación que provoque la pérdida de su función se ha relacionado con esta enfermedad (Bryant et al., 2018).

*SPG11*, *SPG15* y *SPG49* en la Paraplejía Espástica Hereditaria. Estos genes están involucrados en la unión del autofagosoma con el lisosoma y, mutaciones en ellos, pueden contribuir a esta enfermedad neurológica (Pedroso et al., 2023).

*WDR45* (*WIPI4*) en la enfermedad neurodegenerativa asociada a proteína beta-amiloide. *WDR45* se une al fosfoinositol 3-fosfato e interactúa con *ATG2* y *ATG9*. Se ha relacionado este gen con esta enfermedad neurodegenerativa (Cong et al., 2021).

*AT-1* (*SLC33A1*) en paraplejía espástica, retraso del desarrollo y trastornos del espectro autista. Este gen tiene un papel en la lisis lisosomal del autofagosoma y su alteración se ha relacionado con estas complejas enfermedades (Hullinger et al., 2016).

*C9orf72* en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y demencia frontotemporal. La alteración del gen *C9orf72* es una de las causas genéticas más comunes de ELA y demencia frontotemporal. Este gen regula la autofagia y la homeostasis lisosomal (Brown et al., 2021).

*GPR65* en la enfermedad inflamatoria intestinal. Este gen también está relacionado con la autofagia y una mutación inactivadora altera la acidificación lisosomal, disminuye la eliminación de bacterias intracelulares y altera el metabolismo de los lípidos (G. Li et al., 2023).

*IRGM* en enfermedad hepática no alcohólica por acumulación de grasa (Ren et al., 2024) y la enfermedad de Crohn (Mehto et al., 2019). *IRGM* participa en la formación y activación de la maquinaria de autofagia.

*RAB7A* en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2B. Las mutaciones en *RAB7A* reducen el flujo autofágico en células HeLa y fibroblastos y se han relacionado con esta enfermedad (Cogli et al., 2013).

*PTPN2* en la enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes tipo 1 y artritis juvenil. SNPs en este gen se han asociado a estas enfermedades. Se trata de un gen que codifica una

proteína tirosina fosfatasa no receptora y cuya función se relaciona con los macrófagos y la lisis de autofagosomas (Spalinger et al., 2020).

Existen otras múltiples enfermedades no oncológicas relacionadas con la vía de la autofagia en alguno de sus puntos importantes y el conocimiento sobre todo ello está en auge.

**Tabla 2:** Alteraciones en genes implicados en la autofagia que están relacionadas con diversas enfermedades no oncológicas.

| Gen                               | Enfermedad                                               | Descripción                                                                                                                                           |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>ATG16L1</i>                    | Enfermedad de Crohn                                      | Niveles más bajos de la proteína <i>ATG16L1</i> se han relacionado con efectos negativos en la regulación de la autofagia y la respuesta inmunitaria. |
| <i>ATG16L2</i>                    | Lupus eritematoso sistémico                              | El alelo <i>ATG16L2</i> R114W se ha relacionado con una mayor incidencia.                                                                             |
| <i>ATG5</i>                       | Ataxia infantil y esclerosis sistémica                   | Alteraciones en <i>ATG5</i> asocian con una mayor susceptibilidad a la esclerosis sistémica y el lupus eritematoso sistémico.                         |
| <i>ATP6AP2</i>                    | Trastornos tipo Parkinson                                | Mutaciones en <i>ATP6AP2</i> , que tiene un papel en la función lisosomal y la autofagia, incluyendo delecciones de exones.                           |
| <i>CLEC16A</i>                    | Diabetes y esclerosis múltiple                           | Pérdidas en la función de este gen producen defectos en la autofagia, ataxia de Purkinje y otras enfermedades autoinmunes.                            |
| <i>CTNS</i>                       | Cistinosis                                               | Defecto en el almacenamiento lisosomal con posible afectación multiorgánica.                                                                          |
| <i>EPG5</i>                       | Síndrome de Vici                                         | Mutaciones recesivas en <i>EPG5</i> afectan la fusión autofágica.                                                                                     |
| <i>GBA</i>                        | Enfermedad de Gaucher y Parkinson                        | Las mutaciones en <i>GBA1</i> causan defectos en la función lisosomal y la autofagia.                                                                 |
| <i>GRN</i>                        | Demencia frontotemporal y lipofuscinosis neuronal ceroid | Las mutaciones de pérdida de función en <i>GRN</i> comprometen la función lisosomal y la autofagia.                                                   |
| <i>LAMP2</i>                      | Cardiomiopatía de Danon                                  | La pérdida de la función del gen <i>LAMP2</i> produce la acumulación de autofagosomas y disfunción autofágica.                                        |
| <i>PIK3R4</i><br>( <i>VPS15</i> ) | Atrofia cortical y epilepsia                             | Las mutaciones en <i>PIK3R4</i> , (complejo Beclin 1) están asociadas a trastornos neuromusculares y del movimiento.                                  |
| <i>SNX14</i>                      | Ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva              | <i>SNX14</i> tiene un papel relevante en la formación del autofagosoma.                                                                               |

|                                    |                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>SPG11, SPG15 y SPG49</i></b> | Paraplejía Espástica Hereditaria                                                    | Estos genes están involucrados en la unión del autofagosoma con el lisosoma.                                                                                                                                    |
| <b><i>WDR45 (WIP14)</i></b>        | Enfermedad neurodegenerativa asociada a proteína beta-amiloide                      | <i>WDR45</i> se une al fosoinositol 3-fosfato e interactúa con <i>ATG2</i> y <i>ATG9</i> .                                                                                                                      |
| <b><i>AT-1 (SLC33A1)</i></b>       | Paraplejía espástica, retraso del desarrollo y trastornos del espectro autista      | Este gen tiene un papel en la lisis lisosomal del autofagosoma.                                                                                                                                                 |
| <b><i>C9orf72</i></b>              | Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y demencia frontotemporal                      | Este gen regula la autofagia y la homeostasis lisosomal.                                                                                                                                                        |
| <b><i>GPR65</i></b>                | Enfermedad inflamatoria intestinal                                                  | Una mutación inactivadora altera la acidificación lisosomal, disminuye la eliminación de bacterias intracelulares y altera el metabolismo de los lípidos.                                                       |
| <b><i>IRGM</i></b>                 | Enfermedad hepática no alcohólica por acumulación de grasa y la enfermedad de Crohn | <i>IRGM</i> participa en la formación y activación de la maquinaria de autofagia.                                                                                                                               |
| <b><i>RAB7A</i></b>                | Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2B                                           | Las mutaciones en <i>RAB7A</i> reducen el flujo autofágico en células HeLa y fibroblastos.                                                                                                                      |
| <b><i>PTPN2</i></b>                | Enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes tipo 1 y artritis juvenil              | SNPS en este gen se han asociado a estas enfermedades. Se trata de un gen que codifica una proteína tirosina fosfatasa no receptora y cuya función se relaciona con los macrófagos y la lisis de autofagosomas. |

#### 4. La autofagia y su relación con el cáncer

En el cáncer, la autofagia desempeña un papel importante (Debnath et al., 2023; J. Liu & Debnath, 2016) y que incluye funciones con actividad supresora, neutral y promotora de tumores. Este papel va a depender de diferentes condiciones como el nivel de estrés en el microambiente tumoral, la disponibilidad de nutrientes, las condiciones patógenas y el sistema inmunológico (Burada et al., 2015).

En el desarrollo del cáncer, el papel de la autofagia depende del tipo de cáncer, el estadio y la base molecular y genética. Por un lado, la autofagia mantiene la estabilidad genómica, evitando el daño tisular persistente, el daño celular y la inflamación, al tener una función de control de calidad de proteínas y orgánulos, que incluye la eliminación de mitocondrias y proteínas disfuncionales (Degenhardt et al., 2006). También, puede actuar como supresor de tumores evitando la acumulación de agregados proteicos oncogénicos y,

por tanto, frustrando la iniciación, proliferación, invasión y metástasis del tumor, especialmente en las fases tempranas de la carcinogénesis (Russell & Guan, 2022). Por otro lado, se ha descrito sobre todo en las etapas avanzadas del cáncer, el papel de la autofagia como un escudo celular, fortaleciendo mecanismos de supervivencia y defensa (Yun & Lee, 2018). Protege mitocondrias funcionales, reduce el daño al ADN y aumenta la resistencia de las células cancerosas contra factores estresantes, como la escasez de nutrientes, hipoxia, daño al ADN, estrés metabólico y los tratamientos sistémicos, como la QT. Por ello, también juega un papel importante en el mantenimiento del metabolismo, crecimiento y supervivencia del tumor, fomentando la tumorogénesis y favoreciendo la resistencia a los agentes terapéuticos (Russell & Guan, 2022)

El nivel de expresión de genes relacionados con la autofagia varía en diferentes tipos de cáncer. *Beclin1* es un gen esencial en la autofagia y diversos estudios han demostrado una falta de expresión de este gen en cánceres como el de mama, ovario, próstata, pulmón o de hígado, lo que indica el papel de este gen como supresor de tumores (Perna & Dubey, 2022). A su vez, se han encontrado alteraciones genéticas, como mutaciones o deleciones, en otros genes relacionados con la autofagia como *ATG2*, *ATG5*, *ATG9*, *ATG12*, *ATG16* en el CCR (Jin et al., 2024) o cáncer gástrico (M. Wang et al., 2021). La delección homocigótica de *ATG5* se ha relacionado con el cáncer de hígado en modelos de ratón, al igual que mutaciones puntuales en *ATG5* en el cáncer gástrico, colorrectal, próstata y de hígado (Z. Ma et al., 2024).

#### **4.1 La autofagia y su relación con el cáncer colorrectal**

La desregulación de la autofagia en el CCR es un fenómeno bien documentado, y se ha observado una alteración de moléculas clave de este proceso, como Beclin1, p62/sequestosoma y LC3, en un gran porcentaje de carcinomas colorrectales (Park et al., 2013). Además, estudios genéticos han revelado que los genes implicados en la autofagia suelen presentar mutaciones en las células del cáncer de colon. Entre estos, los reguladores positivos de la autofagia, como Bif-1, juegan un papel crucial en el desarrollo de varios tipos de cáncer, incluyendo el adenocarcinoma de colon (Coppola et al., 2008). La capacidad de la autofagia para actuar como un mecanismo de resistencia al tratamiento es de particular

interés, ya que prolonga la supervivencia de las células tumorales. Este proceso también contribuye al mantenimiento y supervivencia de las células madre del CCR durante el tratamiento con oxaliplatino, un agente quimioterapéutico comúnmente utilizado (H. Z. Yang et al., 2015). Asimismo, tiene un papel clave en la respuesta a otros tratamientos ampliamente utilizados en CCRm como los anticuerpos monoclonales contra EGFR (Zhou et al., 2021) o los anticuerpos monoclonales dirigidos al receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (W. Li et al., 2024).

En relación con la importancia de la autofagia en la respuesta al tratamiento, se ha demostrado que la inhibición de la autofagia con hidroxiclороquina puede potenciar la eficacia del vorinostat, un inhibidor de histona deacetilasa, en modelos preclínicos y estudios clínicos en fases iniciales de CCRm (S. Patel et al., 2016). Por otro lado, la autofagia descontrolada también puede jugar un papel en la regulación de la inflamación y en la modulación de los procesos inmunitarios multicelulares, afectando a una variedad de células inmunitarias, como macrófagos, células T y B, neutrófilos y células dendríticas (Gerada & Ryan, 2020). Además, influye en las respuestas de memoria inmunitaria, la diferenciación celular y la estabilidad genómica, y puede incluso inducir la muerte celular a través de varias vías (Galluzzi et al., 2015). Específicamente, se ha descubierto que la autofagia regula la inmunidad a través de señales dependientes del inflammasoma NLRP3 y mediante la acción de proteínas ATG que operan independientemente del inflammasoma (Deretic et al., 2013; Matsuzawa-Ishimoto et al., 2018; Ngabire & Kim, 2017). A pesar de estos descubrimientos que destacan la relevancia de la autofagia en el desarrollo del CCR, la supervivencia de las células tumorales y la inmunidad del huésped, aún no se comprende completamente cómo este proceso biológico influye en el CCR, lo que podría depender de su regulación a lo largo de la progresión de la enfermedad (Galluzzi et al., 2015).

Las variantes genéticas conocidas como SNPs representan la forma más común de variación genética en la población humana (Taylor et al., 2001). Los SNPs, al introducir cambios sutiles en la secuencia del ADN, tienen la capacidad de influir en la expresión génica y en la función de las proteínas codificadas, actuando como moduladores clave en numerosos procesos biológicos (Erichsen & Chanock, 2004). Dependiendo de su ubicación, los SNPs pueden afectar regiones codificantes, reguladoras o de *splicing* de los genes, lo que puede

resultar en una alteración de los niveles de transcripción, la estabilidad del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) o la eficiencia de la traducción. En el contexto del cáncer, estos cambios pueden desempeñar un papel crucial, modulando la susceptibilidad a la enfermedad, su progresión y la respuesta al tratamiento (Clapper, 2000). En particular, los SNPs en genes relacionados con la autofagia pueden alterar la regulación de este proceso, que es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular y la respuesta al estrés (Tamargo-Gómez et al., 2020), y, por lo tanto, afectar la evolución de enfermedades como el CCR.

Dado el papel central de la autofagia en la carcinogénesis, supervivencia y el crecimiento celular, las investigaciones sobre variantes genéticas en genes relacionados con este proceso y su posible relación con el riesgo de CCR y el pronóstico de los pacientes ofrecen la oportunidad de conocer mejor los mecanismos moleculares subyacentes en la carcinogénesis. Hasta la fecha, se ha descrito un número limitado de SNPs en genes de autofagia que se asocian con un mayor riesgo de CCR (Nicoli et al., 2014; Zeng et al., 2016) o que influyen en la supervivencia de los pacientes (Grimm et al., 2016). Sin embargo, estos estudios son aún incipientes, y se requiere una comprensión más profunda de cómo estas variantes genéticas pueden modular la función de la autofagia y, en última instancia, contribuir al desarrollo y al pronóstico de la enfermedad.

En este contexto, nuestro estudio se propuso realizar una evaluación exhaustiva de las variantes germinales en genes relacionados con la autofagia, evaluando su asociación tanto con el riesgo de CCR como con el pronóstico de los pacientes. Además, dado que la autofagia mantiene una estrecha interacción con las respuestas inmunitarias del huésped (Grimm et al., 2016; Y. Ma et al., 2013), nuestra investigación también se enfocó en evaluar las consecuencias funcionales a nivel inmunológico de los SNPs más relevantes.

En definitiva, con este estudio, pretendemos ampliar el conocimiento sobre la implicación de los genes de autofagia en el CCR, profundizando en los mecanismos funcionales que vinculan estas variantes genéticas con el desarrollo y el pronóstico de la enfermedad.



# ***HIPÓTESIS***



## **HIPÓTESIS**

El CCR es una de las principales causas de muerte a nivel global y su desarrollo se debe a factores genéticos y ambientales. La autofagia, un proceso celular esencial para mantener la homeostasis, está regulada por genes específicos y juega un papel crucial en la respuesta al estrés celular y la eliminación de componentes intracelulares dañados. Recientes estudios han demostrado la importancia de la autofagia en la patogénesis del CCR.

Este estudio propone investigar la relación entre SNPs en 234 genes de autofagia y el CCR, analizando tanto el riesgo de CCR como el pronóstico de los pacientes. Se plantea que las variaciones en estos genes pueden influir en la susceptibilidad a desarrollar CCR a través de la modulación del flujo de autofagia y determinar otros importantes procesos como la respuesta inmunitaria e inflamatoria, procesos cruciales en la progresión del cáncer. Demostrar que las variantes genéticas influyen sobre el riesgo a desarrollar CCR y el pronóstico de los pacientes podría ayudar a sentar las bases para futuras investigaciones en prevención y tratamiento de esta grave enfermedad.

En este contexto, nuestras hipótesis son las siguientes:

- 1. Influencia genética en la predisposición al CCR:** Las variaciones genéticas en los genes relacionados con la autofagia desempeñarían un papel crucial en el riesgo de desarrollar CCR. Los polimorfismos en estos genes modificarían procesos biológicos fundamentales, influyendo en la susceptibilidad del individuo al desarrollo de CCR.
- 2. Influencia de los marcadores genéticos de la autofagia en la SG de los pacientes con CCR:** La variación genética germinal en los genes de la vía de la autofagia influiría en el pronóstico de los pacientes con CCR y, por ende, en su supervivencia. Los resultados de este estudio aportarían información sobre los mecanismos por los cuales estas variaciones genéticas contribuyen al pronóstico de los pacientes.

**3. Función específica de los SNPs:** Ciertos SNPs en genes relacionados con la autofagia actuarían como factores determinantes en la modulación del riesgo de CCR y su progresión, influyendo en la respuesta inmunitaria y en otras vías biológicas implicadas en la patogénesis del cáncer. La alteración de la respuesta inmunitaria del huésped, la modificación del recuento de células sanguíneas y la variación en los niveles séricos de proteínas inflamatorias estarían influenciadas por estos SNPs en los genes de autofagia.



# ***OBJETIVOS***



### OBJETIVOS

Basado en nuestras hipótesis de partida, el objetivo principal del estudio fue investigar la influencia de las variantes genéticas relacionadas con la autofagia en el riesgo a desarrollar CCR y su impacto sobre el pronóstico de los pacientes.

Para conseguir este objetivo principal, se establecieron varios objetivos específicos:

1. Analizar exhaustivamente las variantes genéticas en 234 genes relacionados con la autofagia para determinar su asociación con el riesgo de CCR. Este análisis incluye el genotipado y el meta-análisis de datos obtenidos en cuatro grandes cohortes europeas.
2. Analizar si los marcadores genéticos relacionados con la autofagia influyen en el pronóstico de los pacientes definido a través de la SG.
3. Realizar una caracterización funcional para evaluar el impacto de los SNPs asociados con el riesgo a desarrollar CCR y la SG de los pacientes en la modulación de la respuesta inmune mediante estudios de estimulación *in vitro* en PBMCs, el análisis del recuento de poblaciones celulares en sangre periférica y el análisis de biomarcadores inflamatorios y hormonas esteroideas en suero.
4. Investigar si los SNPs significativamente asociados con el riesgo a desarrollar CCR y la SG de los pacientes influyen sobre el flujo de la autofagia, utilizando experimentos de estimulación e inhibición de la autofagia en una cohorte de donantes sanos.
5. Predecir, mediante herramientas bioinformáticas (análisis *in silico*), el posible impacto funcional de los SNPs asociados con el riesgo a desarrollar CCR y la SG de los pacientes en diferentes tipos de células humanas y su correlación con la expresión de ARNm en tejidos específicos, con el fin de comprender mejor el papel de estas variantes en la patogénesis y pronóstico del CCR.



# ***MATERIAL Y MÉTODOS***



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Población de estudio

Para el análisis de asociación de las variantes genéticas con el riesgo de CCR, el estudio incluyó cuatro poblaciones europeas. La primera de ellas incluyó 7998 individuos (4485 pacientes con CCR y 3513 controles sanos) reclutados en el contexto del estudio DACHS en el suroeste de Alemania. En esta cohorte, había una proporción mayor de hombres (60.6%) en comparación con mujeres (39.4%) entre los casos de CCR, la mayoría en el rango de edad de 60 a 79 años. Un 14.4% reportó tener antecedentes familiares de CCR. Del total de casos, el 40.1% nunca había fumado y el 43.8% eran exfumadores. Una gran proporción presentaba un índice de masa corporal (IMC) de 25-29.9 kg/m<sup>2</sup> (42.4%) y el 27.8% había tomado anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) regularmente. Además, un 84.1% de los casos había participado en programas de cribado de CCR. (La tabla S1 proporciona las características demográficas y clínicas de los participantes). Los casos de CCR fueron seleccionados entre pacientes atendidos en hospitales de la región de Rhein-Neckar-Odenwald tras su primer diagnóstico. Los controles se emparejaron según su género, grupo de edad (definido en intervalos de cinco años) y lugar de residencia, siendo contactados por correo y teléfono. Se obtuvieron datos demográficos, antecedentes de colonoscopias, información sobre dieta, medidas antropométricas, actividad física, uso de medicación (estatinas, AINEs, terapia hormonal para la menopausia etc.), factores reproductivos, estilo de vida e historia familiar mediante entrevistas presenciales con cuestionarios estandarizados. Los participantes debían tener al menos 30 años y capacidad para completar la entrevista.

Las otras tres cohortes del estudio utilizadas para el análisis de asociación con el riesgo de CCR incluyeron el estudio CCRGen, el estudio *COloRectal cancer Study of Austria* (CORSa) y el estudio *Czech Republic Colorectal Cancer Study* (CCS). El estudio CCRGen reunió muestras de 948 pacientes españoles con CCR y 1076 controles sanos. En cuanto al género, en los pacientes con CCR predominaban los hombres (64.45%) frente a las mujeres

(35.55%). Entre los controles, la distribución fue más equitativa con un 51.02% de hombres y un 48.98% de mujeres. La mayoría de los casos de CCR se concentraron entre los 60-69 años (30.17%) y los 70-79 años (33.76%), mientras que los controles también se concentraron, en gran medida, en los grupos de edad de 60-69 años (35.50%) y 70-79 años (24.63%). Un 43.67% de los pacientes con CCR nunca había fumado, mientras que un 40.82% eran exfumadores. Entre los controles, un 51.39% nunca había fumado y un 31.13% eran exfumadores. La mayoría de los casos de CCR tenía un IMC entre 25-29.9 kg/m<sup>2</sup> (40.19%), similar a los controles. El 14.78% de los pacientes con CCR tomaba AINEs, en contraste con un 27.53% de los controles. En esta cohorte también se recogieron datos de PRS (puntuación de riesgo poligénico) y los pacientes con CCR se distribuyeron según si su puntuación era baja (22.25%), media (34.18%) o alta (43.57%). La mayor parte de los tumores estaban localizados en el lado izquierdo (71.84%), mientras que un 26.79% se encontraron en el lado derecho. (En la tabla S2 se presentan las características de los pacientes de manera más detallada). Finalmente, el estudio CORSA incluyó 968 casos y 848 controles negativos en colonoscopias y el estudio CCS reclutó a 1605 casos de CCR y 1633 controles sanos.

Para el análisis de asociación con la SG, se utilizaron las poblaciones de DACHS y CRCgen y la población de CRC Jaén como cohorte de replicación. Esta última cohorte incluyó 212 muestras de pacientes con CCR con una media de edad de 61 años, siendo la mayoría hombres. El 41,52% de los pacientes tenía un CCR estadio IV, mientras que un 37,27% tenía un estadio III. Para el análisis de SG, la media de tiempo de seguimiento fue 44.91 meses. (La tabla S3 proporciona las características clínicas de los pacientes)

Todos los participantes del estudio dieron su consentimiento informado por escrito y las investigaciones fueron aprobadas por los comités éticos de las instituciones correspondientes: *Medizinische Fakultät Heidelberg* (DACHS 310/2001), HUB (PR151/14), *Medical University of Vienna* (MUW EK Nr. 703/2010), la "*Ethikkommission Burgenland*" (KRAGES 33/2010) y el *Institute of Experimental Medicine*. Una información detallada de estas poblaciones se ha incluido en publicaciones científicas previas (Fernandez-Rozadilla et al., 2013; F. Guo et al., 2020; Hofer et al., 2017; Huyghe et al., 2018; Schmit et al., 2019).

Para el estudio CRC Jaén, se obtuvo el informe favorable del Comité de Ética de la Investigación Provincial de Jaén (Figura S1). Posteriormente, las muestras fueron recogidas en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario de Jaén una vez que los pacientes firmaron el consentimiento informado. Esta colección de muestras entró a formar parte del Biobanco de Andalucía. Alícuotas de las muestras de esta colección están disponibles en el centro de genómica GENYO ([www.genyo.es](http://www.genyo.es)) donde se realizaron los estudios genéticos.

## 2. Selección de genes y SNPs, genotipado, análisis de asociación y meta-análisis

### 2.1 Selección de genes

Para seleccionar los genes relacionados con la ruta de la autofagia, se utilizó la *Human Autophagy Database* disponible en el sitio web (<http://autophagy.lu/index.html>). Esta base de datos especializada ofrece información genética y funcional completa sobre genes implicados en la autofagia, además de herramientas y recursos para la investigación, incluyendo datos de secuencias, estructuras y variantes genéticas. En total, se seleccionaron 234 genes (Tabla 3).

**Tabla 3:** Lista de los 234 genes relacionados con la autofagia seleccionados de la *Human Autophagy Database* (<http://autophagy.lu/index.html>).

| GEN            | NOMBRE                                                                         |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <i>AMBRA1</i>  | <i>autophagy/beclin-1 regulator 1</i>                                          |
| <i>APOL1</i>   | <i>apolipoprotein L, 1</i>                                                     |
| <i>ARNT</i>    | <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>                          |
| <i>ARSA</i>    | <i>arylsulfatase A</i>                                                         |
| <i>ARSB</i>    | <i>arylsulfatase B</i>                                                         |
| <i>ATF4</i>    | <i>activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)</i> |
| <i>ATF6</i>    | <i>activating transcription factor 6</i>                                       |
| <i>ATG10</i>   | <i>ATG10 autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae)</i>                      |
| <i>ATG12</i>   | <i>ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae)</i>                      |
| <i>ATG16L1</i> | <i>ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)</i>                       |
| <i>ATG16L2</i> | <i>ATG16 autophagy related 16-like 2 (S. cerevisiae)</i>                       |
| <i>ATG2A</i>   | <i>ATG2 autophagy related 2 homolog A (S. cerevisiae)</i>                      |

|                 |                                                                                               |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ATG2B</b>    | <i>ATG2 autophagy related 2 homolog B (S. cerevisiae)</i>                                     |
| <b>ATG3</b>     | <i>ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae)</i>                                       |
| <b>ATG4A</b>    | <i>ATG4 autophagy related 4 homolog A (S. cerevisiae)</i>                                     |
| <b>ATG4B</b>    | <i>ATG4 autophagy related 4 homolog B (S. cerevisiae)</i>                                     |
| <b>ATG4C</b>    | <i>ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae)</i>                                     |
| <b>ATG4D</b>    | <i>ATG4 autophagy related 4 homolog D (S. cerevisiae)</i>                                     |
| <b>ATG5</b>     | <i>ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)</i>                                       |
| <b>ATG5B</b>    | <i>ATG5 autophagy related 5 homolog B (S. cerevisiae)</i>                                     |
| <b>ATG7</b>     | <i>ATG7 autophagy related 7 homolog (S. cerevisiae)</i>                                       |
| <b>ATG7B</b>    | <i>ATG7 autophagy related 7 homolog B (S. cerevisiae)</i>                                     |
| <b>ATG9A</b>    | <i>ATG9 autophagy related 9 homolog A (S. cerevisiae)</i>                                     |
| <b>ATG9B</b>    | <i>ATG9 autophagy related 9 homolog B (S. cerevisiae)</i>                                     |
| <b>ATIC</b>     | <i>5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide<br/>formyltransferase/IMP cyclohydrolase</i> |
| <b>BAG1</b>     | <i>BCL2-associated athanogene</i>                                                             |
| <b>BAG2</b>     | <i>BCL2-associated athanogene 2</i>                                                           |
| <b>BAG3</b>     | <i>BCL2-associated athanogene 3</i>                                                           |
| <b>BAK1</b>     | <i>BCL2-antagonist/killer 1</i>                                                               |
| <b>BAX</b>      | <i>BCL2-associated X protein</i>                                                              |
| <b>BCL2</b>     | <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>                                                                  |
| <b>BCL2L1</b>   | <i>BCL2-like 1</i>                                                                            |
| <b>BECN1</b>    | <i>beclin 1, autophagy related</i>                                                            |
| <b>BID</b>      | <i>BH3 interacting domain death agonist</i>                                                   |
| <b>BIRC5</b>    | <i>baculoviral IAP repeat-containing 5</i>                                                    |
| <b>BIRC6</b>    | <i>baculoviral IAP repeat-containing 6</i>                                                    |
| <b>BNIP1</b>    | <i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1</i>                                        |
| <b>BNIP3</b>    | <i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>                                        |
| <b>BNIP3L</b>   | <i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like</i>                                   |
| <b>C12orf44</b> | <i>chromosome 12 open reading frame 44</i>                                                    |
| <b>C17orf88</b> | <i>chromosome 17 open reading frame 88</i>                                                    |
| <b>CALCOCO2</b> | <i>calcium binding and coiled-coil domain 2</i>                                               |
| <b>CAMKK2</b>   | <i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta</i>                             |
| <b>CANX</b>     | <i>calnexin</i>                                                                               |
| <b>CAPN1</b>    | <i>calpain 1, (mu/I) large subunit</i>                                                        |
| <b>CAPN10</b>   | <i>calpain 10</i>                                                                             |
| <b>CAPN2</b>    | <i>calpain 2, (m/II) large subunit</i>                                                        |
| <b>CAPNS1</b>   | <i>calpain, small subunit 1</i>                                                               |
| <b>CASP1</b>    | <i>caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta,<br/>convertase)</i>  |
| <b>CASP2</b>    | <i>caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase</i>                                        |
| <b>CASP3</b>    | <i>caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase</i>                                        |
| <b>CASP4</b>    | <i>caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase</i>                                        |
| <b>CASP8</b>    | <i>caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>                                        |
| <b>CCL2</b>     | <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>                                                         |
| <b>CCR2</b>     | <i>chemokine (C-C motif) receptor 2</i>                                                       |
| <b>CD46</b>     | <i>CD46 molecule, complement regulatory protein</i>                                           |

|                  |                                                                                                                       |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CDKN1A</b>    | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>                                                               |
| <b>CDKN1B</b>    | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>                                                               |
| <b>CDKN2A</b>    | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)</i>                                            |
| <b>CFLAR</b>     | <i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>                                                                        |
| <b>CHMP2B</b>    | <i>chromatin modifying protein 2B</i>                                                                                 |
| <b>CHMP3B</b>    | <i>chromatin modifying protein 3B</i>                                                                                 |
| <b>CHMP4B</b>    | <i>chromatin modifying protein 4B</i>                                                                                 |
| <b>CLN3</b>      | <i>ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3</i>                                                                              |
| <b>CTSB</b>      | <i>cathepsin B</i>                                                                                                    |
| <b>CTSD</b>      | <i>cathepsin D</i>                                                                                                    |
| <b>CTSL1</b>     | <i>cathepsin L1</i>                                                                                                   |
| <b>CX3CL1</b>    | <i>chemokine (C-X3-C motif) ligand 1</i>                                                                              |
| <b>CXCR4</b>     | <i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>                                                                             |
| <b>DAPK1</b>     | <i>death-associated protein kinase 1</i>                                                                              |
| <b>DAPK2</b>     | <i>death-associated protein kinase 2</i>                                                                              |
| <b>DDIT3</b>     | <i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>                                                                              |
| <b>DIRAS3</b>    | <i>DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3</i>                                                                           |
| <b>DLC1</b>      | <i>deleted in liver cancer 1</i>                                                                                      |
| <b>DNAJB1</b>    | <i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1</i>                                                                    |
| <b>DNAJB9</b>    | <i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9</i>                                                                    |
| <b>DRAM1</b>     | <i>DNA-damage regulated autophagy modulator 1</i>                                                                     |
| <b>EDEM1</b>     | <i>ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1</i>                                                              |
| <b>EEF2</b>      | <i>eukaryotic translation elongation factor 2</i>                                                                     |
| <b>EEF2K</b>     | <i>eukaryotic elongation factor-2 kinase</i>                                                                          |
| <b>EGFR</b>      | <i>epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)</i>             |
| <b>EIF2AK2</b>   | <i>eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2</i>                                                      |
| <b>EIF2AK3</b>   | <i>eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3</i>                                                      |
| <b>EIF2S1</b>    | <i>eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa</i>                                             |
| <b>EIF4EBP1</b>  | <i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>                                                  |
| <b>EIF4G1</b>    | <i>eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1</i>                                                            |
| <b>ERBB2</b>     | <i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i> |
| <b>ERN1</b>      | <i>endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1</i>                                                                   |
| <b>ERO1L</b>     | <i>ERO1-like (S. cerevisiae)</i>                                                                                      |
| <b>FADD</b>      | <i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>                                                                      |
| <b>FAM48A</b>    | <i>family with sequence similarity 48, member A</i>                                                                   |
| <b>FAS</b>       | <i>Fas (TNF receptor superfamily, member 6)</i>                                                                       |
| <b>FKBP1A</b>    | <i>FK506 binding protein 1A, 12kDa</i>                                                                                |
| <b>FKBP1B</b>    | <i>FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa</i>                                                                             |
| <b>FOS</b>       | <i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>                                                                 |
| <b>FOXO1</b>     | <i>forkhead box O1</i>                                                                                                |
| <b>FOXO3</b>     | <i>forkhead box O3</i>                                                                                                |
| <b>GAA</b>       | <i>glucosidase, alpha; acid</i>                                                                                       |
| <b>GABARAP</b>   | <i>GABA(A) receptor-associated protein</i>                                                                            |
| <b>GABARAPL1</b> | <i>GABA(A) receptor-associated protein like 1</i>                                                                     |

|                  |                                                                                                     |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>GABARAPL2</b> | <i>GABA(A) receptor-associated protein-like 2</i>                                                   |
| <b>GABARAPL3</b> | <i>GABA(A) receptor-associated protein-like 3</i>                                                   |
| <b>GAPDH</b>     | <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>                                                     |
| <b>GNAI3</b>     | <i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3</i>      |
| <b>GNB2L1</b>    | <i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1</i>                    |
| <b>GOPC</b>      | <i>golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing</i>                                        |
| <b>GRID1</b>     | <i>glutamate receptor, ionotropic, delta 1</i>                                                      |
| <b>GRID2</b>     | <i>glutamate receptor, ionotropic, delta 2</i>                                                      |
| <b>HDAC1</b>     | <i>histone deacetylase 1</i>                                                                        |
| <b>HDAC6</b>     | <i>histone deacetylase 6</i>                                                                        |
| <b>HDAC7</b>     | <i>histone deacetylase 7</i>                                                                        |
| <b>HGS</b>       | <i>hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>                                 |
| <b>HIF1A</b>     | <i>hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)</i>      |
| <b>HSP90AB1</b>  | <i>heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1</i>                                 |
| <b>HSPA5</b>     | <i>heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)</i>                                |
| <b>HSPA8</b>     | <i>heat shock 70kDa protein 8</i>                                                                   |
| <b>HSPB8</b>     | <i>heat shock 22kDa protein 8</i>                                                                   |
| <b>IFNG</b>      | <i>interferon, gamma</i>                                                                            |
| <b>IKBKB</b>     | <i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i>                   |
| <b>IKBKE</b>     | <i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon</i>                |
| <b>IL24</b>      | <i>interleukin 24</i>                                                                               |
| <b>IRGM</b>      | <i>immunity-related GTPase family, M</i>                                                            |
| <b>ITGA3</b>     | <i>integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)</i>                         |
| <b>ITGA6</b>     | <i>integrin, alpha 6</i>                                                                            |
| <b>ITGB1</b>     | <i>integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i> |
| <b>ITGB4</b>     | <i>integrin, beta 4</i>                                                                             |
| <b>ITPR1</b>     | <i>inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1</i>                                                 |
| <b>KIAA0226</b>  | <i>KIAA0226</i>                                                                                     |
| <b>KIAA0652</b>  | <i>KIAA0652</i>                                                                                     |
| <b>KIAA0831</b>  | <i>KIAA0831</i>                                                                                     |
| <b>KIF5B</b>     | <i>kinesin family member 5B</i>                                                                     |
| <b>KLHL24</b>    | <i>kelch-like 24 (Drosophila)</i>                                                                   |
| <b>LAMP1</b>     | <i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>                                                      |
| <b>LAMP2</b>     | <i>lysosomal-associated membrane protein 2</i>                                                      |
| <b>MAP1LC3A</b>  | <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha</i>                                         |
| <b>MAP1LC3B</b>  | <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta</i>                                          |
| <b>MAP1LC3C</b>  | <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma</i>                                         |
| <b>MAP2K7</b>    | <i>mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>                                                    |
| <b>MAPK1</b>     | <i>mitogen-activated protein kinase 1</i>                                                           |
| <b>MAPK3</b>     | <i>mitogen-activated protein kinase 3</i>                                                           |

|                 |                                                                                                   |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MAPK8</b>    | <i>mitogen-activated protein kinase 8</i>                                                         |
| <b>MAPK8IP1</b> | <i>mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1</i>                                   |
| <b>MAPK9</b>    | <i>mitogen-activated protein kinase 9</i>                                                         |
| <b>MBTPS2</b>   | <i>membrane-bound transcription factor peptidase, site 2</i>                                      |
| <b>MLST8</b>    | <i>MTOR associated protein, LST8 homolog (S. cerevisiae)</i>                                      |
| <b>MTMR14</b>   | <i>myotubularin related protein 14</i>                                                            |
| <b>MTOR</b>     | <i>mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)</i>                                  |
| <b>MYC</b>      | <i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>                                      |
| <b>NAF1</b>     | <i>nuclear assembly factor 1 homolog (S. cerevisiae)</i>                                          |
| <b>NAMPT</b>    | <i>nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>                                                     |
| <b>NBR1</b>     | <i>neighbor of BRCA1 gene 1</i>                                                                   |
| <b>NCKAP1</b>   | <i>NCK-associated protein 1</i>                                                                   |
| <b>NFE2L2</b>   | <i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>                                                |
| <b>NFKB1</b>    | <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>                       |
| <b>NKX2-3</b>   | <i>NK2 transcription factor related, locus 3 (Drosophila)</i>                                     |
| <b>NLRC4</b>    | <i>NLR family, CARD domain containing 4</i>                                                       |
| <b>NPC1</b>     | <i>Niemann-Pick disease, type C1</i>                                                              |
| <b>NRG1</b>     | <i>neuregulin 1</i>                                                                               |
| <b>NRG2</b>     | <i>neuregulin 2</i>                                                                               |
| <b>NRG3</b>     | <i>neuregulin 3</i>                                                                               |
| <b>P4HB</b>     | <i>prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide</i>                                                     |
| <b>PARK2</b>    | <i>Parkinson disease (autosomal recessive, juvenile) 2, parkin</i>                                |
| <b>PARP1</b>    | <i>poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>                                                             |
| <b>PEA15</b>    | <i>phosphoprotein enriched in astrocytes 15</i>                                                   |
| <b>PELP1</b>    | <i>proline, glutamate and leucine rich protein 1</i>                                              |
| <b>PEX14</b>    | <i>peroxisomal biogenesis factor 14</i>                                                           |
| <b>PEX3</b>     | <i>peroxisomal biogenesis factor 3</i>                                                            |
| <b>PEX6</b>     | <i>peroxisomal biogenesis factor 6</i>                                                            |
| <b>PIK3C3</b>   | <i>phosphoinositide-3-kinase, class 3</i>                                                         |
| <b>PIK3R4</b>   | <i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4</i>                                            |
| <b>PINK1</b>    | <i>PTEN induced putative kinase 1</i>                                                             |
| <b>PPP1R15A</b> | <i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A</i>                                  |
| <b>PRKAB1</b>   | <i>protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit</i>                                |
| <b>PRKAR1A</b>  | <i>protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)</i> |
| <b>PRKCD</b>    | <i>protein kinase C, delta</i>                                                                    |
| <b>PRKCQ</b>    | <i>protein kinase C, theta</i>                                                                    |
| <b>PTEN</b>     | <i>phosphatase and tensin homolog</i>                                                             |
| <b>PTK4</b>     | <i>PTK4 protein tyrosine kinase 4</i>                                                             |
| <b>PTK6</b>     | <i>PTK6 protein tyrosine kinase 6</i>                                                             |
| <b>RAB11A</b>   | <i>RAB11A, member RAS oncogene family</i>                                                         |
| <b>RAB1A</b>    | <i>RAB1A, member RAS oncogene family</i>                                                          |
| <b>RAB24</b>    | <i>RAB24, member RAS oncogene family</i>                                                          |
| <b>RAB33B</b>   | <i>RAB33B, member RAS oncogene family</i>                                                         |
| <b>RAB5A</b>    | <i>RAB5A, member RAS oncogene family</i>                                                          |

|                 |                                                                                                |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RAB7A</b>    | <i>RAB7A, member RAS oncogene family</i>                                                       |
| <b>RAC1</b>     | <i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)</i> |
| <b>RAF1</b>     | <i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>                                        |
| <b>RB1</b>      | <i>retinoblastoma 1</i>                                                                        |
| <b>RB1CC1</b>   | <i>RB1-inducible coiled-coil 1</i>                                                             |
| <b>RELA</b>     | <i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</i>                            |
| <b>RGS19</b>    | <i>regulator of G-protein signaling 19</i>                                                     |
| <b>RHEB</b>     | <i>Ras homolog enriched in brain</i>                                                           |
| <b>RPS6KB1</b>  | <i>ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1</i>                                       |
| <b>RPTOR</b>    | <i>regulatory associated protein of MTOR, complex 1</i>                                        |
| <b>SARIA</b>    | <i>SAR1 homolog A (S. cerevisiae)</i>                                                          |
| <b>SERPINA1</b> | <i>serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1</i>     |
| <b>SESN2</b>    | <i>sestrin 2</i>                                                                               |
| <b>SH3GLB1</b>  | <i>SH3-domain GRB2-like endophilin B1</i>                                                      |
| <b>SIRT1</b>    | <i>sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)</i>         |
| <b>SIRT2</b>    | <i>sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2 (S. cerevisiae)</i>         |
| <b>SPHK1</b>    | <i>sphingosine kinase 1</i>                                                                    |
| <b>SPNS1</b>    | <i>spinster homolog 1 (Drosophila)</i>                                                         |
| <b>SQSTM1</b>   | <i>sequestosome 1</i>                                                                          |
| <b>ST13</b>     | <i>suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting protein)</i>          |
| <b>STK11</b>    | <i>serine/threonine kinase 11</i>                                                              |
| <b>TBK1</b>     | <i>TANK-binding kinase 1</i>                                                                   |
| <b>TFEB</b>     | <i>transcription factor EB</i>                                                                 |
| <b>TM9SF1</b>   | <i>transmembrane 9 superfamily member 1</i>                                                    |
| <b>TMEM49</b>   | <i>transmembrane protein 49</i>                                                                |
| <b>TMEM74</b>   | <i>transmembrane protein 74</i>                                                                |
| <b>TNFSF10</b>  | <i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</i>                                   |
| <b>TP53</b>     | <i>tumor protein p53</i>                                                                       |
| <b>TP53INP2</b> | <i>tumor protein p53 inducible nuclear protein 2</i>                                           |
| <b>TP63</b>     | <i>tumor protein p63</i>                                                                       |
| <b>TP73</b>     | <i>tumor protein p73</i>                                                                       |
| <b>TSC1</b>     | <i>tuberous sclerosis 1</i>                                                                    |
| <b>TSC2</b>     | <i>tuberous sclerosis 2</i>                                                                    |
| <b>TUSC1</b>    | <i>tumor suppressor candidate 1</i>                                                            |
| <b>ULK1</b>     | <i>unc-51-like kinase 1 (C. elegans)</i>                                                       |
| <b>ULK2</b>     | <i>unc-51-like kinase 2 (C. elegans)</i>                                                       |
| <b>ULK3</b>     | <i>unc-51-like kinase 3 (C. elegans)</i>                                                       |
| <b>ULK4</b>     | <i>unc-51 like kinase 4</i>                                                                    |
| <b>USP10</b>    | <i>ubiquitin specific peptidase 10</i>                                                         |
| <b>UVRAG</b>    | <i>UV radiation resistance associated gene</i>                                                 |
| <b>VAMP3</b>    | <i>vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin)</i>                                     |

|               |                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------|
| <b>VAMP5</b>  | <i>vesicle-associated membrane protein 5</i>            |
| <b>VAMP7</b>  | <i>vesicle-associated membrane protein 7</i>            |
| <b>VEGFA</b>  | <i>vascular endothelial growth factor A</i>             |
| <b>WDFY3</b>  | <i>WD repeat and FYVE domain containing 3</i>           |
| <b>WDR45</b>  | <i>WD repeat domain 45</i>                              |
| <b>WDR45L</b> | <i>WDR45-like</i>                                       |
| <b>WIP11</b>  | <i>WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1</i> |
| <b>WIP12</b>  | <i>WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2</i> |
| <b>ZFYVE1</b> | <i>zinc finger, FYVE domain containing 1</i>            |

Para la selección de SNPs, no solo se tuvieron en cuenta los SNPs ubicados directamente dentro de los genes seleccionados, sino también aquellos situados cerca de estos genes, concretamente en una región de 5 kilobases (Kb) antes del inicio del gen (*upstream*) y 3 Kb después del final del gen (*downstream*). Este rango fue escogido porque los SNPs próximos a un gen pueden afectar a su función.

## 2.2 Genotipado y análisis de asociación en la cohorte DACHS

En la población del estudio DACHS ([https://www.dkfz.de/en/epidemiologie-krebserkrankungen/units/genepi/ge\\_pr04\\_DACHS.html](https://www.dkfz.de/en/epidemiologie-krebserkrankungen/units/genepi/ge_pr04_DACHS.html)), llevado a cabo entre 2003 y 2016, se realizaron los análisis de asociación en el contexto de cuatro estudios GWAS. Estos análisis incluyeron tanto los SNPs que se genotiparon en los arrays de Illumina como los imputados, es decir, variantes genéticas que se infieren a través de métodos estadísticos basados en la información disponible en los paneles de imputación de referencia.

El genotipado se realizó empleando cuatro plataformas distintas que fueron adquiridas a lo largo del tiempo, cada una con su respectivo panel de referencia para la imputación de los SNPs:

1. **Illumina HumanCytoSNP (2003-2008):** Utilizada en el 42,04% de los casos. Para la imputación de los SNPs se utilizó el *Cosmopolitan panel of reference haplotypes from Phase 1 of the 1,000 Genome Project*, que es un panel que proporciona información genética detallada de diversas poblaciones globales.

2. **Illumina HumanOmniExpress (2007-2010):** Aplicada en el 14,37% de los casos. Se utilizó el mismo panel para la imputación que para el Human CytoSNP, asegurando la precisión en la estimación de los SNPs no genotipados.
3. **Illumina HumanOmniExpress (2010-2015):** Usada en el 22,79% de los casos durante un periodo extendido. La imputación de variantes genéticas se realizó utilizando el *Haplotype Reference Consortium* (Versión r1.1.2016), que ofrece una referencia actualizada de la diversidad genética.
4. **Illumina Infinium Oncoarray (2003-2016):** Utilizada en el 20,8% de los casos y abarcó el período más largo. Para la imputación de SNPs, se empleó también el *Haplotype Reference Consortium* (Versión r1.1.2016), garantizando la consistencia y precisión de los análisis genéticos a lo largo del estudio.

Los protocolos de genotipado y controles de calidad utilizados están descritos con detalle en diversas publicaciones (Law et al., 2019; Peters et al., 2013; Schumacher et al., 2015; Weigl et al., 2018).

En total, se analizaron 9767 SNPs (genotipados o imputados) en los genes relacionados con la autofagia, que se encontraron en las 4 plataformas de GWAS tras la correspondiente imputación.

### **2.3 Análisis de asociación de los marcadores genéticos de la autofagia con el riesgo de CCR, meta-análisis y validación**

En la población del estudio DACHS se realizó un análisis de regresión logística global ajustado por tres componentes principales (PCAs) e identificamos 925 SNPs que mostraban una asociación con el riesgo de CCR con un valor de  $p < 0.10$ . De estos, 183 SNPs se consideraron independientes según el análisis de desequilibrio de ligamiento por pares proporcionado por LD link ( $r^2 < 0.8$ ) (<https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=home>).

A partir de los datos de GWAS del estudio DACHS, se llevó a cabo un meta-análisis con los valores de asociación para los 183 SNPs independientes en la cohorte CRCGen, utilizando el estadístico  $I^2$  para medir el grado de heterogeneidad estadística entre los estudios

incluidos en el meta-análisis. La *odds ratio* (OR) combinada fue obtenida siguiendo un modelo de efectos fijos. Para los resultados del meta-análisis, se estableció un umbral de significación de 0.00027 para corregir por comparaciones múltiples (0.05/183 SNPs independientes).

Posteriormente, las asociaciones más relevantes fueron validadas usando datos de GWAS de los estudios CORSA (968 casos de CCR y 848 controles) y CCS (1605 casos de CCR y 1633 controles) aplicando modelos de regresión logística similares (Figura 6).

### **2.4. Replicación: genotipado de SNPs imputados en las cohortes de CORSA y CCS**

Para validar las asociaciones de los SNPs que mostraron el valor p más bajo en el meta-análisis de DACHS y CRCGen (NRG3rs11196336, DAPK2rs11631973, EGFRrs2075108, TP73rs4648553 y ATG5rs546456), se llevó a cabo el genotipado de los marcadores genéticos en toda la población de CORSA y en un subgrupo de individuos del estudio CCS (1031 casos de CCR y 886 controles).

El genotipado se realizó en el centro GENYO (Centro Pfizer – Universidad de Granada – Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica, PTS Granada, Granada, España) utilizando sondas de genotipado KASPar® (LGC Genomics, Hoddesdon, Reino Unido) o Taqman® SNP (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, EE. UU.) siguiendo los protocolos previamente descritos por nuestro grupo (Manuel Sánchez-Maldonado et al., 2020). Para el control de calidad interno, se seleccionaron aleatoriamente aproximadamente el 5% de las muestras de ADN y se incluyeron duplicados. La concordancia entre las muestras imputadas y las genotipadas para los SNPs analizados fue del 99.5%.

### **2.5. Análisis de asociación de los marcadores genéticos de la autofagia con la SG de los pacientes con CCR, meta-análisis y validación**

Adicionalmente, a partir de los datos de SG del GWAS del estudio DACHS, se llevó a cabo un meta-análisis con los valores de asociación para los 183 SNPs independientes en

la cohorte CRCGen y en la cohorte CRC Jaén. Se utilizó el estadístico  $I^2$  para medir el grado de heterogeneidad estadística entre los estudios incluidos en el meta-análisis.

El criterio de valoración para la SG se definió como la muerte por cualquier causa. El tiempo de supervivencia se calculó como el tiempo desde el diagnóstico de CCR hasta la ocurrencia del criterio de valoración del estudio, censurando en la fecha de muerte o en el último seguimiento clínico recogido. La asociación con SG, expresada como *Hazard Ratio* (HR), se calculó para cada SNP utilizando análisis de regresión de Cox. Los análisis se ajustaron por diferentes parámetros en función de cada estudio. En el estudio DACHS, los valores de asociación se ajustaron por edad, sexo, localización del tumor primario, estadio tumoral, grado tumoral y estado funcional del paciente. En el estudio CRCGen, los ajustes se realizaron únicamente por edad y sexo, y en el estudio CRC Jaén, los valores se ajustaron por edad, sexo y estadio tumoral. Considerando el número de SNPs independientes ( $n=183$ ), establecimos un umbral de significación de 0.00027 ( $0.05/183$ ) utilizando la corrección de Bonferroni. Los análisis de asociación se realizaron utilizando STATA (v12.1; Stata Corp, College Station, TX, USA) y los cálculos de potencia se estimaron utilizando el paquete survSNP en R (v4.1.1; R Core Team, 2018).

### **3. Caracterización funcional**

#### **3.1 Asociación funcional de las variantes relacionadas con la autofagia con las respuestas inmunitarias**

Para identificar el papel funcional de los SNPs más relevantes (SNPs independientes con un valor de  $p$  menor a 0.001), realizamos experimentos de estimulación con citoquinas en la cohorte 500FG del *Human Functional Genomic Project* (HFGP; <http://www.humanfunctionalgenomics.org/site/>). Esta cohorte es una de las mejores a nivel mundial para examinar cómo la variación genética influye en la variabilidad de las respuestas inmunitarias. El estudio HFGP fue aprobado por el Comité Ético de Arnhem-Nijmegen (n.º

42561.091.12) y se recogieron muestras biológicas tras obtener el consentimiento informado de los individuos sanos que participaron en el estudio.

Investigamos si alguno de los SNPs asociados con el riesgo de CCR en el meta-análisis de todas las poblaciones de estudio se correlacionaba significativamente con los niveles de 9 citoquinas pro y anti-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL1Ra, IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IL10, IL17 e IL22) tras la estimulación de sangre completa, PBMCs o macrófagos derivados de monocitos (MDM) de 408 sujetos sanos. Se utilizaron varios estimulantes, tales como lipopolisacárido (LPS; 1 o 100 ng/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), fitohemaglutinina (PHA) 10  $\mu$ g/mL, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.), Pam3Cys (10  $\mu$ g/mL, EMC microcollections, Tubinga, Alemania), o CpG (100 ng/mL, InvivoGen, San Diego, CA, EE. UU.), así como componentes bacterianos comunes de la microbiota intestinal humana (*Bacteroides fragilis* y *Staphylococcus aureus*), representando bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente.

Tras aplicar una transformación logarítmica a los datos funcionales para normalizar la distribución, realizamos un análisis de regresión lineal ajustado por edad y sexo para evaluar la correlación entre los SNPs y los niveles de expresión de citoquinas, definidos como *loci* de rasgos cuantitativos de citoquinas (cQTLs). Todos los análisis se realizaron utilizando el *software R* (<http://www.r-project.org/>) y *scripts* personalizados que emplean funciones como *lm* del paquete *stats*. Para corregir el efecto de las comparaciones múltiples y evitar resultados falsos positivos, establecimos un umbral de significación de 0.00046. Este valor se calculó considerando el número de SNPs independientes evaluados en los *loci DAPK2* y *ATG5* (n=2), el número de citoquinas analizadas (n=9), y los estimulantes utilizados (n=6).

Los protocolos detallados para aislar PBMCs, diferenciación de macrófagos y ensayos de estimulación han sido reportados previamente (Y. Li et al., 2016). De forma resumida, las PBMCs se lavaron dos veces en solución salina y se suspendieron en un medio (RPMI 1640) suplementado con gentamicina (10 mg/mL), L-glutamina (10 mM) y piruvato (10 mM). Para las estimulaciones de PBMCs se utilizaron  $5 \times 10^5$  células/pozo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) durante 24 horas en presencia de 10% de suero de pool humano a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se recolectaron sobrenadantes y se almacenaron a -20°C hasta su uso para ELISA. Se utilizaron LPS (100

ng/mL), PHA (10 µg/mL) y Pam3Cys (10 µg/mL), CpG (100 ng/mL), *Bacteroides fragilis* (NCTC 10584) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) como estimuladores durante 24 o 48 horas. *Bacteroides fragilis* y *Staphylococcus aureus* se sometieron a tratamiento térmico durante 30 min a 95°C y 100°C, respectivamente. Los experimentos de estimulación de sangre completa se realizaron utilizando 100µL de sangre con heparina que se agregó a una placa de 48 pocillos y posteriormente se estimuló con 400 µL de LPS, PHA (volumen final 500 µL) y *Staphylococcus aureus* durante 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -20°C hasta su uso para ELISA. Las concentraciones de TNFα, IFNγ, IL1Ra, IL1β, IL6, IL8, IL10, IL17 e IL22 se determinaron utilizando kits comerciales de ELISA específicos (PeliKine Compact, Ámsterdam, o R&D Systems), de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Para los valores fuera del rango de detección del ELISA, se utilizó el límite más cercano.

### **3.2 Correlación entre los SNPs relacionados con la autofagia y los niveles de hormonas esteroides séricas**

Además de los ensayos de estimulación *in vitro*, investigamos la correlación de los SNPs más relevantes con los niveles de 7 hormonas esteroides séricas (androstenediona, cortisol, 11-desoxicortisol, 17-hidroxiprogesterona, progesterona, testosterona y 25-hidroxivitamina D3) en un grupo de 279 participantes seleccionados del HFGP, excluyendo a aquellos bajo terapias de reemplazo hormonal o uso de anticonceptivos orales, para evitar posibles interferencias. Los niveles de estas hormonas se midieron utilizando espectrometría de masas en tándem tras precipitación de proteínas y extracción en fase sólida, de acuerdo con protocolos previamente publicados (Aguirre-Gamboa et al., 2016).

Después de aplicar una transformación logarítmica a los niveles hormonales, se evaluó la correlación entre estos y los SNPs relacionados con la autofagia mediante análisis de regresión lineal, ajustados por edad y sexo. Para corregir el efecto de las comparaciones múltiples, se estableció un umbral de significación de 0.0036, considerando tanto el número

de SNPs independientes analizados ( $n=2$ ) como el número de hormonas esteroideas evaluadas ( $n=7$ ).

### **3.3 Correlación de los SNPs de la autofagia con el recuento de células sanguíneas y el perfil proteómico sérico/plasmático**

Analizamos el impacto de las variantes genéticas de la autofagia en la variabilidad celular utilizando un conjunto de 91 poblaciones de células inmunes anotadas manualmente y datos de genotipo de la cohorte HFPG, que incluyó a 408 sujetos sanos. Las poblaciones celulares se evaluaron mediante citometría de flujo de 10 colores (citómetro de flujo Navios, Beckman Coulter, Miami, FL, EE. UU.) tras la extracción de sangre (2–3 horas), y el recuento de células se analizó con el software Kaluza (Beckman Coulter, v.1.3).

Para minimizar el ruido entre experimentos y aumentar la potencia estadística, se calcularon porcentajes de las células con dos órdenes de parentesco, que se definieron como el porcentaje de tipos específicos de células de las que proceden las subpoblaciones aisladas (Orrù et al., 2013). Los protocolos de laboratorio detallados para el aislamiento celular, los reactivos utilizados y la selección y el análisis por citometría de flujo han sido descritos en detalle en otros estudios (Aguirre-Gamboa et al., 2016). Los números de acceso a los datos brutos de citometría de flujo y los archivos de datos procesados están disponibles bajo solicitud a los autores (<http://hfgp.bbmri.nl>).

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis proteómico en muestras de suero y plasma de la cohorte HFPG, utilizando el panel *Olink Inflammation* (v.3021, Olink, Suecia), lo que permitió medir 103 biomarcadores inflamatorios (Tabla S6 en <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/6/1258/s1>). Los niveles de proteínas fueron expresados en escala log2 como valores de expresión normalizados, ajustados por muestras puente para corregir la variabilidad entre lotes.

Dado el número de proteínas evaluadas ( $n=103$ ) y polimorfismos analizados ( $n=2$ ), se estableció un umbral de significación estadística de  $p=0.00024$  para el análisis proteómico y  $p=0.00027$  para el análisis de recuento celular ( $n=91$  poblaciones celulares).

### **3.4 Impacto de las variantes relacionadas con la autofagia en el flujo de autofagia**

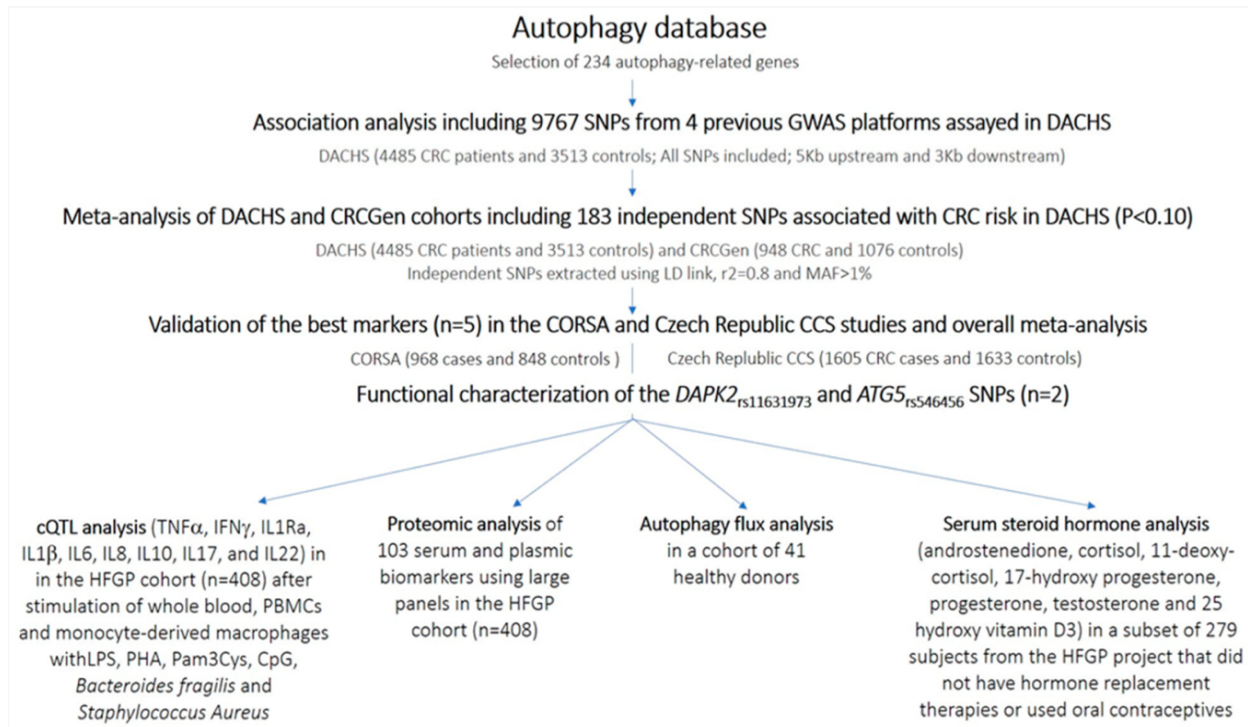
Con el fin de determinar con precisión el papel de los SNPs relevantes en la modulación de la autofagia, investigamos su impacto en el flujo de autofagia en una cohorte de 41 donantes sanos europeos.

Para ello, aislamos PBMCs de sangre completa mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Histopaque® y las tratamos durante 2 horas con 10  $\mu$ M de bafilomicina A1 o 10 mM de metformina para inhibir o inducir la autofagia, respectivamente. Se sembraron un total de  $5 \times 10^5$  PBMCs en cada pocillo para experimentos de estimulación e inhibición y se trataron con metformina o bafilomicina A1 solos o en combinación. Se utilizaron células no tratadas como controles experimentales. Después del tratamiento, se recolectaron las células y se realizó la extracción de proteínas con 50  $\mu$ L de tampón de lisis (1% NP-40, 500 mM Tris HCL, 2.5 M NaCl, 20 mM EDTA, inhibidores de fosfatasa y proteasa —de Roche— a pH 7.2). Se resolvieron 20  $\mu$ g de la proteína total en un gel SDS al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 10 min en un sistema de transferencia Trans-Blot Turbo. Las membranas se bloquearon durante 1 hora utilizando solución salina tamponada con Tris (TBS) con 0.1% de Tween 20 (TBST) que contenía 5% de BSA y se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios policlonales a 1:1000 en 1% de BSA (anticuerpo de conejo anti-LC3A/B, Cell-Signaling y anticuerpo de ratón anti-actina, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Después del lavado con solución salina tamponada con Tris-Tween (TBS-T), las membranas de nitrocelulosa se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (IgG anti-conejo para LC3A/B e IgG anti-ratón para actina). Los niveles de proteína se detectaron después de la incubación con el sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal West Femto (ThermoFisher) o el sustrato Western ECL de Clarity (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Finalmente, se obtuvieron imágenes digitales de los Western blots en un sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad) con el software Quantity One V4.6.5 (Bio-Rad).

El flujo de autofagia se determinó como la diferencia en la relación LC3-II/actina entre las células tratadas y no tratadas con bafilomicina A1 y/o metformina. Para evaluar la correlación entre los SNPs relacionados con la autofagia y el flujo de autofagia, se realizaron análisis de regresión lineal ajustados por edad y sexo. Se estableció un umbral de significación de 0.0125, considerando un valor de p de 0.05, el número de SNPs analizados (n=2) y los tratamientos *in vitro* (n=2).

### **3.5 Análisis funcional “in silico” y eQTL**

Finalmente, analizamos si los SNPs seleccionados podrían tener efectos funcionales en diversos tipos de células humanas utilizando herramientas bioinformáticas públicas como *Haploreg* (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>), anotaciones de *ENCODE* (<https://genome.ucsc.edu/ENCODE/>), *Regulome* ([www.regulome.org](http://www.regulome.org)), *GTex portal* (<https://gtexportal.org/home/>) y el *Blood eQTL browser* (<https://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>).



**Figura 6:** Diagrama de flujo de trabajo del estudio para el análisis de asociación de los marcadores genéticos de la autofagia con el riesgo de CCR, meta-análisis, validación y caracterización funcional.

En primer lugar, seleccionamos 234 genes relacionados con la autofagia.

A continuación, se lleva a cabo un análisis de asociación que incluye 9767 SNPs obtenidos mediante GWAS en la cohorte DACHS, compuesta por 4485 pacientes con CCR y 3513 controles.

Posteriormente, se realiza un meta-análisis que integra los resultados de la cohorte DACHS con los de la cohorte CRCGen, abarcando un total de 183 SNPs independientes asociados con el riesgo de CCR.

Las 5 variantes genéticas más prometedoras fueron validadas en la cohorte CORSA (968 casos de CCR y 848 controles) y en la cohorte CCS (1605 casos de CCR y 1633 controles).

Tras ello, se realiza un meta-análisis que integra los datos de todas las cohortes para evaluar las asociaciones identificadas.

Finalmente, se procede a la caracterización funcional de los SNPs *DAPK2*rs11631973 y *ATG5*rs546456:

1. Análisis cQTL: se evalúa la correlación entre estos SNPs y los niveles de diversas citoquinas (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL1Ra, IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IL10, IL17 e IL22) tras la estimulación de sangre completa, PBMCs y macrófagos derivados de monocitos en la cohorte HFGP (n=408).
2. Análisis proteómico: se analizan 103 biomarcadores séricos y plasmáticos.
3. Análisis del flujo de autofagia: se evalúa la influencia de los SNPs en el flujo de autofagia en una cohorte de 41 donantes sanos.
4. Análisis de hormonas esteroides en suero: se examina la relación entre los SNPs y los niveles de diversas hormonas esteroides (androstenediona, cortisol, 11-desoxicortisol, 17-hidroxiprogesterona, progesterona, testosterona y 25-hidroxivitamina D3) en un subconjunto de 279 sujetos del proyecto HFGP.
5. Análisis funcional “in silico” y eQTL



# ***RESULTADOS***



## RESULTADOS

### 1. Asociación de SNPs de genes de autofagia con el riesgo a desarrollar CCR

En este exhaustivo estudio de asociación se incluyeron 15,076 sujetos (8006 casos de CCR y 7070 controles). En la muestra del estudio DACHS (con 4485 pacientes con CCR y 3513 controles), se analizaron 9767 SNPs genotipados e imputados en 234 genes relacionados con la autofagia, identificándose 183 SNPs independientes ( $r^2 < 0.8$ ) asociados con un valor  $p < 0.10$ . Estos SNPs fueron seleccionados para el primer meta-análisis de las muestras DACHS y CCRGen, que incluyó un total de 5433 casos de CCR y 4589 controles.

El meta-análisis mostró las asociaciones más significativas con el riesgo de CCR para un único SNP dentro del gen *NRG3* y un bloque de desequilibrio de ligamiento (LD) que incluye 14 variantes en el locus *DAPK2* ( $r^2 > 0.90$ ; Tabla 4; Tabla S7 en <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/6/1258/s1>).

**Tabla 4:** representa los resultados del meta-análisis que evalúa la asociación entre variantes relacionadas con la autofagia y el riesgo de CCR en dos cohortes: DACHS y CCRGen.

| Gene                | Variant_dbSNP | Risk Allele | DACHS Cohort ( $n = 7998$ ) |            | CCRGen Cohort ( $n = 2024$ ) |            | Meta-Analysis ( $n = 10,022$ ) |                  | $p_{Het}$    |
|---------------------|---------------|-------------|-----------------------------|------------|------------------------------|------------|--------------------------------|------------------|--------------|
|                     |               |             | OR (95% CI) <sup>a</sup>    | $p$ -Value | OR (95% CI) <sup>a</sup>     | $p$ -Value | OR (95% CI) <sup>a</sup>       | $p$ -Value       |              |
| <i>NRG3</i>         | rs11196336    | C           | 1.18 (1.10–1.28)            | 0.00002    | 1.09 (0.93–1.28)             | 0.3125     | <b>1.17 (1.09–1.25)</b>        | <b>0.0000185</b> | <b>0.354</b> |
| <i>DAPK2</i>        | rs11631973    | G           | 1.15 (1.06–1.24)            | 0.00060    | 1.17 (1.00–1.36)             | 0.0563     | <b>1.15 (1.07–1.23)</b>        | <b>0.0000799</b> | <b>0.846</b> |
| <i>EGFR</i>         | rs2075108     | A           | 1.15 (1.03–1.28)            | 0.01308    | 1.39 (1.11–1.73)             | 0.0035     | 1.19 (1.08–1.31)               | 0.000457         | 0.134        |
| <i>TP73</i>         | rs4648553     | A           | 1.10 (1.02–1.18)            | 0.01103    | 1.21 (1.05–1.39)             | 0.0104     | 1.12 (1.05–1.20)               | 0.000590         | 0.254        |
| <i>LOC100128105</i> | rs6565506     | C           | 1.09 (1.01–1.17)            | 0.02129    | 1.21 (1.04–1.41)             | 0.0122     | 1.11 (1.04–1.19)               | 0.001597         | 0.214        |
| <i>ATG5</i>         | rs546456      | T           | 1.09 (1.03–1.16)            | 0.00574    | 1.10 (0.97–1.25)             | 0.1324     | 1.09 (1.03–1.16)               | 0.001700         | 0.918        |

**Abreviaturas:** OR, razón de momios; CI, intervalo de confianza. Los resultados significativos están en negrita después de la corrección por pruebas múltiples, considerando un umbral significativo de 0.00027.

Cada copia del alelo C de *NRG3*rs11196336 aumentaba el riesgo de desarrollar CCR en un 17% ( $p = 1.85 \times 10^{-5}$ ), mientras que en el locus *DAPK2*, tres SNPs en fuerte desequilibrio de ligamiento aumentaron el riesgo en un 15% (*rs11633496*, *rs11633611* y *rs11631973*; con valores de  $p$  entre  $7.71 \times 10^{-5}$  y  $7.99 \times 10^{-5}$ ; Tabla 4; Tabla S7 en <https://www.mdpi.com/2072->

[6694/13/6/1258/s1](#)). Además, encontramos asociaciones potencialmente interesantes para SNPs dentro de los genes *EGFR*, *TP73* y *ATG5*.

A la luz de estos resultados, seleccionamos los SNPs de *NRG3* y *DAPK2* para la replicación, ya que mostraron las asociaciones más significativas con el riesgo de CCR. Además, se incluyeron aquellos marcadores asociados con el riesgo de CCR con un valor de  $p < 0.002$ , un total de 21 SNPs, que representan cinco señales independientes, excluyendo el marcador en el gen *LOC100128105*, el cual fue identificado como una proteína hipotética según la *Guide to the Human Genome* ([www.cshlp.org/ghg5\\_db/recinfo/87/8750.shtml](http://www.cshlp.org/ghg5_db/recinfo/87/8750.shtml)) (Tabla S7 en <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/6/1258/s1>).

### 2. Meta-análisis de las 4 cohortes: replicación de los resultados de susceptibilidad

Los datos generados en la primera etapa fueron posteriormente confirmados mediante un meta-análisis que incluyó los estudios CORSA y CCS, con un total de 15,076 sujetos (8006 casos de CCR y 7070 controles). Hay que destacar que el meta-análisis global que incluye las 4 cohortes europeas confirmó que los portadores del alelo G de *DAPK2*rs11631973 tuvieron un riesgo significativamente mayor de desarrollar CCR ( $OR_{\text{Meta-análisis}} = 1.13$ , IC 95% 1.07–1.19,  $p = 0.000022$ ,  $p_{\text{Corregida}} = 0.0041$ ; Tabla 5).

En este meta-análisis también se encontró una asociación potencialmente interesante del SNP *ATG5*rs546456 con el riesgo de desarrollar la enfermedad. Cada copia del alelo T de *ATG5*rs546456 aumentó el riesgo de desarrollar la enfermedad en un 8% ( $OR_{\text{Meta-análisis}} = 1.08$ , IC 95% 1.04–1.14,  $p = 0.00062$ ; Tabla 5). Las asociaciones con los SNPs de *DAPK2* y *ATG5* no mostraron heterogeneidad entre las poblaciones analizadas.

### 3. Asociación de SNPs en *NRG3*, *TP73* y *EGFR* con el riesgo a desarrollar CCR

Es fundamental destacar que, aunque inicialmente se identificaron asociaciones entre ciertos SNPs localizados en los genes *NRG3*, *TP73* y *EGFR* con el riesgo de desarrollar CCR en las cohortes del estudio DACHS y CCRGen, estos hallazgos no fueron confirmados en las cohortes de CORSA y CCS. Esta falta de replicación de los resultados sugiere que las

variantes genéticas en estos genes podrían no desempeñar un papel biológico significativo en la predisposición al CCR (Tabla 5; Tabla S7 en <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/6/1258/s1>).

#### 4. Asociación de SNPs de genes de autofagia con la SG de los pacientes con CCR

El análisis de regresión de Cox, que incluyó a las poblaciones de DACHS y CRCgen, junto con CRC Jaén como cohortes de replicación, abarcó un total de 5645 pacientes con CCR. Este análisis identificó polimorfismos genéticos relevantes, tales como *GRID2*rs9990511, *UVRAG*rs12221774 y *TP73*rs35837097, que mostraron una asociación con la SG de los pacientes con CCR (Tabla 6).

En particular, los portadores del alelo A en el polimorfismo *GRID2*rs9990511 ( $HR_{\text{Meta-análisis}}=1.15$ , IC 95% 1.04–1.26,  $p=0.0048880$ ) y los portadores del alelo G de *TP73*rs35837097 ( $HR_{\text{Meta-análisis}}=1.11$ , IC 95% 1.05–1.17,  $p=0.0002479$ ) presentaban una supervivencia más corta en comparación con aquellos que portaban los alelos de referencia. Es importante señalar que, aunque estas asociaciones muestran una tendencia, solo el valor de  $p$  para *TP73*rs35837097 ( $p=0.0002479$ ) se encuentra por debajo del umbral de significación estadística establecido para este estudio ( $p<0.00027$ ). Sin embargo, las asociaciones encontradas en ambos polimorfismos podrían ser biológicamente relevantes y ponen de manifiesto una posible implicación negativa de las variantes genéticas en *GRID2* y *TP73* en el pronóstico del CCR.

Por otro lado, los pacientes que portaban el alelo A de *UVRAG*rs12221774 mostraron una tendencia a un mejor pronóstico en cuanto a su SG ( $HR_{\text{Meta-análisis}}=0.82$ , IC 95% 0.72–0.93,  $p=0.0015750$ ). Aunque la asociación no es estadísticamente significativa, los resultados sugieren un posible papel protector de este polimorfismo en la progresión de la enfermedad.

En conjunto, nuestros hallazgos sugieren una posible implicación biológica de *GRID2*, *UVRAG* y *TP73* en la evolución del CCR, indicando que estas variantes podrían influir en la supervivencia de los pacientes.

## Resultados

**Tabla 5:** Meta-análisis de asociación de las variantes relacionadas con la autofagia y el riesgo de CCR en las cuatro cohortes de estudio.

| Gene_Variant                | Risk Allele | DACHS Cohort<br>(n = 7998)  |         | CRCGen Cohort<br>(n = 2024) |         | CORS<br>(n = 1816)          |         | Czech Republic CCS<br>(n = 3238) |         | OR (95% CI) <sup>a</sup> | p-Value                       | p <sub>Corr</sub> | p <sub>Het</sub> |
|-----------------------------|-------------|-----------------------------|---------|-----------------------------|---------|-----------------------------|---------|----------------------------------|---------|--------------------------|-------------------------------|-------------------|------------------|
|                             |             | OR<br>(95% CI) <sup>a</sup> | p-Value | OR (95% CI)<br><sup>a</sup> | p-Value | OR<br>(95% CI) <sup>a</sup> | p-Value | OR<br>(95% CI) <sup>a</sup>      | p-Value |                          |                               |                   |                  |
| DAFK2 <sub>rs11631973</sub> | G           | 1.15<br>(1.06–1.24)         | 0.0006  | 1.17<br>(1.00–1.36)         | 0.056   | 1.12<br>(0.96–1.30)         | 0.14    | 1.07<br>(0.96–1.20)              | 0.25    | <b>1.13 (1.07–1.19)</b>  | <b>2.19 × 10<sup>−5</sup></b> | <b>0.0041</b>     | 0.760            |
| DAFK2 <sub>rs11635284</sub> | G           | 1.13<br>(1.05–1.22)         | 0.001   | 1.19<br>(1.02–1.39)         | 0.032   | 1.12<br>(0.96–1.30)         | 0.15    | 1.06<br>(0.95–1.19)              | 0.28    | <b>1.12 (1.06–1.18)</b>  | <b>4.77 × 10<sup>−5</sup></b> | <b>0.0087</b>     | 0.679            |
| ATG5 <sub>rs546456</sub>    | T           | 1.09<br>(1.03–1.16)         | 0.006   | 1.10<br>(0.97–1.25)         | 0.132   | 1.07<br>(0.94–1.22)         | 0.33    | 1.06<br>(0.95–1.18)              | 0.28    | <b>1.08 (1.04–1.14)</b>  | <b>0.00062</b>                | 0.11              | 0.958            |
| ATG5 <sub>rs490010</sub>    | G           | 1.08<br>(1.01–1.15)         | 0.020   | 1.09<br>(0.96–1.23)         | 0.181   | 1.09<br>(0.96–1.25)         | 0.18    | 1.06<br>(0.95–1.19)              | 0.30    | <b>1.08 (1.03–1.13)</b>  | <b>0.002</b>                  | NS                | 0.985            |
| NRG3 <sub>rs11196336</sub>  | C           | 1.18<br>(1.10–1.28)         | 0.00002 | 1.09<br>(0.93–1.28)         | 0.313   | 1.11<br>(0.95–1.30)         | 0.19    | 0.94<br>(0.82–1.08)              | 0.25    | <b>1.11 (1.05–1.18)</b>  | <b>0.00025</b>                | <b>0.045</b>      | <b>0.041</b>     |
| EGFR <sub>rs2075108</sub>   | A           | 1.15<br>(1.03–1.28)         | 0.013   | 1.39<br>(1.11–1.73)         | 0.0035  | 0.86<br>(0.68–1.08)         | 0.20    | 0.89<br>(0.70–1.14)              | 0.36    | <b>1.10 (1.01–1.20)</b>  | <b>0.025</b>                  | NS                | <b>0.007</b>     |
| TP73 <sub>rs4648553</sub>   | A           | 1.10<br>(1.02–1.18)         | 0.011   | 1.21<br>(1.05–1.39)         | 0.010   | 0.87<br>(0.75–1.01)         | 0.075   | 1.11<br>(0.96–1.28) *            | 0.17    | <b>1.08 (1.02–1.14)</b>  | <b>0.0039</b>                 | NS                | <b>0.013</b>     |

**Abreviaturas:** SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; OR, razón de probabilidades; CI, intervalo de confianza; NS, no significativo.

Las estimaciones se ajustaron por edad, sexo y componentes principales.

Los resultados significativos están en negrita después de la corrección por pruebas múltiples considerando un umbral de significación de 0.00027.

<sup>a</sup> Las estimaciones de asociación se calcularon según un modelo de herencia aditivo logarítmico.

\* Valores basados en los resultados de 1068 casos de CCR y 850 controles sano

**Tabla 6.** Asociación de marcadores genéticos de autofagia con la supervivencia global de los pacientes con CCR.

| SNP        | Chr | Near gene | Effect allele | DACHS<br>(n=4485) |           | CRCGen<br>(n=948) |           | CRC Jaén<br>(n=212) |       | Meta-analysis<br>(n=5645) |           |           |
|------------|-----|-----------|---------------|-------------------|-----------|-------------------|-----------|---------------------|-------|---------------------------|-----------|-----------|
|            |     |           |               | HR (95% IC)       | P         | HR (95% IC)       | P         | HR (95% IC)         | P     | HR (95% IC)               | P         | $P_{Het}$ |
| rs9990511  | 4   | GRID2     | A             | 1.14 (1.04-1.26)  | 0,0082242 | 1.33 (0.95-1.87)  | 0,0996556 | 0.89 (0.55-1.45)    | 0,647 | 1.15 (1.04-1.26)          | 0,0048880 | 0,416     |
| rs12221774 | 11  | UVRAG     | A             | 0.82 (0.72-0.94)  | 0,0413000 | 0.65 (0.43-0.98)  | 0,7980000 | 1.08 (0.60-1.93)    | 0,798 | 0.82 (0.72-0.93)          | 0,0015750 | 0,353     |
| rs35837097 | 1   | TP73      | G             | 1.11 (1.05-1.19)  | 0,0004790 | 1.28 (1.03-1.58)  | 0,0236000 | 0.87(0.66-1.16)     | 0,367 | 1.11 (1.05-1.17)          | 0,0002479 | 0,102     |

**Abreviaturas:** HR, Hazard ratio; Chr, cromosoma; CI, intervalo de confianza.

En el estudio DACHS, los valores de asociación se ajustaron por la edad, sexo, localización del primario, estadio, grado tumoral y estado funcional del paciente.

En el estudio CRCGen, los valores de asociación se ajustaron por edad y sexo.

En el estudio CRC Jaén, los valores de asociación se ajustaron por edad, sexo y estadio.

## **5. Caracterización funcional**

### **5.1 Susceptibilidad: funcionalidad de la variante genética en el gen *DAPK2***

En la caracterización funcional de los marcadores relevantes observamos que los portadores del alelo G de *DAPK2*rs11631973 tenían mayores niveles de IL1 $\beta$  después de la estimulación de las PBMCs con *Staphylococcus aureus* ( $p=0.0035$ ; Figura 7A) y niveles más bajos de en-RAGE en suero ( $p=0.0068$ ; Figura 7B), una proteína que dificulta la propagación y virulencia de *Helicobacter pylori*.

Además, observamos que los individuos portadores del alelo G de la variante *DAPK2*rs11631973 presentaban niveles ligeramente más altos de células B CD24+CD38+CD27+IgM+ ( $p=0.0038$ ; Figura 7C), un subconjunto celular abundante en pacientes con CCR.

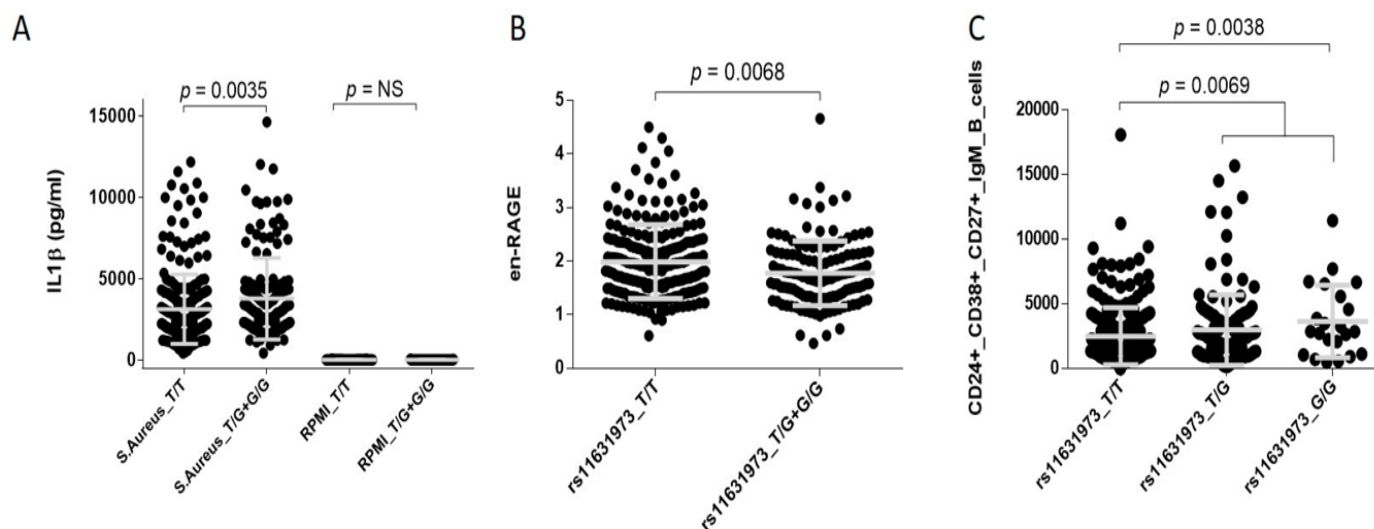
Aunque ninguno de los datos funcionales fue significativo tras la corrección por pruebas múltiples, estos hallazgos, sumados a los resultados previos sobre la correlación entre los SNPs de *DAPK2* y la expresión de ARNm de *DAPK2* en varios tejidos, incluyendo el esófago y la unión esofagogástrica (con valores  $p$  desde  $7.6 \times 10^{-6}$  hasta  $2.3 \times 10^{-4}$ ; Tabla S7 en <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/6/1258/s1>), sugieren un papel del locus *DAPK2* en la modulación del riesgo de CCR, probablemente mediante la regulación de las respuestas inmunitarias del huésped frente a componentes de la microbiota humana.

### **5.2 Susceptibilidad: funcionalidad de la variante genética en el gen *ATG5***

Para una caracterización funcional del SNP *ATG5*rs546456 en la modulación del riesgo de CCR, encontramos que, tras la estimulación de PBMCs con LPS, los portadores del alelo T de *ATG5*rs546456 presentaban mayores niveles de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  ( $p=0.0088$  y  $p=0.0076$ , respectivamente; Figura 8A y 8B).

Además, descubrimos que los portadores del alelo T de *ATG5*rs546456 tendían a tener menores niveles de monocitos clásicos en sangre (CD14+ CD16–;  $p=0.0068$ ; Figura

8C) y mayores niveles de la quimiocina CCL19 y cortisol en suero ( $p=0.0052$  y  $p=0.0074$ ; Figura 8D y 8E). No se detectó ninguna asociación entre el SNP *ATG5rs546456* y el flujo de autofagia (Tabla 7 y Figura S2).



**Figura 7A, 7B y 7C:** Caracterización funcional de la variante *DAPK2*.

NS, no significativo.

(A) Representa la cantidad de IL1 $\beta$  en PBMCs estimuladas con *Staphylococcus aureus*. Se puede observar que los portadores del alelo G de la variante *DAPK2rs11631973* (T/G o G/G) presentan niveles elevados de IL1 $\beta$  en comparación con los portadores del genotipo TT ( $p=0.0035$ ).

(B) Representa los niveles de en-RAGE, una proteína que inhibe la diseminación y virulencia de *Helicobacter pylori*, en el suero de 343 sujetos sanos. Se encontró que los niveles de en-RAGE son significativamente más bajos en los portadores del alelo G de la variante *DAPK2rs11631973* en comparación con los portadores del genotipo TT ( $p=0.0068$ ).

(C) Muestra el porcentaje de células B transitorias CD24+CD38+CD27+IgM+ en la sangre, comparando diferentes genotipos de la variante *DAPK2rs11631973*. Los resultados indican una disminución significativa en el porcentaje de estas células en los portadores del genotipo G/G en comparación con los otros genotipos ( $p=0.0038$ ).

Aunque nuevamente ninguno de los resultados funcionales puede considerarse estadísticamente significativo tras la corrección por comparaciones múltiples, estos

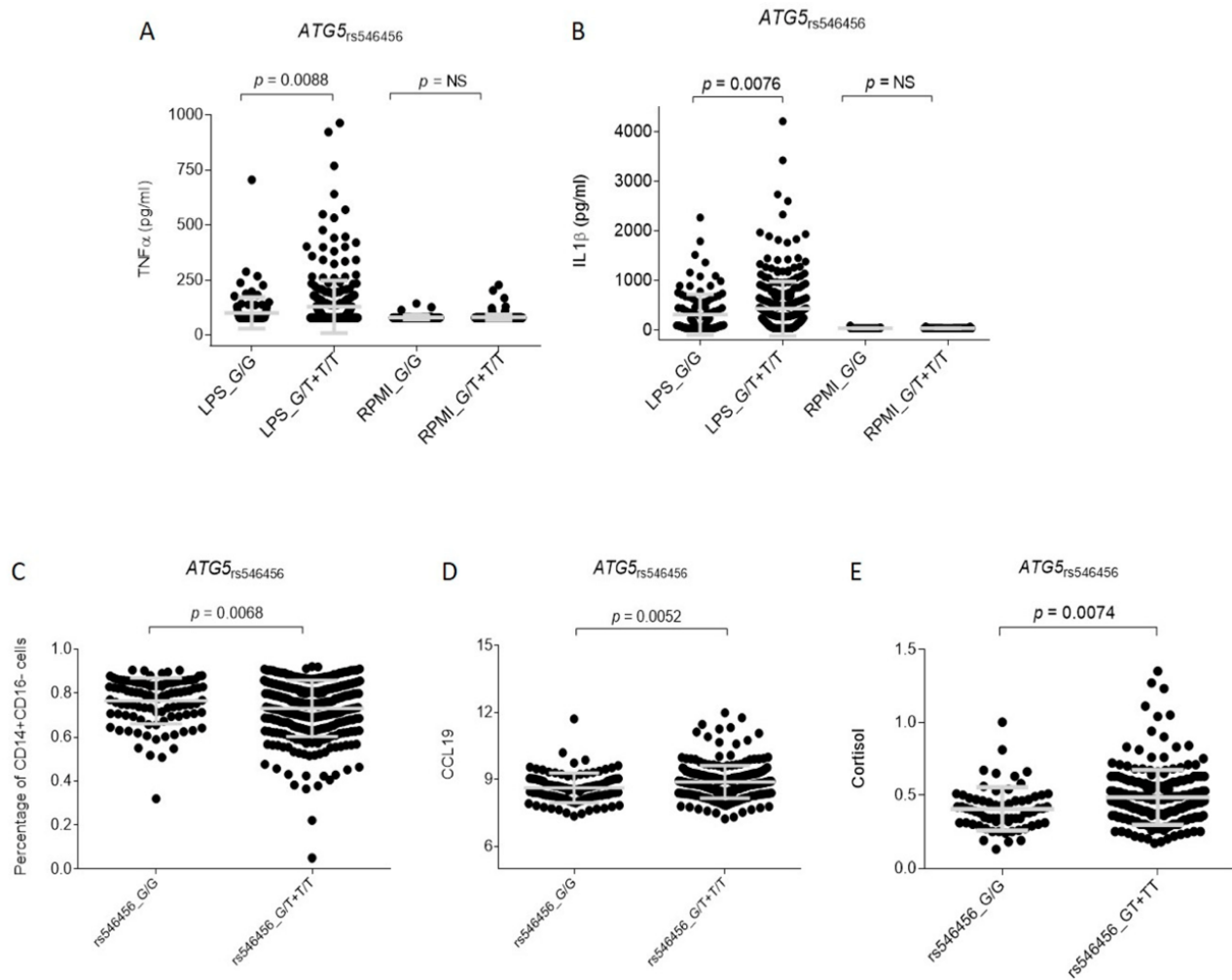
hallazgos, junto con los datos del portal *GTex*, que muestran una fuerte correlación de este marcador con la expresión de ARNm de *ATG5* en tejido muscular esquelético ( $p=2.7 \times 10^{-9}$ ), sugieren una posible implicación funcional del locus *ATG5* en la patogénesis del CCR en varios niveles, aunque con una evidencia limitada.

### 5.3 Supervivencia: funcionalidad de las variantes en los genes *GRID2*, *UVRAG* y *TP73*

Para la caracterización funcional de los SNPs *GRID2rs9990511*, *UVRAGrs12221774* y *TP73rs35837097* y su implicación pronóstica en relación con la SG de los pacientes con CCR, se realizaron una serie de ensayos funcionales en el marco de HFGP. Sin embargo, los hallazgos fueron preliminares y no lograron revelar una función biológica clara de estos genes en la modulación de la respuesta inmunológica.

En relación con el polimorfismo *TP73rs35837097*, nuestro análisis funcional *in silico* indicó que este SNP altera un motivo de unión para el factor de transcripción Sin3Ak-20, el cual desempeña un papel en la regulación de la transcripción mediante la modificación de la cromatina y la supresión de la expresión génica. Esto sugiere un posible impacto en la regulación de la expresión de *TP73*.

Asimismo, el análisis *in silico* indicó que la variante *GRID2rs62310990* presenta un fuerte desequilibrio de ligamiento con la variante *GRID2rs9990511* ( $r^2=0,87$ ) que se localiza en regiones de unión a histonas en la mucosa colónica y el músculo liso del colon y el recto. Esto sugiere una posible influencia de esta región genómica de *GRID2* en la regulación de la expresión en el colon y el recto. Finalmente, el análisis *in silico* mostró que el polimorfismo *GRID2rs9990511* altera sitios de unión para factores de transcripción relevantes en la proliferación tumoral, como Foxp1.



**Figura 8.** Caracterización funcional de la variante ATG5rs546456.

NS, no significativo.

(A, B) Las PBMCs fueron estimuladas con LPS. (C) Los porcentajes de células CD14+CD16- fueron cuantificados considerando a los monocitos CD14+ como la población de células ascendentes. (D) Los niveles séricos de CCL19 y (E) cortisol se midieron en el suero de 343 sujetos sanos.

**Tabla 7:** Correlación entre los SNPs DAPK2 y ATG5 y el flujo de autofagia

|                            | LC3-II/ACTB ratio (n=41)                         |       |       |                  |       |       |                  |       |       |                         |       |       |
|----------------------------|--------------------------------------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|
|                            | Control experimental<br>(células no estimuladas) |       |       | Baf. vs. control |       |       | Met. vs. control |       |       | Met. + Baf. vs. control |       |       |
|                            | beta                                             | 95%IC | P     | beta             | 95%IC | P     | beta             | 95%IC | P     | beta                    | 95%IC | P     |
| <b>DAPK2</b><br>rs11631973 | -0,031                                           | -0,9  | 0,849 | 0,04             | -1,05 | 0,803 | -0,019           | -0,72 | 0,905 | -0,146                  | -0,84 | 0,362 |
| <b>ATG5</b><br>rs546456    | 0,283                                            | -0,52 | 0,09  | -0,049           | -0,72 | 0,76  | -0,202           | -0,49 | 0,23  | -0,152                  | -0,58 | 0,371 |



# ***DISCUSIÓN***



## DISCUSIÓN

Los procesos biológicos implicados en la carcinogénesis y la susceptibilidad genética al cáncer son algunos de los campos más investigados de la ciencia. Este exhaustivo estudio analiza en una primera fase la asociación de genes relacionados con la autofagia y el riesgo de desarrollar CCR, mientras que en una segunda fase evalúa su relación con el pronóstico de los pacientes. En el meta-análisis de cuatro cohortes europeas que incluyeron un total de 15076 sujetos (8006 casos de CCR y 7070 controles), se encontró que ciertos polimorfismos en *DAPK2* y *ATG5* estaban asociados con un mayor riesgo de desarrollar CCR. La caracterización funcional de los SNPs que mostraron las asociaciones más fuertes no reveló ninguna relación con el flujo de autofagia, pero sí sugirió un vínculo entre el microbioma y la inmunidad en individuos genéticamente susceptibles, lo que podría conducir al desarrollo de CCR.

En nuestro estudio, la asociación más fuerte se encontró para el polimorfismo *DAPK2*rs11631973 dentro del gen *DAPK2*. Cada copia del alelo G de *DAPK2*rs11631973 aumentó el riesgo de desarrollar CCR en un 13%. *DAPK2*, que codifica la proteína cinasa 2 asociada a la muerte celular (*death-associated protein kinase 2*), es una enzima que forma parte de la familia de las quinasas serina/treonina que son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina y que posee propiedades pro-apoptóticas (Ber et al., 2014). Aunque *DAPK2* es conocido como un gen supresor tumoral en ciertas neoplasias hematológicas, su papel como supresor en tumores sólidos, como el CCR, no está tan bien establecido en comparación con otras proteínas de su familia, como *DAPK1* (Ber et al., 2014; Geering et al., 2014). A pesar de ello, también se ha sugerido que *DAPK2* podría desempeñar un papel crucial en la carcinogénesis y la progresión del CCR (C. Li et al., 2024). Investigaciones recientes han demostrado que *DAPK2* está involucrada en la regulación de procesos esenciales como la hematopoyesis, la motilidad celular (Geering et al., 2015) y la diferenciación de neutrófilos (Rizzi et al., 2007), todos ellos relevantes en la progresión tumoral. Además, la inactivación del gen *DAPK2* ha sido asociada con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, lo que subraya su potencial como

posible objetivo terapéutico (Humbert et al., 2014; J. Zhang et al., 2016). De hecho, el interés por *DAPK2* ha crecido en el ámbito de la oncología en los últimos años y hay estudios recientes que han utilizado inhibidores específicos de *DAPK2* para el tratamiento del cáncer (Xiang et al., 2020). Aunque los datos disponibles son limitados, *DAPK2* podría influir en la proliferación celular, apoptosis y metástasis, lo que convierte a este gen en un candidato prometedor como diana terapéutica en CCR. Además, *DAPK2* ha sido identificado como un objetivo del microARN miR-1285-3p que regula tanto la proliferación como la apoptosis de las células del CCR y estudios recientes han demostrado que la inhibición de miR-1285-3p puede aumentar la expresión de *DAPK2*, provocando la detención del ciclo celular y apoptosis, estableciendo su papel como gen supresor de tumores (Villanova et al., 2020). Este hallazgo también podría representar una estrategia terapéutica innovadora para potenciar los efectos de *DAPK2* en la supresión tumoral. Aunque *DAPK1* y *DAPK2* son genes distintos, su papel para inhibir la proliferación celular y la metástasis podría ser común, y la pérdida de *DAPK1* ha demostrado aumentar la invasión tumoral y la metástasis en CCR, sugiriendo un papel similar para *DAPK2* (Yuan et al., 2019). En este sentido, nuestros experimentos funcionales mostraron que las PBMCs de portadores del alelo G de *DAPK2*rs11631973 presentaban niveles elevados de IL1 $\beta$  tras la estimulación con *Staphylococcus aureus*, lo que llevó a la hipótesis de que el locus *DAPK2*, conocido por estar involucrado en la modulación de la función de neutrófilos y eosinófilos, podría además influir sobre el riesgo de CCR mediante la sobreproducción de IL1 $\beta$  por granulocitos en respuesta a componentes del microbioma intestinal y, de este modo, promover la inflamación crónica. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que indican que altos niveles de IL1 $\beta$  liberada por los neutrófilos alteran la barrera epitelial del colon (Furuta et al., 2005), inducen carcinogénesis y se correlacionan con un mal pronóstico en pacientes con tumores sólidos (McLoed et al., 2016). De igual manera, en apoyo de la hipótesis que sugiere un papel del SNP *DAPK2*rs11631973 en la modulación de la función de granulocitos, también encontramos que los portadores del alelo G de *DAPK2*rs11631973 presentaban niveles serológicos reducidos de en-RAGE, una proteína codificada por el gen *S100A12* y secretada por granulocitos que tiene un efecto inhibitor sobre la propagación y la virulencia de *Helicobacter pylori* (Haley et al., 2015). Este resultado sugirió que el SNP

*DAPK2*rs11631973 podría tener un impacto sobre el riesgo de CCR al determinar la respuesta inmunitaria contra *H. pylori*, un patógeno asociado con el desarrollo de CCR, entre otros tipos de cáncer (Butt & Epplen, 2019; Correa & Houghton, 2007). Curiosamente, también encontramos que los sujetos portadores del alelo G de *DAPK2*rs11631973 mostraban niveles ligeramente elevados de células B CD24+CD38+CD27+IgM+, un subconjunto de células B transicionales frecuentemente enriquecido en leucocitos de pacientes con CCR que regula las respuestas proinflamatorias mediadas por células T y se correlaciona con etapas avanzadas de la enfermedad (Shimabukuro-Vornhagen et al., 2014). Además, los datos *in silico* de Haploreg mostraron que esta variante se correlaciona con una mayor actividad promotora exclusivamente en neutrófilos primarios y que se encuentra ubicada entre marcas de histonas H3K4me1 en la mucosa rectal. Los datos del portal GTex también mostraron que el alelo G de *DAPK2*rs11631973 se correlaciona con los niveles de expresión de ARNm de *DAPK2* en varios tejidos, incluyendo el esófago y la unión gastroesofágica. Aunque solo los resultados funcionales observados *in silico* podían ser considerados estadísticamente significativos tras la corrección por comparaciones múltiples, en conjunto, estos resultados apuntan a un papel del locus *DAPK2* en la patogénesis del CCR a través de la modulación de las respuestas inmunitarias del huésped, la proliferación y la apoptosis.

Otro hallazgo interesante fue la asociación del SNP en *ATG5* con el riesgo de CCR, que permanecía solo marginalmente significativa tras la corrección por comparaciones múltiples. Cada copia del alelo T de *ATG5*rs546456 aumentó el riesgo de desarrollar la enfermedad en un 8%. En línea con nuestros datos genéticos, los experimentos funcionales sugirieron un papel de este locus en la modulación del riesgo de CCR. *ATG5* codifica una proteína de 275 aminoácidos involucrada en el control de la formación de vesículas autofágicas, pero también en la respuesta mitocondrial al daño oxidativo, la diferenciación de células T y las respuestas inmunitarias a microorganismos (F. Wang et al., 2024; X. Ye et al., 2018). Aunque el papel de *ATG5* en el CCR sigue sin estar claro debido a los resultados controvertidos entre los estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha descrito que más del 20% de los pacientes con CCR tienen una delección de *ATG5* (Sun et al., 2021; L. Wang et al., 2015) y

que la eliminación heterocigótica o completa de este gen conduce a un aumento de la muerte celular, la carga tumoral y una mayor eficacia antitumoral del IFN $\gamma$  (L. Wang et al., 2015). A nivel funcional, se ha descrito que la delección heterocigótica de *ATG5* activa las vías de EGFR y Wnt/ $\beta$ -catenina en adenomas de ratones *Apc*(Min/+) lo que condujo al aumento de la inhibición dependiente de IFN $\gamma$  de estas vías (L. Wang et al., 2015). Además, estudios más recientes han sugerido que el papel controvertido de *ATG5* en CCR podría deberse a la activación compensatoria de proteínas relacionadas con la autofagia (AKT, RICTOR y mTOR) en respuesta a la inhibición de la autofagia (Lauzier et al., 2019), las cuales también se han asociado con el pronóstico del CCR (L. Wang et al., 2017). En contraste con la noción de un papel del locus de *ATG5* en la modulación de la autofagia, nuestro estudio ha sugerido que el SNP *ATG5*rs546456 podría influir en el riesgo de CCR al modular las respuestas inmunitarias del huésped. Observamos que los portadores del alelo T de *ATG5*rs546456 mostraban niveles aumentados de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  después de la estimulación de PBMCs con LPS y tendían a tener menores niveles de monocitos clásicos y niveles aumentados de CCL19 en suero. Estos resultados funcionales también estaban en línea con aquellos que sugieren el papel de *ATG5* en la modulación de los niveles de IL1 $\beta$  derivados de neutrófilos en respuesta a LPS (Iula et al., 2018), pero también en la regulación de monocitos clásicos en sangre y niveles séricos de CCL19, una quimiocina relevante que desempeña un papel clave en el control de la proliferación, migración y angiogénesis de las células de CCR (Z. Xu et al., 2018). En línea con esta hipótesis, estudios previos han demostrado que el LPS estimula el inflammasoma no canónico para inducir la producción de IL1 $\beta$  en neutrófilos, pero también en otras células mieloides, incluidos los macrófagos, y que este efecto sobre el inflammasoma está mediado, al menos en parte, por ATG5 (Saitoh & Akira, 2016). También se ha demostrado que la autofagia inhibe la apoptosis de neutrófilos, ya que el silenciamiento por siRNA de *ATG5* provoca una apoptosis espontánea acelerada y reduce la apoptosis inducida por TNF $\alpha$ , sugiriendo un efecto específico de *ATG5* en la supervivencia de células inmunitarias (Plijev & Menshikov, 2012). Curiosamente, también encontramos una débil correlación entre el alelo T de *ATG5*rs546456 con mayores niveles de cortisol en suero, lo cual estaba en consonancia con estudios previos que han sugerido que el aumento de cortisol está asociado con la desregulación inmunitaria y el desarrollo del cáncer (X. Zhang et al., 2019; Moreno-

Smith et al., 2010). Estudios previos también han demostrado que el cortisol, actuando sinérgicamente con las catecolaminas, puede facilitar el crecimiento de células cancerosas y potenciar la liberación de  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$ . Aunque ni la asociación genética del SNP *ATG5*rs546456 con el riesgo de CCR ni los datos funcionales permanecieron significativos tras la corrección por comparaciones múltiples, en conjunto, estos resultados sugieren un papel del locus *ATG5* en la modulación de células inmunitarias, probablemente neutrófilos y macrófagos, y su función en la activación de vías tumorogénicas en CCR.

Por otra parte, resulta interesante destacar la asociación de los polimorfismos *GRID2*rs9990511, *UVRAG*rs12221774 y *TP73*rs35837097 con la SG de los pacientes con CCR. Aunque las asociaciones eran relativamente modestas y no alcanzaron la significación estadística en el análisis de las variantes *GRID2*rs9990511 y *UVRAG*rs12221774, estos SNPs podrían estar implicados en la modulación de la progresión de la enfermedad y, por consiguiente, en el pronóstico de los pacientes con CCR. Sin embargo, dado que los ensayos funcionales preliminares desarrollados en el contexto del HFGP no han revelado una función biológica clara para estos genes, es difícil establecer una explicación concreta para el efecto observado sobre la SG de los pacientes con CCR.

El gen *TP73* consta de 15 exones, designados del 1 al 14, con un exón alternativo en la región 3'. Este gen puede generar diferentes ARNm a través del *splicing* alternativo, lo que da lugar a múltiples isoformas proteicas que, en muchos casos, ejercen funciones opuestas (Yoon et al., 2015; Zawacka-Pankau et al., 2010). Se ha postulado que la isoforma completa de *TP73* tiene propiedades antitumorales mediante la modulación del crecimiento, la diferenciación y la apoptosis celular (Yoon et al., 2015). En cambio, las isoformas truncadas del gen parecen ejercer un efecto tumorogénico, promoviendo la progresión tumoral (Stiewe et al., 2002, 2003; Zaika et al., 2002; J. Zhang et al., 2023). Además, el gen *TP73* es un homólogo cercano de *TP53* y *TP63*, ambos genes conocidos por su papel en la regulación tumoral (Yoon et al., 2015). En el contexto del CCR, *TP73* se ha encontrado frecuentemente mutado, lo que sugiere una implicación directa en la patogénesis de este tipo

de cáncer (J. Fan et al., 2022). Estudios previos han demostrado que ciertos polimorfismos en *TP73* están asociados con el estadio clínico de la enfermedad (Gao et al., 2023), lo que refuerza la importancia de este gen, también, en la progresión del CCR. Si bien estos polimorfismos no se encuentran en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo identificado en nuestro estudio (*TP73rs35837097*), podrían representar una señal de asociación distinta con una función biológica diferente. Es preciso destacar que la variante *TP73rs35837097* identificada fue la única que se asoció con la SG de forma estadísticamente significativa en el meta-análisis de las tres cohortes incluidas, lo que refuerza su relevancia en el pronóstico del CCR, asociando con una SG más corta. Dado que la variante *TP73rs35837097* se encuentra en una región intrónica, es plausible que pueda alterar el *splicing* alternativo del ARNm, lo que podría dar lugar a la producción de isoformas de *TP73* con funciones que promuevan el desarrollo tumoral. Esto, a su vez, podría impactar negativamente en la SG de los pacientes. El análisis funcional *in silico* realizado en nuestro estudio reveló que el polimorfismo *TP73rs35837097* altera un motivo de unión para el factor de transcripción Sin3A-20, lo que sugiere un posible impacto en la regulación de la expresión de *TP73*. Sin3A es una proteína implicada en la represión transcripcional (Zhu et al., 2018), y su interacción con este polimorfismo podría afectar la expresión de *TP73* y, potencialmente, su función como supresor tumoral. Además, investigaciones recientes han mostrado que la expresión de ciertas isoformas de *TP73* se asocia con períodos más cortos de SG en pacientes con cáncer, posiblemente debido a la modulación de otros genes implicados en la progresión tumoral, como *ABCB1* y *HMGB1* (Cai et al., 2018; Ding et al., 2023; Jia et al., 2019). Estos hallazgos, junto con el conocido papel de la familia *TP53* en el desarrollo tumoral, refuerzan la idea de que *TP73* desempeña un papel clave en la progresión del CCR. Finalmente, es relevante destacar que nuestro grupo ha publicado recientemente un estudio en el que se demuestra la relación entre marcadores genéticos en *TP63* y el desarrollo de cáncer de páncreas (Gálvez-Montosa et al. 2024), lo que apoya la implicación de los genes de la familia *TP53* en la carcinogénesis de diferentes tipos de tumores. Estos resultados refuerzan la necesidad de seguir investigando el papel de *TP73* como una posible diana terapéutica en el tratamiento del CCR.

*UVRAG* (*UV Radiation Resistance Associated*) ha sido identificado como un gen relacionado con la progresión tumoral de varias neoplasias, incluido el CCR (S. He & Liang, 2015). Funcionalmente, este gen puede actuar tanto como promotor de la progresión tumoral como supresor (Feng et al., 2007a; S. He & Liang, 2015; Song et al., 2020). En el estudio de Shi y colaboradores, se encontró una asociación negativa entre *UVRAG* y el pronóstico en pacientes con CCR debido a su capacidad para aumentar la migración celular, la pluripotencialidad de las células tumorales y la resistencia a la quimiorradioterapia (Shi et al., 2023). Estos efectos parecen estar mediados por la regulación positiva de factores como SP1 y la expresión de PD-L1, que permiten la evasión del sistema inmunológico al suprimir las células T. En este entorno, *UVRAG* fortalece un microambiente tumoral que favorece la supervivencia de las células cancerosas, lo cual está asociado con un peor pronóstico clínico para los pacientes con CCR (Shi et al., 2023). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la variante *UVRAGrs12221774* se asoció con una mayor SG en pacientes con CCR, aunque esta asociación no alcanzó significación estadística. Esta diferencia se explica por la naturaleza pleiotrópica de *UVRAG*, cuyo papel varía según las alteraciones genéticas específicas (Feng et al., 2007; C. Liang et al., 2006). Aunque los mecanismos no están claros, la variante *UVRAGrs12221774* podría activar vías relacionadas con la autofagia que contribuyen a la supresión tumoral, lo que podría ralentizar la proliferación celular o actuar modulando la respuesta inmune, creando un microambiente menos favorable para el crecimiento tumoral. Un estudio interesante señala que la sobreexpresión de *UVRAG*, al inhibir la histona desacetilasa 1 (HDAC1) en células de CCR, disminuye la citotoxicidad del fármaco quimioterápico 5-fluorouracilo (5FU), favoreciendo la supervivencia celular (Jo et al., 2018). Estudios previos también han demostrado la relación de *UVRAG* con la quimio y radiosensibilidad de las células de CCR y el impacto en la supervivencia celular (S. He et al., 2015; Park et al., 2014). En definitiva, aunque los resultados de nuestro estudio no permiten establecer una asociación estadísticamente significativa de la variante *UVRAGrs12221774* con la SG, teniendo en cuenta los hallazgos observados, esta variante podría estar implicada en la modulación de la función de *UVRAG*, lo que podría influir en el pronóstico de los pacientes con CCR.

El gen *GRID2* (*Glutamate Ionotropic Receptor Delta Type Subunit 2*), localizado en la región 7p22.1 (Katoh & Katoh, 2003), codifica para un receptor ionotrópico del glutamato, ampliamente conocido por su papel en la transmisión sináptica en el sistema nervioso central, mediando la liberación de neurotransmisores excitatorios (Ali et al., 2017; Allen et al., 2024). No obstante, estudios recientes han vinculado este gen con procesos relacionados con la progresión tumoral, específicamente en CCR (J. Zhao et al., 2023), y ha formado parte de *scores* genéticos para la predicción del pronóstico de pacientes en otros tipos de tumores (Qiu et al., 2020). Se ha descrito que GRID2IP, una proteína que interactúa con GRID2, podría afectar la progresión del CCR al regular la infiltración inmune en el tumor y participar en mecanismos de autofagia (J. Zhao et al., 2023). Esto sugiere que GRID2 no solo tiene un rol estructural en las sinapsis neuronales, sino que también podría influir en procesos claves del microambiente tumoral. Por tanto, alteraciones en *GRID2* podrían favorecer mecanismos que conducen a la progresión del CCR. Nuestros hallazgos sugieren que la variante *GRID2rs9990511* podría estar asociada con una SG más corta en pacientes con CCR, aunque esta asociación no alcanzó significación estadística en nuestro meta-análisis. El análisis *in silico* mostró que la variante *GRID2rs62310990*, en fuerte desequilibrio de ligamiento con *GRID2rs9990511* ( $r^2 = 0.87$ ), se encuentra en zonas de unión a histonas en la mucosa colónica y el músculo liso del colon y el recto. Esto sugiere que esta región genómica de *GRID2* podría tener un efecto sobre la regulación de la expresión en tejidos de colon y recto. Asimismo, el análisis *in silico* reveló que el polimorfismo *GRID2rs9990511* altera sitios de unión para factores de transcripción como Foxp1, que ha sido vinculado con la progresión en CCR (De Smedt et al., 2015). La modulación de estos factores transcripcionales podría ser relevante en la regulación de la proliferación tumoral y en la respuesta inmune del microambiente tumoral. Es posible que *GRID2* juegue un papel en la modulación del sistema inmunológico dentro del microambiente tumoral, afectando la capacidad del sistema inmune para reconocer y eliminar las células tumorales. Adicionalmente, estudios previos han demostrado que los receptores ionotrópicos del glutamato, como GRID2, pueden activar vías de señalización pro-oncogénicas que favorecen la resistencia a la apoptosis y promueven la invasión tumoral (Eddy et al., 2022; Martino et al., 2013; Yu et al., 2017; C. Zhang et al.,

2015). Por lo tanto, la variante *GRID2rs9990511* podría estar implicada en la potenciación de estas vías oncogénicas, contribuyendo a una mayor agresividad del CCR y, en consecuencia, a una peor SG, aunque se necesitan más estudios para confirmar esta posible implicación.

Finalmente, es importante mencionar las fortalezas y las limitaciones del estudio. Uno de los principales aspectos positivos es el exhaustivo análisis de variantes genéticas en los 234 genes relacionados con la autofagia, documentados en la base de datos de autofagia (<http://autophagy.lu/index.html>). Destaca además el gran tamaño muestral, que para el análisis de asociación de riesgo de CCR abarca cuatro grandes poblaciones europeas con un total de 15.076 sujetos, incluidos 8006 casos de CCR y 7070 controles, y para el análisis de SG abarca dos grandes poblaciones europeas y una cohorte unicéntrica, con un total de 5645 pacientes con CCR. El tamaño de las cohortes incluidas en este estudio nos ha permitido alcanzar una potencia estadística del 80% para detectar una razón de momios de 1.12 ( $\alpha=0.00027$ ) para un SNP con una frecuencia de 0.25, lo cual pone de manifiesto tanto la viabilidad del diseño como la robustez de los hallazgos obtenidos. Además, el estudio no se limitó a la identificación de asociaciones genéticas, sino que se llevó a cabo un análisis exhaustivo del impacto de los SNPs asociados al riesgo de CCR sobre la respuesta inmunológica. En este ámbito, se analizó de manera detallada el efecto de los marcadores genéticos sobre la producción de citoquinas tras la estimulación *in vitro* de sangre completa, PBMCs y macrófagos derivados de monocitos con múltiples patógenos y agentes estimuladores del sistema inmune, así como sobre la modulación del recuento de células sanguíneas y las concentraciones de proteínas inmunológicas y hormonas esteroideas en suero y plasma. Este enfoque permitió una mejor comprensión del papel biológico de las variantes genéticas analizadas y su posible relación con el CCR. Además, se evaluó el efecto de estos SNPs en la modulación del flujo de autofagia en PBMCs, tanto en condiciones normales como tras la aplicación de tratamientos específicos con metformina o bafilomicina.

En cuanto a las limitaciones del estudio, una de las principales es su diseño multicéntrico, lo que introduce una variabilidad no controlada debido a la dificultad de obtener datos uniformes sobre el perfil mutacional de los pacientes (incluyendo mutaciones en *RAS*, *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *TP53*, *EGFR*, *BRAF*, *LOH*, *PIK3CA* y *TGFBR*). Esta falta de uniformidad en la recopilación de datos genéticos introduce un sesgo potencial que puede afectar la precisión y consistencia de los análisis de asociación genética y limitar la capacidad para extraer conclusiones robustas sobre el impacto de estos perfiles genéticos en el pronóstico de los pacientes. Otro aspecto fundamental que destacar es la heterogeneidad de la población incluida en el análisis de asociación de las variantes genéticas con la SG. Las tres cohortes incluidas presentan una alta variabilidad en cuanto a factores clínicos y pronósticos, como el estadio tumoral y la localización del tumor, los cuales son conocidos por influir de manera significativa en la SG de los pacientes. Desde un punto de vista metodológico, es muy relevante destacar que los ajustes realizados en los análisis de regresión de Cox no fueron homogéneos entre las diferentes cohortes. En el estudio DACHS, el que incluye más número de pacientes, los valores de asociación se ajustaron por diferentes variables, incluyendo la edad, sexo, localización del tumor primario, estadio, grado tumoral y estado funcional del paciente. En el estudio CRCGen, sin embargo, los ajustes fueron más limitados, considerándose solo la edad y el sexo. Por su parte, en la cohorte CRC Jaén, los valores se ajustaron por edad, sexo y estadio tumoral. Esta falta de uniformidad en los ajustes introduce un nivel adicional de heterogeneidad en los análisis de asociación y, en consecuencia, en los resultados del meta-análisis. Además, es importante señalar que durante el desarrollo de este estudio no se ha llevado a cabo una caracterización funcional experimental exhaustiva de las variantes asociadas a la SG, a diferencia de lo que se ha hecho con las variantes asociadas al riesgo de CCR. Se realizaron una serie de ensayos funcionales en el marco del HFGP con resultados preliminares, y estudios *in silico*, lo que impide determinar con precisión los mecanismos biológicos subyacentes que explican la relación observada entre estas variantes genéticas y la SG. La falta de estudios funcionales adicionales, como ensayos *in vitro* o *in vivo*, restringe la capacidad para validar si estas variantes alteran procesos biológicos clave como la proliferación celular, apoptosis o modulación inmunitaria, lo cual limita la interpretación de los resultados.

Si bien es evidente que nuestros hallazgos más sólidos hasta la fecha se centran en la asociación de variantes genéticas de autofagia con el riesgo de CCR, cuyos resultados fueron publicados en una revista de alto impacto en 2021 (Sainz et al., 2021), este estudio también constituye un avance significativo en la investigación del pronóstico de los pacientes con CCR, analizando la asociación de SNPs de genes relacionados con la autofagia y la SG. Además, la incorporación de la cohorte CRC Jaén, aunque más pequeña en comparación con las otras, demuestra nuestro firme compromiso con la continuidad de esta línea de investigación.

En definitiva, los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una base sólida para continuar investigando el papel de los SNPs en genes relacionados con la autofagia en la susceptibilidad y el pronóstico del CCR y confirman el valor y el potencial de esta vía para futuras aplicaciones clínicas.



# ***CONCLUSIONES***

## CONCLUSIONES

1. Este estudio proporciona una evaluación exhaustiva de la asociación entre variantes genéticas relacionadas con la autofagia y el riesgo de desarrollar CCR.
2. Marcadores genéticos en los genes *DAPK2* y *ATG5* están asociados con un mayor riesgo a desarrollar CCR, lo que sugiere un papel de estos genes en los mecanismos de susceptibilidad a CCR.
3. El polimorfismo rs11631973G en el gen *DAPK2* modula la producción de IL1 $\beta$  por parte de los granulocitos en respuesta a componentes del microbioma intestinal, lo que sugiere un mecanismo de inflamación crónica mediado por *DAPK2* que podría contribuir al desarrollo de CCR.
4. El alelo G de rs11631973 en el gen *DAPK2* influye sobre el riesgo a desarrollar CCR a través de la modulación del número de células B CD24+CD38+CD27+IgM+, un tipo celular enriquecido en los pacientes con CCR.
5. El alelo G de rs11631973 en el gen *DAPK2* está asociado con una disminución de los niveles séricos de en-RAGE, lo que refuerza la posible implicación de *DAPK2* en la oncogénesis colorrectal a través de la inhibición de la respuesta inmune contra patógenos del tracto colónico, como *Helicobacter Pylori*.
6. El polimorfismo rs546456 en *ATG5* podría influir en el riesgo de CCR mediante la regulación de la respuesta inmune, particularmente a través de la modulación de los niveles de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ , así como la regulación del número de monocitos CD14+CD16- circulantes y los niveles de CCL19 y cortisol en suero.
7. La presencia de los polimorfismos *GRID2*rs9990511, *UVRAG*rs12221774 y *TP73*rs35837097 asocian con la SG de los pacientes con CCR. Las variantes genéticas en *TP73* y *GRID2* asociaron con tiempos de supervivencia más cortos, mientras que la

variante en *UVRAG* se asoció con un mejor pronóstico. Nuestros hallazgos sugieren una posible y potencial implicación biológica de *GRID2*, *UVRAG* y *TP73* en el pronóstico de los pacientes con CCR.

8. Nuestros hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de llevar a cabo estudios adicionales para comprender mejor cómo las variantes genéticas en *DAPK2*, *ATG5*, *GRID2*, *UVRAG* y *TP73* influyen en el desarrollo y el pronóstico del CCR. Combinar estos resultados con otros factores genéticos y ambientales podría mejorar tanto la prevención como el tratamiento del CCR.



# ***GLOSARIO***

## **GLOSARIO**

**ADN** - Ácido Desoxirribonucleico

**ADNtc** - ADN Tumoral Circulante

**AINEs** - Anti-Inflamatorios No Esteroideos

**AKT** - Protein Kinase B (Proteína Quinasa B)

**APC** - Adenomatous Polyposis Coli (Poliposis Adenomatosa Familiar)

**AR** - Ácido Ribonucleico

**ATG** - Autophagy-related Genes (Genes Relacionados con la Autofagia)

**ATG5** - Autophagy Related 5 (Relacionado con la Autofagia 5)

**AUC** - Area Under the Curve (Área Bajo la Curva)

**BCAC** - Breast Cancer Association Consortium (Consortio de la Asociación de Cáncer de Mama)

**BRAF** - v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B (Homólogo B del Oncogén Viral del Sarcoma Murino v-Raf)

**BSA** - Bovine Serum Albumin (Albúmina Sérica Bovina)

**Ca<sup>2+</sup>/calmodulina** - Calcio/Ca<sup>2+</sup> y Calmodulina

**CCL19** - Chemokine Ligand 19 (Ligando Quimiocina 19)

**CCR** - Cáncer Colorrectal

**CD14+** - Molécula de Superficie CD14

**CD16-** - Molécula de Superficie CD16

**CD24+** - Molécula de Superficie CD24

**CD27+** - Molécula de Superficie CD27

**CD38+** - Molécula de Superficie CD38

**CEA** - Antígeno Carcinoembrionario

**CI** - Confidence Interval (Intervalo de Confianza)

**CIMP** - CpG Island Methylator Phenotype (Fenotipo Metilador de Isla CpG)

**CMS** - Consortium Molecular Subtypes (Subtipos Moleculares del Consortio)

**CORSA** - Estudio del Cáncer Colorrectal de Austria

**CpG** - Cytosine-phosphate-Guanine (Citosina-fosfato-Guanina)

- CRISPR** - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas)
- CTLA-4** - Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4 (Proteína 4 Asociada al Linfocito T Citotóxico)
- DAPK1** - Death-Associated Protein Kinase 1 (Quinasa 1 Asociada a la Muerte Celular)
- DAPK2** - Death-Associated Protein Kinase 2 (Quinasa 2 Asociada a la Muerte Celular)
- EGFR** - Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico)
- ELISA** - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)
- ENA** - European Nucleotide Archive (Archivo Europeo de Nucleótidos)
- ENCODE** - Encyclopedia of DNA Elements (Enciclopedia de Elementos de ADN)
- en-RAGE** - Específico Receptor Avanzado de Productos de Glicación
- ERUS** - Endoscopic Ultrasound (Ultrasonografía Endorrectal)
- GEO** - Gene Expression Omnibus (Omnibus de Expresión Génica)
- GTE<sub>x</sub>** - Genotype-Tissue Expression Project (Proyecto de Expresión de Genotipo y Tejido)
- GWAS** - Genome-Wide Association Study (Estudio de Asociación del Genoma Completo)
- H3K4me1** - Marca de Histona H3K4 Metilada en el Residuo 1
- HFGP** - Human Functional Genomics Project (Proyecto de Genómica Funcional Humana)
- ICGC** - International Cancer Genome Consortium (Consortio Internacional del Genoma del Cáncer)
- IFN  $\gamma$**  - Interferon Gamma (Interferón Gamma)
- IGM+** - Inmunoglobulina M
- IL** - Interleucina
- IL1 $\beta$**  - Interleucina 1 Beta
- IMC** - Índice de Masa Corporal
- INDEL** - Insertions and Deletions (Inserciones y Eliminaciones)
- KASPar™** - Tecnología de Genotipado
- Kb** - Kilobases

**KRASG12** - Gen KRAS con la mutación G12

**LAMP2** - Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (Glicoproteína de Membrana Asociada a Lisosomas 2)

**LD** - Linkage Disequilibrium (Desequilibrio de Ligamiento)

**LOH** - Loss of Heterozygosity (Pérdida de Heterocigosidad)

**LPS** - Lipopolysaccharide (Lipopolisacárido)

**LUAD** - Lung Adenocarcinoma (Adenocarcinoma de Pulmón)

**MAPK-ERK** - Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase (Proteína Quinasa Activada por Mitógenos/Cinasa Regulada por Señales Extracelulares)

**MDM** - Monocyte-Derived Macrophages (Macrófagos Derivados de Monocitos)

**MLH1** - MutL Homolog 1 (Homólogo de MutL 1)

**mRNA** - Messenger RNA (ARN Mensajero)

**MSI** - Microsatellite Instability (Inestabilidad de Microsatélites)

**mTOR** - Mammalian Target of Rapamycin (Diana de Rapamicina en Mamíferos)

**mTORC1** - Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (Complejo 1 de la Diana de Rapamicina en Mamíferos)

**MUW** - Universidad Médica de Viena

**NCI** - National Cancer Institute (Instituto Nacional del Cáncer)

**NF- $\kappa$ B** - Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)

**NIH** - National Institutes of Health (Institutos Nacionales de Salud)

**NLRP3** - NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (Familia de Receptores Tipo NOD, que Contienen el Dominio de Pirina 3)

**NRG3** - Neuregulin 3

**NS** - No Significativo

**OMNI** - Omni-Genotyping (Genotipado Omni)

**OR** - Odds Ratio (Razón de Momios)

**PAF** - Poliposis Adenomatosa Familiar

**Pam3Cys** - Synthetic Triacylated Lipopeptide (Lipopeptido Triacilado Sintético)

**PBMCs** - Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células Mononucleares de Sangre)

Periférica)

**PCR** - Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

**PD-L1** - Programmed Death-Ligand 1 (Ligando de la Muerte Celular Programada 1)

**PET** - Positron Emission Tomography (Tomografía por Emisión de Positrones)

**PHA** - Phytohemagglutinin (Fitohemaglutinina)

**PI3K** - Phosphoinositide 3-Kinase (Fosfoinosítido 3-Cinasa)

**PIK3CA** - Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha  
(Subunidad Catalítica Alfa de la Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfato 3-Cinasa)

**PGE2** - Prostaglandin E2 (Prostaglandina E2)

**PRS** - Polygenic Risk Score (Puntuación de Riesgo Poligénico)

**QC** - Quality Control (Control de Calidad)

**R&D** - Research and Development (Investigación y Desarrollo)

**RAGE** - Receptor Avanzado de Productos de Glicación

**RICTOR** - Rapamycin-insensitive Companion of mTOR (Compañero Insensible a la Rapamicina de mTOR)

**RM** - Resonancia Magnética

**RPMI** - Roswell Park Memorial Institute (Instituto Roswell Park Memorial)

**SCNA** - Somatic Copy Number Alterations (Alteraciones en el Número de Copias Somáticas)

**S100A12** - Proteína S100A12

**siRNA** - Small Interfering RNA (Pequeño ARN Interferente)

**SNP** - Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleótido Simple)

**Taqman®** - Tecnología de Genotipado

**TBS** - Tris-Buffered Saline (Solución Salina Amortiguada con Tris)

**TBS-T** - Tris-Buffered Saline with Tween 20 (Solución Salina Amortiguada con Tris y Tween 20)

**TCGA** - The Cancer Genome Atlas (Atlas del Genoma del Cáncer)

**TGF** - Transforming Growth Factor (Factor de Crecimiento Transformante)

**TGFβR** - Transforming Growth Factor Beta Receptor (Receptor de Factor de Crecimiento

Transformante Beta)

**TILs** - Tumor-Infiltrating Lymphocytes (Linfocitos Infiltrantes de Tumor)

**TNF $\alpha$**  - Tumor Necrosis Factor Alpha (Factor de Necrosis Tumoral Alfa)

**TNM** - Tumor, Node, Metastasis (Tumor, Ganglios, Metástasis)

**TP53** - Tumor Protein p53 (Proteína del Tumor p53)

**TP73** - Tumor Protein P73 (Proteína del Tumor P73)

**ULK** - Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase (Quinasa Activadora de la Autofagia Similar a Unc-51)

**VEGF** - Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular)

**Wnt/ $\beta$ -catenina** - Ruta de Señalización Wnt/ $\beta$ -catenina



# ***BIBLIOGRAFÍA***



**BIBLIOGRAFÍA**

- Aarons, C. B., Shanmugan, S., & Bleier, J. I. S. (2014). Management of malignant colon polyps: current status and controversies. *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), 16178–16183. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I43.16178>
- Abdel-Rahman, W. M., & Peltomäki, P. (2004). Molecular basis and diagnostics of hereditary colorectal cancers. *Annals of Medicine*, 36(5), 379–388. <https://doi.org/10.1080/07853890410018222>
- Aghabozorgi, A. S., Bahreyni, A., Soleimani, A., Bahrami, A., Khazaei, M., Ferns, G. A., Avan, A., & Hassanian, S. M. (2019). Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. *Biochimie*, 157, 64–71. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2018.11.003>
- Aguirre-Gamboa, R., Joosten, I., Urbano, P. C. M., van der Molen, R. G., van Rijssen, E., van Cranenbroek, B., Oosting, M., Smeekens, S., Jaeger, M., Zorro, M., Withoff, S., van Herwaarden, A. E., Sweep, F. C. G. J., Netea, R. T., Swertz, M. A., Franke, L., Xavier, R. J., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., ... Koenen, H. J. P. M. (2016). Differential Effects of Environmental and Genetic Factors on T and B Cell Immune Traits. *Cell Reports*, 17(9), 2474–2487. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.053/attachment/a4a04a6b-582f-4daa-b965-e6be3498cbdd/mmc5.pdf>
- Al Bandar, M. H., & Kim, N. K. (2017). Current status and future perspectives on treatment of liver metastasis in colorectal cancer (Review). *Oncology Reports*, 37(5), 2553–2564. <https://doi.org/10.3892/OR.2017.5531/HTML>
- Ali, Z., Zulfiqar, S., Klar, J., Wikström, J., Ullah, F., Khan, A., Abdullah, U., Baig, S., & Dahl, N. (2017). Homozygous GRID2 missense mutation predicts a shift in the D-serine binding domain of GluD2 in a case with generalized brain atrophy and unusual clinical features. *BMC Medical Genetics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0504-6>
- Allen, J. P., Garber, K. B., Perszyk, R., Khayat, C. T., Kell, S. A., Kaneko, M., Quindipan, C., Saitta, S., Ladda, R. L., Hewson, S., Inbar-Feigenberg, M., Prasad, C., Prasad, A.

- N., Olewiler, L., Mu, W., Rosenthal, L. S., Scala, M., Striano, P., Zara, F., ... Traynelis, S. F. (2024). Clinical features, functional consequences, and rescue pharmacology of missense GRID1 and GRID2 human variants. *Human Molecular Genetics*, 33(4), 355–373. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDAD188>
- Amre, D. K., Mack, D. R., Morgan, K., Krupoves, A., Costea, I., Lambrette, P., Grimard, G., Dong, J., Feguary, H., Bucionis, V., Deslandres, C., Levy, E., & Seidman, E. G. (2009). Autophagy gene ATG16L1 but not IRGM is associated with Crohn's disease in Canadian children. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(4), 501–507. <https://doi.org/10.1002/ibd.20785>
- André, T., Shiu, K.-K., Kim, T. W., Jensen, B. V., Jensen, L. H., Punt, C., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Benavides, M., Gibbs, P., de la Fouchardiere, C., Rivera, F., Elez, E., Bendell, J., Le, D. T., Yoshino, T., Van Cutsem, E., Yang, P., Farooqui, M. Z. H., ... Diaz, L. A. (2020). Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 383(23), 2207–2218. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2017699>
- Argilés, G., Tabernero, J., Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., Laurent-Puig, P., Quirke, P., Yoshino, T., Taieb, J., Martinelli, E., & Arnold, D. (2020a). Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 31(10), 1291–1305. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.06.022>
- Argilés, G., Tabernero, J., Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., Laurent-Puig, P., Quirke, P., Yoshino, T., Taieb, J., Martinelli, E., & Arnold, D. (2020b). Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 31(10), 1291–1305. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.06.022>
- Athanasiou, C. D., Markides, G. A., Kotb, A., Jia, X., Gonsalves, S., & Miskovic, D. (2016). Open compared with laparoscopic complete mesocolic excision with central lymphadenectomy for colon cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal*

- Disease : The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 18(7), O224–O235. <https://doi.org/10.1111/CODI.13385>
- Bai, Z., Zhou, Y., Ye, Z., Xiong, J., Lan, H., & Wang, F. (2022). Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: The Fundamental Indication and Application on Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.808964>
- Barresi, V., Bonetti, L. R., Leni, A., Caruso, R. A., & Tuccari, G. (2015). Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histology and Histopathology*, 30(9), 1059–1067. <https://doi.org/10.14670/HH-11-633>
- Basile, D., Broudin, C., Emile, J. F., Falcoz, A., Pagès, F., Mineur, L., Bennouna, J., Louvet, C., Artru, P., Fratte, S., Ghiringhelli, F., André, T., Derangère, V., Vernerey, D., Taieb, J., & Svrcek, M. (2022). Tumor budding is an independent prognostic factor in stage III colon cancer patients: a post-hoc analysis of the IDEA-France phase III trial (PRODIGE-GERCOR). *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 33(6), 628–637. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2022.03.002>
- Bateman, A. C. (2014). Pathology of serrated colorectal lesions. *Journal of Clinical Pathology*, 67(10), 865–874. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202175>
- Batra, A., Rigo, R., Sheka, D., & Cheung, W. Y. (2020). Real-world evidence on adjuvant chemotherapy in older adults with stage II/III colon cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12(6), 604–608. <https://doi.org/10.4251/WJGO.V12.I6.604>
- Benedek, Z., Boér, S. T., Bauer, O., Sárdi, K., Todor, A., Suciu, N., & Coros, M. F. (2020). An Overview of Five-Year Survival in Rectal Cancer in Relation to Lymph Node Status. *Chirurgia (Bucharest, Romania : 1990)*, 115(6), 747–755. <https://doi.org/10.21614/CHIRURGIA.115.6.747>
- Ber, Y., Shiloh, R., Gilad, Y., Degani, N., Bialik, S., & Kimchi, A. (2014). DAPK2 is a novel regulator of mTORC1 activity and autophagy. *Cell Death & Differentiation* 2015 22:3, 22(3), 465–475. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.177>

- Betge, J., Kornprat, P., Pollheimer, M. J., Lindtner, R. A., Schlemmer, A., Rehak, P., Vieth, M., & Langner, C. (2012). Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 19(12), 3706–3712. <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2426-z>
- Boccaccino, A., Borelli, B., Intini, R., Antista, M., Bensi, M., Rossini, D., Passardi, A., Tamberi, S., Giampieri, R., Antonuzzo, L., Noto, L., Roviello, G., Zichi, C., Salati, M., Puccini, A., Noto, C., Parisi, A., Rihawi, K., Persano, M., ... Cremolini, C. (2022). Encorafenib plus cetuximab with or without binimetinib in patients with BRAF V600E-mutated metastatic colorectal cancer: real-life data from an Italian multicenter experience. *ESMO Open*, 7(3). <https://doi.org/10.1016/J.ESMOOP.2022.100506>
- Brown, C. A., Lally, C., Kupelian, V., & Dana Flanders, W. (2021). Estimated Prevalence and Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis and SOD1 and C9orf72 Genetic Variants. *Neuroepidemiology*, 55(5), 342–353. <https://doi.org/10.1159/000516752>
- Bryant, D., Liu, Y., Datta, S., Hariri, H., Seda, M., Anderson, G., Peskett, E., Demetriou, C., Sousa, S., Jenkins, D., Clayton, P., Bitner-Glindzicz, M., Moore, G. E., Henne, W. M., & Stanier, P. (2018). SNX14 mutations affect endoplasmic reticulum-associated neutral lipid metabolism in autosomal recessive spinocerebellar ataxia 20. *Human Molecular Genetics*, 27(11), 1927–1940. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDY101>
- Burada, F., Nicoli, E. R., Ciurea, M. E., Uscatu, D. C., Ioana, M., & Gheonea, D. I. (2015). Autophagy in colorectal cancer: An important switch from physiology to pathology. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 7(11), 271–284. <https://doi.org/10.4251/WJGO.V7.I11.271>
- Butt, J., & Epplein, M. (2019). Helicobacter pylori and colorectal cancer-A bacterium going abroad? *PLoS Pathogens*, 15(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007861>
- Cai, Y., Yan, P., Zhang, G., Yang, W., Wang, H., & Cheng, X. (2018). Long non-coding RNA TP73-AS1 sponges miR-194 to promote colorectal cancer cell proliferation,

- migration and invasion via up-regulating TGF  $\alpha$ . *Cancer Biomarkers*, 23(1), 145–156. <https://doi.org/10.3233/CBM-181503>
- Cervantes, A., Adam, R., Roselló, S., Arnold, D., Normanno, N., Taïeb, J., Seligmann, J., De Baere, T., Osterlund, P., Yoshino, T., & Martinelli, E. (2023a). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 34(1), 10–32. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2022.10.003>
- Cervantes, A., Adam, R., Roselló, S., Arnold, D., Normanno, N., Taïeb, J., Seligmann, J., De Baere, T., Osterlund, P., Yoshino, T., & Martinelli, E. (2023b). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up ☆. *Annals of Oncology*, 34(1), 10–32. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2022.10.003/ATTACHMENT/0CA0C13F-F566-49FF-A0D0-E3D28EF76DB6/MMC1.PDF>
- Chan, D. L. H., Segelov, E., Wong, R. S. H., Smith, A., Herbertson, R. A., Li, B. T., Tebbutt, N., Price, T., & Pavlakis, N. (2017). Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors for metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 27(6). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007047.pub2>
- Chen, K., Collins, G., Wang, H., & Toh, J. W. T. (2021). Pathological Features and Prognostication in Colorectal Cancer. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 28(6), 5356–5383. <https://doi.org/10.3390/CURRONCOL28060447>
- Choi, J., Jang, H., Xuan, Z., & Park, D. (2024). Emerging roles of ATG9/ATG9A in autophagy: implications for cell and neurobiology. *Autophagy*. <https://doi.org/10.1080/15548627.2024.2384349>
- Ciardiello, D., Mauri, G., Sartore-Bianchi, A., Siena, S., Zampino, M. G., Fazio, N., & Cervantes, A. (2024). The role of anti-EGFR rechallenge in metastatic colorectal cancer, from available data to future developments: A systematic review. *Cancer Treatment Reviews*, 124. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2024.102683>
- Clapper, M. L. (2000). Genetic polymorphism and cancer risk. *Current Oncology Reports*, 2(3), 251–256. <https://doi.org/10.1007/S11912-000-0075-Z>

- Cogli, L., Progida, C., Thomas, C. L., Spencer-Dene, B., Donno, C., Schiavo, G., & Bucci, C. (2013). Charcot-Marie-Tooth type 2B disease-causing RAB7A mutant proteins show altered interaction with the neuronal intermediate filament peripherin. *Acta Neuropathologica*, 125(2), 257–272. <https://doi.org/10.1007/S00401-012-1063-8>
- Cong, Y., So, V., Tijssen, M. A. J., Verbeek, D. S., Reggiori, F., & Mauthe, M. (2021). WDR45, one gene associated with multiple neurodevelopmental disorders. *Autophagy*, 17(12), 3908–3923. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1899669>
- Coppola, D., Khalil, F., Eschrich, S. A., Boulware, D., Yeatman, T., & Wang, H. G. (2008). Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer*, 113(10), 2665–2670. <https://doi.org/10.1002/CNCR.23892>
- Correa, P., & Houghton, J. M. (2007). Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 133(2), 659–672. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2007.06.026>
- Crockett, S. D., & Nagtegaal, I. D. (2019). Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*, 157(4), 949–966.e4. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2019.06.041>
- Cunningham, L. A., Gasior, A., & Kalady, M. F. (2022). Management of Colorectal Cancer in Hereditary Syndromes. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 31(2), 307–319. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2021.11.010>
- Czene, K., Lichtenstein, P., & Hemminki, K. (2002). Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *International Journal of Cancer*, 99(2), 260–266. <https://doi.org/10.1002/IJC.10332>
- Dariya, B., Aliya, S., Merchant, N., Alam, A., & Nagaraju, G. P. (2020). Colorectal Cancer Biology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 25(2), 71–94. <https://doi.org/10.1615/CRITREVONCOG.2020035067>
- De Smedt, L., Palmans, S., Govaere, O., Moisse, M., Boeckx, B., De Hertogh, G., Prenen, H., Van Cutsem, E., Tejpar, S., Tousseyn, T., & Sagaert, X. (2015). Expression of FOXP1 and Colorectal Cancer Prognosis. *Laboratory Medicine*, 46(4), 299–311. <https://doi.org/10.1309/LM7IHV2NJI1PHMXC>

- De Tito, S., Hervás, J. H., van Vliet, A. R., & Tooze, S. A. (2020). The Golgi as an Assembly Line to the Autophagosome. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(6), 484–496. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2020.03.010>
- De'angelis, G. L., Bottarelli, L., Azzoni, C., De'angelis, N., Leandro, G., Di Mario, F., Gaiani, F., & Negri, F. (2018). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomedical*, 89(9-S), 97–101. <https://doi.org/10.23750/ABM.V89I9-S.7960>
- Debnath, J., Gammoh, N., & Ryan, K. M. (2023). Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 24(8), 560–575. <https://doi.org/10.1038/S41580-023-00585-Z>
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., Nelson, D. A., Jin, S., & White, E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10(1), 51–64. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2006.06.001>
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). *Colorectal cancer*. 394(10207), 1467–1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
- Deretic, V., Saitoh, T., & Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 13(10), 722–737. <https://doi.org/10.1038/NRI3532>
- Ding, C., Zhang, K., Chen, Y., & Hu, H. (2023). LncRNA TP73-AS1 enhances the malignant properties of colorectal cancer by increasing SPP-1 expression through miRNA-539-5p sponging. *Pathology, Research and Practice*, 243. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2023.154365>
- Drilon, A., Laetsch, T. W., Kummar, S., DuBois, S. G., Lassen, U. N., Demetri, G. D., Nathenson, M., Doebele, R. C., Farago, A. F., Pappo, A. S., Turpin, B., Dowlati, A., Brose, M. S., Mascarenhas, L., Federman, N., Berlin, J., El-Deiry, W. S., Baik, C., Deeken, J., ... Hyman, D. M. (2018). Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *The New England Journal of Medicine*, 378(8), 731–739. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1714448>

- Eddy, K., Eddin, M. N., Fateeva, A., Pompili, S. V. B., Shah, R., Doshi, S., & Chen, S. (2022). Implications of a Neuronal Receptor Family, Metabotropic Glutamate Receptors, in Cancer Development and Progression. *Cells*, 11(18). <https://doi.org/10.3390/CELLS11182857>
- Erichsen, H. C., & Chanock, S. J. (2004). SNPs in cancer research and treatment. *British Journal of Cancer*, 90(4), 747–751. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6601574>
- Fan, A., Wang, B., Wang, X., Nie, Y., Fan, D., Zhao, X., & Lu, Y. (2021). Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective. *International Journal of Biological Sciences*, 17(14), 3837–3849. <https://doi.org/10.7150/IJBS.64077>
- Fan, J., Xu, H., Liu, B., Jing, F., He, Q., Zheng, S., Shi, H., Jiao, L., & Fan, C. (2022). Association of a novel antisense lncRNA TP73-AS1 polymorphisms and expression with colorectal cancer susceptibility and prognosis. *Genes & Genomics*, 44(7), 889–897. <https://doi.org/10.1007/S13258-021-01161-5>
- Feng, C., Feng, P., Ku, B., Oh, B. H., & Jung, J. U. (2007a). UVRAG: A new player in autophagy and tumor cell growth. *Autophagy*, 3(1), 69–71. <https://doi.org/10.4161/auto.3437>
- Feng, C., Feng, P., Ku, B., Oh, B. H., & Jung, J. U. (2007b). UVRAG: a new player in autophagy and tumor cell growth. *Autophagy*, 3(1), 69–71. <https://doi.org/10.4161/AUTO.3437>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Donald Parkin, M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer Epidemiology. *International Journal of Cancer*, 149, 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fernández Montes, A., Alonso, V., Aranda, E., Élez, E., García Alfonso, P., Grávalos, C., Maurel, J., Vera, R., Vidal, R., & Aparicio, J. (2023). SEOM-GEMCAD-TTD clinical guidelines for the systemic treatment of metastatic colorectal cancer (2022). *Clinical and Translational Oncology*, 25(9), 2718–2731. <https://doi.org/10.1007/S12094-023-03199-1>

- Fernandez-Rozadilla, C., Cazier, J. B., Tomlinson, I. P., Carvajal-Carmona, L. G., Palles, C., Lamas, M. J., Baiget, M., López-Fernández, L. A., Brea-Fernández, A., Abulí, A., Bujanda, L., Clofent, J., Gonzalez, D., Xicola, R., Andreu, M., Bessa, X., Jover, R., Llor, X., Moreno, V., ... Ruiz-Ponte, C. (2013). A colorectal cancer genome-wide association study in a Spanish cohort identifies two variants associated with colorectal cancer risk at 1p33 and 8p12. *BMC Genomics*, *14*(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-55/TABLES/3>
- Fulop, Z. Z., Gurzu, S., Bara, T., Dragus, E., Voidazan, S., Baniás, L., & Jung, I. (2019). Lymph node ratio, an independent prognostic factor for patients with stage II-III rectal carcinoma. *Pathology, Research and Practice*, *215*(6), 152384.  
<https://doi.org/10.1016/J.PRP.2019.03.013>
- Furuta, G. T., Nieuwenhuis, E. E. S., Karhausen, J., Gleich, G., Blumberg, R. S., Lee, J. J., & Ackerman, S. J. (2005). Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *289*(5). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00015.2005>
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J. M., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D. A., Karantza, V., Kimmelman, A., Kumar, S., Levine, B., Maiuri, M. C., Martin, S. J., Penninger, J., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Simon, H., ... Kroemer, G. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal*, *34*(7), 856–880.  
<https://doi.org/10.15252/EMBJ.201490784>
- Gálvez-Montosa, F., Peduzzi, G., Sanchez-Maldonado, J. M., ter Horst, R., Cabrera-Serrano, A. J., Gentiluomo, M., Macaudo, A., Luque, N., Ünal, P., García-Verdejo, F. J., Li, Y., López López, J. A., Stein, A., Bueno-de-Mesquita, H. B., Arcidiacono, P. G., Zanette, D. L., Kahlert, C., Perri, F., Soucek, P., ... Sainz, J. (2024). Polymorphisms within autophagy-related genes as susceptibility biomarkers for pancreatic cancer: A meta-analysis of three large European cohorts and functional characterization. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/IJC.35196>

- Gammoh, N. (2020). The multifaceted functions of ATG16L1 in autophagy and related processes. *Journal of Cell Science*, 133(20). <https://doi.org/10.1242/JCS.249227>
- Gao, Y., Zhang, S., & Gao, X. (2023). TP73-AS1 rs3737589 Polymorphism is Associated With the Clinical Stage of Colorectal Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 1(22), 3931875. <https://doi.org/10.1155/2023/3931875>
- Geering, B., Stoeckle, C., Rožman, S., Oberson, K., Benarafa, C., & Simon, H.-U. (2014). DAPK2 positively regulates motility of neutrophils and eosinophils in response to intermediary chemoattractants. *Journal of Leukocyte Biology*, 95(2), 293–303. <https://doi.org/10.1189/JLB.0813462>
- Geering, B., Zokouri, Z., Hürlemann, S., Gerrits, B., Ausländer, D., Britschgi, A., Tschan, M. P., Simon, H.-U., & Fussenegger, M. (2015). Identification of Novel Death-Associated Protein Kinase 2 Interaction Partners by Proteomic Screening Coupled with Bimolecular Fluorescence Complementation. *Molecular and Cellular Biology*, 36(1), 132–143. <https://doi.org/10.1128/MCB.00515-15>
- Gelsomino, F., Barbolini, M., Spallanzani, A., Pugliese, G., & Cascinu, S. (2016). The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treatment Reviews*, 51, 19–26. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2016.10.005>
- Gerada, C., & Ryan, K. M. (2020). Autophagy, the innate immune response and cancer. *Molecular Oncology*, 14(9), 1913–1929. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12774>
- Gerrits, E., Giannini, L. A. A., Brouwer, N., Melhem, S., Seilhean, D., Le Ber, I., Kamermans, A., Kooij, G., de Vries, H. E., Boddeke, E. W. G. M., Seelaar, H., van Swieten, J. C., & Eggen, B. J. L. (2022). Neurovascular dysfunction in GRN-associated frontotemporal dementia identified by single-nucleus RNA sequencing of human cerebral cortex. *Nature Neuroscience*, 25(8), 1034–1048. <https://doi.org/10.1038/S41593-022-01124-3>
- Gil, J., Ramsey, D., Pawlowski, P., Szmidka, E., Leszczynski, P., Bebenek, M., & Sasiadek, M. M. (2018). The Influence of Tumor Microenvironment on ATG4D Gene Expression in Colorectal Cancer Patients. *Medical Oncology*, 35(12). <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1220-6>

- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/PATH.2697>
- Grady, W. M., & Carethers, J. M. (2008). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079–1099. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2008.07.076>
- Grimm, W. A., Messer, J. S., Murphy, S. F., Nero, T., Lodolce, J. P., Weber, C. R., Logsdon, M. F., Bartulis, S., Sylvester, B. E., Springer, A., Dougherty, U., Niewold, T. B., Kupfer, S. S., Ellis, N., Huo, D., Bissonnette, M., & Boone, D. L. (2016). The Thr300Ala variant in ATG16L1 is associated with improved survival in human colorectal cancer and enhanced production of type I interferon. *Gut*, 65(3), 456–464. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2014-308735>
- Grimmel, M., Backhaus, C., & Proikas-Cezanne, T. (2015). WIPI-Mediated Autophagy and Longevity. *Cells*, 4(2), 202–217. <https://doi.org/10.3390/CELLS4020202>
- Gu, R., Fang, H., Wang, R., Dai, W., & Cai, G. (2024). A comprehensive overview of the molecular features and therapeutic targets in BRAFV600E-mutant colorectal cancer. *Clinical and Translational Medicine*, 14(7). <https://doi.org/10.1002/CTM2.1764>
- Guevara, M., Molinuevo, A., Salmerón, D., Marcos-Gragera, R., & Ardanaz, E. (2022). Cancer Survival in Adults in Spain: A Population-Based Study of the Spanish Network of Cancer Registries (REDECAN). *Cancers*, 14, 12. <https://doi.org/10.3390/cancers14102441>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., De Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., ... Tejpar, S. (2015a). The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nature Medicine*, 21(11), 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/NM.3967>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., De Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., ... Tejpar, S. (2015b). The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nature Medicine*, 21(11), 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/NM.3967>

- Guo, F., Weigl, K., Carr, P. R., Heisser, T., Jansen, L., Knebel, P., Chang-Claude, J., Hoffmeister, M., & Brenner, H. (2020). Use of Polygenic Risk Scores to Select Screening Intervals After Negative Findings From Colonoscopy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18(12), 2742-2751.e7.  
<https://doi.org/10.1016/J.CGH.2020.04.077>
- Guo, L., Wang, C., Qiu, X., Pu, X., & Chang, P. (2020). Colorectal Cancer Immune Infiltrates: Significance in Patient Prognosis and Immunotherapeutic Efficacy. *Frontiers in Immunology*, 11(28), 1052. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01052>
- Gupta, R., Bhatt, K., Johnston, T. P., Prabhavalkar, K. S., & Kumar Bhatt, L. (2019). Colon cancer stem cells: Potential target for the treatment of colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 20(8), 1068–1082.  
<https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1599660>
- Gupta, H. V., Vengoechea, J., Sahaya, K., & Virmani, T. (2015). A splice site mutation in ATP6AP2 causes X-linked intellectual disability, epilepsy, and parkinsonism. *Parkinsonism & Related Disorders*, 21(12), 1473–1475.  
<https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2015.10.001>
- Haley, K. P., Delgado, A. G., Piazuolo, M. B., Mortensen, B. L., Correa, P., Damo, S. M., Chazin, W. J., Skaar, E. P., & Gaddy, J. A. (2015). The Human Antimicrobial Protein Calgranulin C Participates in Control of Helicobacter pylori Growth and Regulation of Virulence. *Infection and Immunity*, 83(7), 2944–2956.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00544-15>
- Hampel, H., Kalady, M. F., Pearlman, R., & Stanich, P. P. (2022a). Hereditary Colorectal Cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 36(3), 429–447.  
<https://doi.org/10.1016/J.HOC.2022.02.002>
- Hampel, H., Kalady, M. F., Pearlman, R., & Stanich, P. P. (2022b). Hereditary Colorectal Cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 36(3), 429–447.  
<https://doi.org/10.1016/J.HOC.2022.02.002>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

- Harnett, M. M., Pineda, M. A., Latré de Laté, P., Eason, R. J., Besteiro, S., Harnett, W., & Langsley, G. (2017). From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomedical Journal*, 40(1), 9–22.  
<https://doi.org/10.1016/J.BJ.2016.12.004>
- He, S., & Liang, C. (2015). Frameshift mutation of UVRAG: Switching a tumor suppressor to an oncogene in colorectal cancer. *Autophagy*, 11(10), 1939–1940.  
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1086523>
- He, S., Zhao, Z., Yang, Y., O’Connell, D., Zhang, X., Oh, S., Ma, B., Lee, J. H., Zhang, T., Varghese, B., Yip, J., Dolatshahi Pirooz, S., Li, M., Zhang, Y., Li, G. M., Ellen Martin, S., Machida, K., & Liang, C. (2015). Truncating mutation in the autophagy gene UVRAG confers oncogenic properties and chemosensitivity in colorectal cancers. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8839>
- He, X., Wu, K., Ogino, S., Giovannucci, E. L., Chan, A. T., & Song, M. (2018). Association Between Risk Factors for Colorectal Cancer and Risk of Serrated Polyps and Conventional Adenomas. *Gastroenterology*, 155(2), 355–373.e18.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.019>
- Hofer, P., Hagmann, M., Brezina, S., Dolejsi, E., Mach, K., Leeb, G., Baierl, A., Buch, S., Sutterlüty-Fall, H., Karner-Hanusch, J., Bergmann, M. M., Bachleitner-Hofmann, T., Stift, A., Gerger, A., Rötzer, K., Karner, J., Stättner, S., Waldenberger, M., Meitinger, T., ... Gsur, A. (2017). Bayesian and frequentist analysis of an Austrian genome-wide association study of colorectal cancer and advanced adenomas. *Oncotarget*, 8(58), 98623–98634. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.21697>
- Holzer, E., Martens, S., & Tulli, S. (2024). The Role of ATG9 Vesicles in Autophagosome Biogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 436(15).  
<https://doi.org/10.1016/J.JMB.2024.168489>
- Homer, C. R., Richmond, A. L., Rebert, N. A., Achkar, J.-P., & McDonald, C. (2010). ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn’s disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 139(5), 1630–1641, 1641.e1–2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.07.006>

- Hu, Y., & Reggiori, F. (2022). Molecular regulation of autophagosome formation. *Biochemical Society Transactions*, 50(1), 55–69.  
<https://doi.org/10.1042/BST20210819>
- Huang, H., Ouyang, Q., Mei, K., Liu, T., Sun, Q., Liu, W., & Liu, R. (2023). Acetylation of SCFD1 regulates SNARE complex formation and autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 19(1), 189–203. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2064624>
- Huang, Z., Li, C., Huang, Y., Liang, W., & Tao, H. (2024). Efficacy and safety of PD-1/L1 inhibitors as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1425596>
- Hullinger, R., Li, M., Wang, J., Peng, Y., Dowell, J. A., Bomba-Warczak, E., Mitchell, H. A., Burger, C., Chapman, E. R., Denu, J. M., Li, L., & Puglielli, L. (2016). Increased expression of AT-1/SLC33A1 causes an autistic-like phenotype in mice by affecting dendritic branching and spine formation. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(7), 1267–1284. <https://doi.org/10.1084/JEM.20151776>
- Humbert, M., Federzoni, E. A., Britschgi, A., Schläfli, A. M., Valk, P. J. M., Kaufmann, T., Haferlach, T., Behre, G., Simon, H.-U., Torbett, B. E., Fey, M. F., & Tschan, M. P. (2014). The tumor suppressor gene DAPK2 is induced by the myeloid transcription factors PU.1 and C/EBP $\alpha$  during granulocytic differentiation but repressed by PML-RAR $\alpha$  in APL. *Journal of Leukocyte Biology*, 95(1), 83–93.  
<https://doi.org/10.1189/JLB.1112608>
- Huyghe, J. R., Bien, S. A., Harrison, T. A., Kang, H. M., Chen, S., Schmit, S. L., Conti, D. V., Qu, C., Jeon, J., Edlund, C. K., Greenside, P., Wainberg, M., Schumacher, F. R., Smith, J. D., Levine, D. M., Nelson, S. C., Sinnott-Armstrong, N. A., Albanes, D., Alonso, M. H., ... Peters, U. (2018). Discovery of common and rare genetic risk variants for colorectal cancer. *Nature Genetics* 2018 51:1, 51(1), 76–87.  
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0286-6>
- Imai, K., Hao, F., Fujita, N., Tsuji, Y., Oe, Y., Araki, Y., Hamasaki, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2016). Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required

- for autophagosome formation. *Journal of Cell Science*, 129(20), 3781–3791.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.196196>
- Iula, L., Keitelman, I. A., Sabbione, F., Fuentes, F., Guzman, M., Galletti, J. G., Gerber, P. P., Ostrowski, M., Geffner, J. R., Jancic, C. C., & Trevani, A. S. (2018). Autophagy mediates interleukin-1 $\beta$  secretion in human neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 9(1), 269. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00269/BIBTEX>
- Janssens, K., Lambrechts, C., Geerinckx, B., Op de Beeck, K., Van Camp, G., Oliveres, H., Prenen, H., Vandamme, T., & Peeters, M. (2023). New Developments in Treating RAS-Mutated Metastatic Colorectal Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 24(8), 965–987. <https://doi.org/10.1007/S11864-023-01095-Y>
- Jaradat, S., Al-Rababah, B., Hazza, I., Akl, K., Saca, E., & Al-Younis, D. (2015). Molecular analysis of the CTNS gene in Jordanian families with nephropathic cystinosis. *Nefrologia : Publicacion Oficial de La Sociedad Española Nefrologia*, 35(6), 547–553. <https://doi.org/10.1016/J.NEFRO.2015.09.009>
- Jia, Z., Peng, J., Yang, Z., Chen, J., Liu, L., Luo, D., & He, P. (2019). Long non-coding RNA TP73-AS1 promotes colorectal cancer proliferation by acting as a ceRNA for miR-103 to regulate PTEN expression. *Gene*, 685, 222–229.  
<https://doi.org/10.1016/J.GENE.2018.11.072>
- Jin, X., You, L., Qiao, J., Han, W., & Pan, H. (2024). Autophagy in colitis-associated colon cancer: exploring its potential role in reducing initiation and preventing IBD-Related CAC development. *Autophagy*, 20(2), 242–258.  
<https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2259214>
- Jo, Y. K., Park, N. Y., Shin, J. H., Jo, D. S., Bae, J. E., Choi, E. S., Maeng, S., Jeon, H. B., Roh, S. A., Chang, J. W., Kim, J. C., & Cho, D. H. (2018). Up-regulation of UVRAG by HDAC1 Inhibition Attenuates 5FU-induced Cell Death in HCT116 Colorectal Cancer Cells. *Anticancer Research*, 38(1), 271–277.  
<https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.12218>
- Katoh, M., & Katoh, M. (2003). Identification and characterization of human GRID2IP gene and rat Grid2ip gene in silico. *International Journal of Molecular Medicine*, 12(6), 1015–1019. <https://doi.org/10.3892/IJMM.12.6.1015/HTML>

- Kijima, S., Sasaki, T., Nagata, K., Utano, K., Lefor, A. T., & Sugimot, H. (2014). Preoperative evaluation of colorectal cancer using CT colonography, MRI, and PET/CT. *World Journal of Gastroenterology*, 20(45), 16964–16975. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I45.16964>
- Kong, X., Li, J., Cai, Y., Tian, Y., Chi, S., Tong, D., Hu, Y., Yang, Q., Li, J., Poston, G., Yuan, Y., & Ding, K. (2018). A modified TNM staging system for non-metastatic colorectal cancer based on nomogram analysis of SEER database. *BMC Cancer*, 18(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3796-1>
- Kopetz, S., Grothey, A., Yaeger, R., Van Cutsem, E., Desai, J., Yoshino, T., Wasan, H., Ciardiello, F., Loupakakis, F., Hong, Y. S., Steeghs, N., Guren, T. K., Arkenau, H.-T., Garcia-Alfonso, P., Pfeiffer, P., Orlov, S., Lonardi, S., Elez, E., Kim, T.-W., ... Tabernero, J. (2019). Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 381(17), 1632–1643. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1908075>
- Ladabaum, U., Dominitz, J. A., Kahi, C., & Schoen, R. E. (2020). Strategies for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology*, 158(2), 418–432. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2019.06.043>
- Lauzier, A., Normandeau-Guimond, J., Vaillancourt-Lavigueur, V., Boivin, V., Charbonneau, M., Rivard, N., Scott, M. S., Dubois, C. M., & Jean, S. (2019). Colorectal cancer cells respond differentially to autophagy inhibition in vivo. *Scientific Reports*, 9(1), 11316. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-47659-7>
- Law, P. J., Timofeeva, M., Fernandez-Rozadilla, C., Broderick, P., Studd, J., Fernandez-Tajes, J., Farrington, S., Svinti, V., Palles, C., Orlando, G., Sud, A., Holroyd, A., Penegar, S., Theodoratou, E., Vaughan-Shaw, P., Campbell, H., Zgaga, L., Hayward, C., Campbell, A., ... Dunlop, M. G. (2019). Association analyses identify 31 new risk loci for colorectal cancer susceptibility. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-09775-W>

- Lee, D. H., & Lee, J. M. (2017). Whole-body PET/MRI for colorectal cancer staging: Is it the way forward? *Journal of Magnetic Resonance Imaging : JMRI*, 45(1), 21–35. <https://doi.org/10.1002/JMRI.25337>
- Lee, G. H., Malietzis, G., Askari, A., Bernardo, D., Al-Hassi, H. O., & Clark, S. K. (2015). Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? - a systematic review. *European Journal of Surgical Oncology : The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 41(3), 300–308. <https://doi.org/10.1016/J.EJSO.2014.11.001>
- Leowattana, W., Leowattana, P., & Leowattana, T. (2023). Systemic treatment for metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 29(10), 1569–1588. <https://doi.org/10.3748/WJG.V29.I10.1569>
- Lessard, C. J., Sajuthi, S., Zhao, J., Kim, K., Ice, J. A., Li, H., Ainsworth, H., Rasmussen, A., Kelly, J. A., Marion, M., Bang, S. Y., Bin Joo, Y., Choi, J., Lee, H. S., Mo Kang, Y., Suh, C. H., Tae Chung, W., Lee, S. K., Choe, J. Y., ... Tsao, B. P. (2016). Identification of a Systemic Lupus Erythematosus Risk Locus Spanning ATG16L2, FCHSD2, and P2RY2 in Koreans. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 68(5), 1197–1209. <https://doi.org/10.1002/ART.39548>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*, 176(1–2), 11–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>
- Li, C., Weng, J., Yang, L., Gong, H., & Liu, Z. (2024). Development of an anoikis-related gene signature and prognostic model for predicting the tumor microenvironment and response to immunotherapy in colorectal cancer. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1378305>
- Li, D., Fu, Q., Li, M., Li, J., Yin, C., Zhao, J., & Li, F. (2017). Primary tumor site and anti-EGFR monoclonal antibody benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Future Oncology (London, England)*, 13(12), 1115–1127. <https://doi.org/10.2217/FON-2016-0468>
- Li, G., Lin, J., Gao, X., Su, H., Lin, R., Gao, H., Feng, Z., Wu, H., Feng, B., Zuo, K., Li, Y., Wu, W., Fang, L., & Liu, Z. (2023). Intestinal epithelial pH-sensing receptor GPR65 maintains mucosal homeostasis via regulating antimicrobial defense and

- restrains gut inflammation in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, 15(2).  
<https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2257269>
- Li, J., Yi, C. H., Hu, Y. T., Li, J. S., Yuan, Y., Zhang, S. Z., Zheng, S., & Ding, K. F. (2016). TNM Staging of Colorectal Cancer Should be Reconsidered According to Weighting of the T Stage: Verification Based on a 25-Year Follow-Up. *Medicine*, 95(6), e2711. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002711>
- Li, W., He, P., Huang, Y., Li, Y. F., Lu, J., Li, M., Kurihara, H., Luo, Z., Meng, T., Onishi, M., Ma, C., Jiang, L., Hu, Y., Gong, Q., Zhu, D., Xu, Y., Liu, R., Liu, L., Yi, C., ... Feng, D. (2020). Selective autophagy of intracellular organelles: Recent research advances. *Theranostics*, 11(1), 222–256. <https://doi.org/10.7150/THNO.49860>
- Li, W., & Zhang, L. (2019). Regulation of ATG and Autophagy Initiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1206, 41–65. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_2)
- Li, W., Zhou, C., Yu, L., Hou, Z., Liu, H., Kong, L., Xu, Y., He, J., Lan, J., Ou, Q., Fang, Y., Lu, Z., Wu, X., Pan, Z., Peng, J., & Lin, J. (2024). Tumor-derived lactate promotes resistance to bevacizumab treatment by facilitating autophagy enhancer protein RUBCNL expression through histone H3 lysine 18 lactylation (H3K18la) in colorectal cancer. *Autophagy*, 20(1), 114–130. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2249762>
- Li, X., He, S., & Ma, B. (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular Cancer*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-020-1138-4>
- Li, X. L., Zhou, J., Chen, Z. R., & Chng, W. J. (2015). P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology*, 21(1), 84–93. <https://doi.org/10.3748/WJG.V21.I1.84>
- Li, Y., Oosting, M., Smeekens, S. P., Jaeger, M., Aguirre-Gamboa, R., Le, K. T. T., Deelen, P., Ricaño-Ponce, I., Schoffelen, T., Jansen, A. F. M., Swertz, M. A., Withoff, S., van de Vosse, E., van Deuren, M., van de Veerdonk, F., Zhernakova, A., van der Meer, J. W. M., Xavier, R. J., Franke, L., ... Netea, M. G. (2016). A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine Production in Humans. *Cell*, 167(4), 1099–1110.e14.

- <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.10.017/ATTACHMENT/DDF52F49-1F49-4519-9752-94007C6E0406/MMC3.XLSX>
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B. H., & Jung, J. U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature Cell Biology*, 8(7), 688–698. <https://doi.org/10.1038/ncb1426>
- Liang, P. S., & Dominitz, J. A. (2019a). Colorectal Cancer Screening: Is Colonoscopy the Best Option? *Medical Clinics of North America*, 103(1), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.08.010>
- Liang, P. S., & Dominitz, J. A. (2019b). Colorectal Cancer Screening: Is Colonoscopy the Best Option? *Medical Clinics of North America*, 103(1), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.08.010>
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., & Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England Journal of Medicine*, 343(2), 78–85. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007133430201>
- Lim, S. B., Yu, C. S., Jang, S. J., Kim, T. W., Kim, J. H., & Kim, J. C. (2010). Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, 53(4), 377–384. <https://doi.org/10.1007/dcr.0b013e3181cf8ae5>
- Liu, D., Xing, R., Zhang, Q., Tian, X., Qi, Y., Song, H., Liu, Y., Yu, H., Zhang, X., Jing, Q., Yan, C., & Han, Y. (2023). The CREG1-FBXO27-LAMP2 axis alleviates diabetic cardiomyopathy by promoting autophagy in cardiomyocytes. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(9), 2025–2038. <https://doi.org/10.1038/S12276-023-01081-2>
- Liu, J., & Debnath, J. (2016). The Evolving, Multifaceted Roles of Autophagy in Cancer. *Advances in Cancer Research*, 130, 1–53. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2016.01.005>
- Liu, S., Jiang, T., Xiao, L., Yang, S., Liu, Q., Gao, Y., Chen, G., & Xiao, W. (2021). Total Neoadjuvant Therapy (TNT) versus Standard Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Oncologist*, 26(9), e1555–e1566. <https://doi.org/10.1002/ONCO.13824>

- Liu, Y., Wei, C. H., Li, C., Chen, W. Z., Zhu, Y., & Xu, R. S. (2022). Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4 participates in the occurrence and development of amyotrophic lateral sclerosis by regulating autophagy. *Neural Regeneration Research*, 17(7), 1609–1616. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.330621>
- Lőrincz, P., & Juhász, G. (2020). Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Molecular Biology*, 432(8), 2462–2482. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.10.028>
- Ma, Y., Galluzzi, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2013). Autophagy and cellular immune responses. *Immunity*, 39(2), 211–227. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2013.07.017>
- Ma, Z., Chen, M., Liu, X. L., & Cui, H. (2024). Identification and verification of a prognostic autophagy-related gene signature in hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports*, 14(1), 3032. <https://doi.org/10.1038/S41598-024-53565-4>
- Mahjoubi, F., Shabani, S., Khakbazzpour, S., & Khaligh Akhlaghi, A. (2022). Novel EPG5 Mutation Associated with Vici Syndrome Gene. *Case Reports in Genetics*, 2022, 1–3. <https://doi.org/10.1155/2022/5452944>
- Manuel Sánchez-Maldonado, J., Martínez-Bueno, M., Canhão, H., ter Horst, R., Muñoz-Peña, S., Moñiz-Díez, A., Rodríguez-Ramos, A., Escudero, A., Sorensen, S. B., Hetland, M. L., Ferrer, M. A., Glintborg, B., Filipescu, I., Pérez-Pampin, E., Conesa-Zamora, P., García, A., den Broeder, A., De Vita, S., Hove Jacobsen, S. E., ... Sainz, J. (2020). NFKB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to TNF inhibitors: Results from the REPAIR consortium. *Scientific Reports*, 10(1), 4316. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-61331-5>
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E., & Yoldi, M. J. R. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 197. <https://doi.org/10.3390/IJMS18010197>
- Martino, J. J., Wall, B. A., Mastrantoni, E., Wilimczyk, B. J., La Cava, S. N., Degenhardt, K., White, E., & Chen, S. (2013). Metabotropic glutamate receptor 1 (Grm1) is an oncogene in epithelial cells. *Oncogene*, 32(37), 4366–4376. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.471>

- Matsuzawa-Ishimoto, Y., Hwang, S., & Cadwell, K. (2018). Autophagy and Inflammation. *Annual Review of Immunology*, 36, 73–101. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-042617-053253>
- Mayes, M. D., Bossini-Castillo, L., Gorlova, O., Martin, J. E., Zhou, X., Chen, W. V., Assassi, S., Ying, J., Tan, F. K., Arnett, F. C., Reveille, J. D., Guerra, S., Teruel, M., Carmona, F. D., Gregersen, P. K., Lee, A. T., López-Isac, E., Ochoa, E., Carreira, P., ... Martin, J. (2014). Immunochip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. *American Journal of Human Genetics*, 94(1), 47–61. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2013.12.002>
- McLoed, A. G., Sherrill, T. P., Cheng, D. S., Han, W., Saxon, J. A., Gleaves, L. A., Wu, P., Polosukhin, V. V., Karin, M., Yull, F. E., Stathopoulos, G. T., Georgoulas, V., Zaynagetdinov, R., & Blackwell, T. S. (2016). Neutrophil-Derived IL-1 $\beta$  Impairs the Efficacy of NF- $\kappa$ B Inhibitors against Lung Cancer. *Cell Reports*, 16(1), 120–132. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.05.085/ATTACHMENT/881BAEDC-7F66-4C6E-A808-94F4CFCB4325/MMC2.PDF>
- Mehto, S., Jena, K. K., Nath, P., Chauhan, S., Kolapalli, S. P., Das, S. K., Sahoo, P. K., Jain, A., Taylor, G. A., & Chauhan, S. (2019). The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy. *Molecular Cell*, 73(3), 429-445.e7. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2018.11.018>
- Milana, F., Famularo, S., Luberto, A., Rimassa, L., Scorsetti, M., Comito, T., Pressiani, T., Franzese, C., Poretti, D., Di Tommaso, L., Personeni, N., Rodari, M., Pedicini, V., Donadon, M., & Torzilli, G. (2022). Multidisciplinary Tumor Board in the Management of Patients with Colorectal Liver Metastases: A Single-Center Review of 847 Patients. *Cancers*, 14(16). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14163952>
- Moore, J. S., & Aulet, T. H. (2017). Colorectal Cancer Screening. *The Surgical Clinics of North America*, 97(3), 487–502. <https://doi.org/10.1016/J.SUC.2017.01.001>
- Moreno-Smith, M., Lutgendorf, S. K., & Sood, A. K. (2010). Impact of Stress on Cancer Metastasis. *Future Oncology*, 6(12), 1863–1881. <https://doi.org/10.2217/FON.10.142>

- Morris, V. K., Kennedy, E. B., Baxter, N. N., Benson, A. B., Cercek, A., Cho, M., Ciombor, K. K., Cremolini, C., Davis, A., Deming, D. A., Fakih, M. G., Gholami, S., Hong, T. S., Jaiyesimi, I., Klute, K., Lieu, C., Sanoff, H., Strickler, J. H., White, S., ... Eng, C. (2023). Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: ASCO Guideline. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 41(3), 678–700. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.01690>
- Muleris, M., Chalastanis, A., Meyer, N., Lee, M., Dutrillaux, B., Sastre-Garau, X., Hamelin, R., Fléjou, J. F., & Duval, A. (2008). Chromosomal instability in near-diploid colorectal cancer: a link between numbers and structure. *PloS One*, 3(2), e1632. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0001632>
- Nasseri, Y., & Langenfeld, S. J. (2017). Imaging for Colorectal Cancer. *Surgical Clinics of North America*, 97(3), 503–513. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2017.01.002>
- Nazio, F., & Cecconi, F. (2017). Autophagy up and down by outsmarting the incredible ULK. *Autophagy*, 13(5), 967–968. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1285473>
- Neary, P. M., Schwartzberg, D. M., Cengiz, T. B., Kalady, M. F., & Church, J. M. (2018). Aspects of the natural history of sessile serrated adenomas/polyps: Risk indicators for carcinogenesis in the colorectal mucosa? *Diseases of the Colon and Rectum*, 61(12), 1380–1385. <https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000001208>
- Ngabire, D., & Kim, G. Do. (2017). Autophagy and Inflammatory Response in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS18092016>
- Nicoli, E., Dumitrescu, T., Uscatu, C., ... F. P.-R. J. M., & 2014, U. (2014). Determination of autophagy gene ATG16L1 polymorphism in human colorectal cancer. *J Morphol Embryol*, 55(1), 57–62. <https://rjme.ro/RJME/resources/files/550114057062.pdf>
- Orrù, V., Steri, M., Sole, G., Sidore, C., Viridis, F., Dei, M., Lai, S., Zoledziewska, M., Busonero, F., Mulas, A., Floris, M., Mentzen, W. I., Urru, S. A. M., Olla, S., Marongiu, M., Piras, M. G., Lobina, M., Maschio, A., Pitzalis, M., ... Cucca, F. (2013). Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease. *Cell*, 155(1), 242. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.08.041>

- Ortega, M. A., Fraile-Martinez, O., de Leon-Oliva, D., Boaru, D. L., Lopez-Gonzalez, L., García-Montero, C., Alvarez-Mon, M. A., Guijarro, L. G., Torres-Carranza, D., Saez, M. A., Diaz-Pedrero, R., Albillos, A., & Alvarez-Mon, M. (2024). Autophagy in Its (Proper) Context: Molecular Basis, Biological Relevance, Pharmacological Modulation, and Lifestyle Medicine. *International Journal of Biological Sciences*, 20(7), 2532–2554. <https://doi.org/10.7150/IJBS.95122>
- Paik, J.-H., Ryu, C.-G., & Hwang, D.-Y. (2023). Risk factors of recurrence in TNM stage I colorectal cancer. *Annals of Surgical Treatment and Research*, 104(5), 281–287. <https://doi.org/10.4174/ast.2023.104.5.281>
- Park, J. M., Huang, S., Wu, T. T., Foster, N. R., & Sinicrope, F. A. (2013). Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy. *Cancer Biology & Therapy*, 14(2), 100–107. <https://doi.org/10.4161/CBT.22954>
- Park, J. M., Tougeron, D., Huang, S., Okamoto, K., & Sinicrope, F. A. (2014). Beclin 1 and UVRAG confer protection from radiation-induced DNA damage and maintain centrosome stability in colorectal cancer cells. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100819>
- Patel, S. G., Karlitz, J. J., Yen, T., Lieu, C. H., & Boland, C. R. (2022). The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 7(3), 262–274. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00426-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00426-X)
- Patel, S., Hurez, V., Nawrocki, S. T., Goros, M., Michalek, J., Sarantopoulos, J., Curiel, T., & Mahalingam, D. (2016). Vorinostat and hydroxychloroquine improve immunity and inhibit autophagy in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(37), 59087. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.10824>
- Pedroso, J. L., Vale, T. C., Freitas, J. L. de, Araújo, F. M. M., Meira, A. T., Neto, P. B., França, M. C., Tumas, V., Teive, H. A. G., & Barsottini, O. G. P. (2023). Movement disorders in hereditary spastic paraplegias. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 81(11), 1000–1007. <https://doi.org/10.1055/S-0043-1777005>

- Peters, U., Jiao, S., Schumacher, F. R., Hutter, C. M., Aragaki, A. K., Baron, J. A., Berndt, S. I., Bézieau, S., Brenner, H., Butterbach, K., Caan, B. J., Campbell, P. T., Carlson, C. S., Casey, G., Chan, A. T., Chang-Claude, J., Chanock, S. J., Chen, L. S., Coetzee, G. A., ... Hsu, L. (2013). Identification of Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Tumors in a Genome-Wide Meta-analysis. *Gastroenterology*, 144(4).  
<https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2012.12.020>
- Petrelli, F., Tomasello, G., Borgonovo, K., Ghidini, M., Turati, L., Dallera, P., Passalacqua, R., Sgroi, G., & Barni, S. (2017). Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncology*, 3(2), 211–219. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2016.4227>
- Pfau, P. R., & Chak, A. (2002). Endoscopic ultrasonography. *Endoscopy*, 34(1), 21–28.  
<https://doi.org/10.1055/S-2002-19394>
- Pickhardt, P. J., & Kim, D. H. (2007). CT colonography (virtual colonoscopy): a practical approach for population screening. *Radiologic Clinics of North America*, 45(2), 361–375. <https://doi.org/10.1016/J.RCL.2007.03.011>
- Pillay, B., Wootten, A. C., Crowe, H., Corcoran, N., Tran, B., Bowden, P., Crowe, J., & Costello, A. J. (2016). The impact of multidisciplinary team meetings on patient assessment, management and outcomes in oncology settings: A systematic review of the literature. *Cancer Treatment Reviews*, 42, 56–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.11.007>
- Prager, G. W., Taieb, J., Fakih, M., Ciardiello, F., Van Cutsem, E., Elez, E., Cruz, F. M., Wyrwicz, L., Stroyakovskiy, D., Pápai, Z., Poureau, P.-G., Liposits, G., Cremolini, C., Bondarenko, I., Modest, D. P., Benhadji, K. A., Amellal, N., Leger, C., Vidot, L., & Tabernero, J. (2023). Trifluridine-Tipiracil and Bevacizumab in Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 388(18), 1657–1667.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMOA2214963>
- Prerna, K., & Dubey, V. K. (2022). Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding. *International Journal of Biological Macromolecules*, 204, 258–273. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.02.005>

- Qin, L., Heng, Y., Deng, S., Gu, J., Mao, F., Xue, Y., Jiang, Z., Wang, J., Cheng, D., Wu, K., Cao, Y., & Cai, K. (2023). Perineural invasion affects prognosis of patients undergoing colorectal cancer surgery: a propensity score matching analysis. *BMC Cancer*, 23(1), 452. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-10936-w>
- Qiu, J., Sun, M., Wang, Y., & Chen, B. (2020). Identification and validation of an individualized autophagy-clinical prognostic index in gastric cancer patients. *Cancer Cell International*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12935-020-01267-Y/FIGURES/6>
- Rahman, F. A., Baechler, B. L., & Quadrilatero, J. (2024). Key considerations for investigating and interpreting autophagy in skeletal muscle. *Autophagy*, 1(15), 1–12. <https://doi.org/10.1080/15548627.2024.2373676>
- Ren, Q., Sun, Q., & Fu, J. (2024). Dysfunction of autophagy in high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Autophagy*, 20(2), 221–241. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2254191>
- Rex, D. K., Shaikat, A., & Wallace, M. B. (2019). Optimal Management of Malignant Polyps, From Endoscopic Assessment and Resection to Decisions About Surgery. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(8), 1428–1437. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.040>
- Rizzi, M., Tschan, M. P., Britschgi, C., Britschgi, A., Hügli, B., Grob, T. J., Leupin, N., Mueller, B. U., Simon, H.-U., Ziemiecki, A., Torbett, B. E., Fey, M. F., & Tobler, A. (2007). The death-associated protein kinase 2 is up-regulated during normal myeloid differentiation and enhances neutrophil maturation in myeloid leukemic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(6), 1599–1608. <https://doi.org/10.1189/JLB.0606400>
- Rodríguez-Fraile, M., Cózar-Santiago, M. P., Sabaté-Llobera, A., Caresia-Aríztegui, A. P., Delgado Bolton, R. C., Orcajo-Rincon, J., de Arcocha-Torres, M., García-Velloso, M. J., & García-Talavera, P. (2020). FDG PET/CT in colorectal cancer. *Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular*, 39(1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/J.REMN.2019.09.009>
- Russell, R. C., & Guan, K. (2022). The multifaceted role of autophagy in cancer. *The EMBO Journal*, 41(13). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021110031>

- Safaroghli-Azar, A., Sanaei, M. J., Pourbagheri-Sigaroodi, A., & Bashash, D. (2023). Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) classes: From cell signaling to endocytic recycling and autophagy. *European Journal of Pharmacology*, 953. <https://doi.org/10.1016/J.EJPBAR.2023.175827>
- Sahin, I. H., Lin, Y., Yothers, G., Lucas, P. C., Deming, D., George, thomas J., Kopetz, S., Lieu, christopher H., & Dasari, A. (2022). Minimal Residual Disease-Directed Adjuvant Therapy for Patients With Early-Stage Colon Cancer: CIRCULATE-US. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 36(10), 604–606. <https://doi.org/10.46883/2022.25920976>
- Sainz, J., García-Verdejo, F. J., Martínez-bueno, M., Kumar, A., Sánchez-maldonado, J. M., Díez-villanueva, A., Vodičková, L., Vymetálková, V., Sánchez, V. M., Da Silva Filho, M. I., Sampaio-marques, B., Brezina, S., Butterbach, K., Horst, R. Ter, Hoffmeister, M., Ludovico, P., Jurado, M., Li, Y., Sánchez-rovira, P., ... Försti, A. (2021). Polymorphisms within Autophagy-Related Genes Influence the Risk of Developing Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Four Large Cohorts. *Cancers*, 13(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers13061258>
- Saitoh, T., & Akira, S. (2016). Regulation of inflammasomes by autophagy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(1), 28–36. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2016.05.009/ASSET/EAF93F3A-FC35-4F80-9BB2-D701FFCEEFD5/MAIN.ASSETS/GR10.JPG>
- Schaaf, M. B. E., Keulers, T. G., Vooijs, M. A., & Rouschop, K. M. A. (2016). LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(12), 3961–3978. <https://doi.org/10.1096/FJ.201600698R>
- Schmit, S. L., Edlund, C. K., Schumacher, F. R., Gong, J., Harrison, T. A., Huyghe, J. R., Qu, C., Melas, M., Van Den Berg, D. J., Wang, H., Tring, S., Plummer, S. J., Albanes, D., Alonso, M. H., Amos, C. I., Anton, K., Aragaki, A. K., Arndt, V., Barry, E. L., ... Gruber, S. B. (2019). Novel Common Genetic Susceptibility Loci for Colorectal

- Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 111(2), 146–157.  
<https://doi.org/10.1093/JNCI/DJY099>
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., Marian, B., Török, L., Kahl-Rainer, P., & Ellinger, A. (1997). Concepts of cell death and application to carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 25(1), 89–93. <https://doi.org/10.1177/019262339702500117>
- Schumacher, F. R., Schmit, S. L., Jiao, S., Edlund, C. K., Wang, H., Zhang, B., Hsu, L., Huang, S. C., Fischer, C. P., Harju, J. F., Idos, G. E., Lejbkiewicz, F., Manion, F. J., McDonnell, K., McNeil, C. E., Melas, M., Rennert, H. S., Shi, W., Thomas, D. C., ... Peters, U. (2015). Genome-wide association study of colorectal cancer identifies six new susceptibility loci. *Nature Communications* 2015 6:1, 6(1), 1–7.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms8138>
- Shi, M., An, G., Chen, N., Jia, J., Cui, X., Zhan, T., & Ji, D. (2023). UVRAG Promotes Tumor Progression through Regulating SP1 in Colorectal Cancer. *Cancers*, 15(9).  
<https://doi.org/10.3390/CANCERS15092502>
- Shimabukuro-Vornhagen, A., Schlößer, H. A., Gryschock, L., Malcher, J., Wennhold, K., Garcia-Marquez, M., Herbold, T., Neuhaus, L. S., Becker, H. J., Fiedler, A., Scherwitz, P., Koslowsky, T., Hake, R., Stippel, D. L., Hölscher, A. H., Eidt, S., Hallek, M., Theurich, S., & von Bergwelt-Baildon, M. S. (2014). Characterization of tumor-associated B-cell subsets in patients with colorectal cancer. *Oncotarget*, 5(13), 4651–4664. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.1701>
- Shin, S. S., Jeong, Y. Y., Min, J. J., Kim, H. R., Chung, T. W., & Kang, H. K. (2008a). Preoperative staging of colorectal cancer: CT vs. integrated FDG PET/CT. *Abdominal Imaging*, 33(3), 270–277. <https://doi.org/10.1007/s00261-007-9262-9>
- Shin, S. S., Jeong, Y. Y., Min, J. J., Kim, H. R., Chung, T. W., & Kang, H. K. (2008b). Preoperative staging of colorectal cancer: CT vs. integrated FDG PET/CT. *Abdominal Imaging*, 33(3), 270–277. <https://doi.org/10.1007/s00261-007-9262-9>
- Shivji, S., Conner, J. R., Barresi, V., & Kirsch, R. (2020). Poorly differentiated clusters in colorectal cancer: a current review and implications for future practice. *Histopathology*, 77(3), 351–368. <https://doi.org/10.1111/his.14128>

- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21763>
- Simunovic, M., Smith, A. J., & Heald, R. J. (2009). Rectal cancer surgery and regional lymph nodes. *Journal of Surgical Oncology*, 99(4), 256–259. <https://doi.org/10.1002/JSO.21217>
- Smith, L., & Schapira, A. H. V. (2022). GBA Variants and Parkinson Disease: Mechanisms and Treatments. *Cells*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/CELLS11081261>
- Smits, D. J., Dekker, J., Schot, R., Tabarki, B., Alhashem, A., Demmers, J. A. A., Dekkers, D. H. W., Romito, A., van der Spek, P. J., van Ham, T. J., Bertoli-Avella, A. M., & Mancini, G. M. S. (2023). CLEC16A interacts with retromer and TRIM27, and its loss impairs endosomal trafficking and neurodevelopment. *Human Genetics*, 142(3), 379–397. <https://doi.org/10.1007/S00439-022-02511-3>
- Sninsky, J. A., Shore, B. M., Lupu, G. V., & Crockett, S. D. (2022). Risk Factors for Colorectal Polyps and Cancer. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 32(2), 195–213. <https://doi.org/10.1016/J.GIEC.2021.12.008>
- Soleimanpour, S. A., Gupta, A., Bakay, M., Ferrari, A. M., Groff, D. N., Fadista, J., Spruce, L. A., Kushner, J. A., Groop, L., Seeholzer, S. H., Kaufman, B. A., Hakonarson, H., & Stoffers, D. A. (2014). The diabetes susceptibility gene Clec16a regulates mitophagy. *Cell*, 157(7), 1577–1590. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.05.016>
- Song, Y., Quach, C., & Liang, C. (2020). UVRAG in autophagy, inflammation, and cancer. *Autophagy*, 16(2), 387–388. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1709768>
- Spalinger, M. R., Sayoc-Becerra, A., Santos, A. N., Shawki, A., Canale, V., Krishnan, M., Niechcial, A., Obialo, N., Scharl, M., Li, J., Nair, M. G., & McCole, D. F. (2020). PTPN2 Regulates Interactions Between Macrophages and Intestinal Epithelial Cells to Promote Intestinal Barrier Function. *Gastroenterology*, 159(5), 1763-1777.e14. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2020.07.004>
- Staib, L., Schirrmeister, H., Reske, S. N., & Beger, H. G. (2000). Is 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in recurrent colorectal cancer a

- contribution to surgical decision making? *American Journal of Surgery*, 180(1), 1–5.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(00\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(00)00406-2)
- Stiewe, T., Stanelle, J., Theseling, C. C., Pollmeier, B., Beitzinger, M., & Pützer, B. M. (2003). Inactivation of retinoblastoma (RB) tumor suppressor by oncogenic isoforms of the p53 family member p73. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14230–14236. <https://doi.org/10.1074/JBC.M300357200>
- Stiewe, T., Theseling, C. C., & Pützer, B. M. (2002). Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 14177–14185.  
<https://doi.org/10.1074/JBC.M200480200>
- Strickler, J. H., Cercek, A., Siena, S., André, T., Ng, K., Van Cutsem, E., Wu, C., Paulson, A. S., Hubbard, J. M., Coveler, A. L., Fountzilas, C., Kardosh, A., Kasi, P. M., Lenz, H. J., Ciombor, K. K., Elez, E., Bajor, D. L., Cremolini, C., Sanchez, F., ... Shao, S. (2023). Tucatinib plus trastuzumab for chemotherapy-refractory, HER2-positive, RAS wild-type unresectable or metastatic colorectal cancer (MOUNTAINEER): a multicentre, open-label, phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, 24(5), 496–508.  
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(23\)00150-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(23)00150-X)
- Sun, S. Y., Hu, X. T., Yu, X. F., Zhang, Y. Y., Liu, X. H., Liu, Y. H., Wu, S. H., Li, Y. Y., Cui, S. X., & Qu, X. J. (2021). Nuclear translocation of ATG5 induces DNA mismatch repair deficiency (MMR-D)/microsatellite instability (MSI) via interacting with Mis18 $\alpha$  in colorectal cancer. *British Journal of Pharmacology*, 178(11), 2351–2369. <https://doi.org/10.1111/BPH.15422>
- Tam, S. Y., & Wu, V. W. C. (2019). A Review on the Special Radiotherapy Techniques of Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9(2), 208.  
<https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00208>
- Tamargo-Gómez, I., Fernández, Á. F., & Mariño, G. (2020). Pathogenic Single Nucleotide Polymorphisms on Autophagy-Related Genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–42. <https://doi.org/10.3390/IJMS21218196>
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 445(1), 77–88. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4)

- Taylor, J. G., Choi, E. H., Foster, C. B., & Chanock, S. J. (2001). Using genetic variation to study human disease. *Trends in Molecular Medicine*, 7(11), 507–512.  
[https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02183-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02183-9)
- Tian, X., Teng, J., & Chen, J. (2021). New insights regarding SNARE proteins in autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 17(10), 2680–2688.  
<https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1823124>
- Turco, E., Fracchiolla, D., & Martens, S. (2020). Recruitment and Activation of the ULK1/Atg1 Kinase Complex in Selective Autophagy. *Journal of Molecular Biology*, 432(1), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.027>
- van der Paardt, M. P., & Stoker, J. (2018). Current Status of Magnetic Resonance Colonography for Screening and Diagnosis of Colorectal Cancer. *Radiologic Clinics of North America*, 56(5), 737–749. <https://doi.org/10.1016/J.RCL.2018.04.007>
- van der Valk, M. J. M., Hilling, D. E., Bastiaannet, E., Meershoek-Klein Kranenbarg, E., Beets, G. L., Figueiredo, N. L., Habr-Gama, A., Perez, R. O., Renehan, A. G., van de Velde, C. J. H., Ahlberg, M., Appelt, A., Asoglu, O., Bär, M. T., Barroca, R., Beets-Tan, R. G. H., Belgers, E. H. J., Bosker, R. J. I., Breukink, S. O., ... Zimmerman, D. D. E. (2018). Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWWD): an international multicentre registry study. *Lancet (London, England)*, 391(10139), 2537–2545. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31078-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31078-X)
- van Vliet, A. R., Chiduza, G. N., Maslen, S. L., Pye, V. E., Joshi, D., De Tito, S., Jefferies, H. B. J., Christodoulou, E., Roustán, C., Punch, E., Hervás, J. H., O'Reilly, N., Skehel, J. M., Cherepanov, P., & Tooze, S. A. (2022). ATG9A and ATG2A form a heteromeric complex essential for autophagosome formation. *Molecular Cell*, 82(22), 4324–4339.e8. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2022.10.017>
- van Wyk, H. C., Going, J., Horgan, P., & McMillan, D. C. (2017). The role of perineural invasion in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: A systematic review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 112(4), 11–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.02.005>

- Vasen, H. F. A., Tomlinson, I., & Castells, A. (2015). Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 12(2), 88–97. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.229>
- Vendrely, V., Rivin Del Campo, E., Modesto, A., Jolnerowski, M., Meillan, N., Chiavassa, S., Serre, A. A., Gérard, J. P., Créhanges, G., Huguet, F., Lemanski, C., & Peiffert, D. (2022). Rectal cancer radiotherapy. *Cancer Radiotherapie : Journal de La Societe Francaise de Radiotherapie Oncologique*, 26(1–2), 272–278. <https://doi.org/10.1016/J.CANRAD.2021.11.002>
- Villanova, L., Barbini, C., Piccolo, C., Boe, A., De Maria, R., & Fiori, M. E. (2020). Molecular Sciences miR-1285-3p Controls Colorectal Cancer Proliferation and Escape from Apoptosis through DAPK2. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2423), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21072423>
- Vleugels, J. L. A., Van Lanschot, M. C. J., & Dekker, E. (2016a). Colorectal cancer screening by colonoscopy: putting it into perspective. *Digestive Endoscopy : Official Journal of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society*, 28(3), 250–259. <https://doi.org/10.1111/DEN.12533>
- Vleugels, J. L. A., Van Lanschot, M. C. J., & Dekker, E. (2016b). Colorectal cancer screening by colonoscopy: putting it into perspective. *Digestive Endoscopy : Official Journal of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society*, 28(3), 250–259. <https://doi.org/10.1111/DEN.12533>
- Vogel, J. D., Felder, S. I., Bhama, A. R., Hawkins, A. T., Langenfeld, S. J., Shaffer, V. O., Thorsen, A. J., Weiser, M. R., Chang, G. J., Lightner, A. L., Feingold, D. L., & Paquette, I. M. (2022). The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Management of Colon Cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, 65(2), 148–177. <https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000002323>
- Wang, F., Trosdal, E. S., Paddar, M. A., Duque, T. L. A., Allers, L., Mudd, M., Akepati, P. R., Javed, R., Jia, J., Salemi, M., Phinney, B., & Deretic, V. (2024). The role of ATG5 beyond Atg8ylation and autophagy. *Autophagy*, 20(2), 448–450. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2273703>

- Wang, J., Davis, S., Zhu, M., Miller, E. A., & Ferro-Novick, S. (2017). Autophagosome formation: Where the secretory and autophagy pathways meet. *Autophagy*, *13*(5), 973–974. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1287657>
- Wang, L., Qi, J., Yu, J., Chen, H., Zou, Z., Lin, X., & Guo, L. (2017). Overexpression of Rictor protein in colorectal cancer is correlated with tumor progression and prognosis. *Oncology Letters*, *14*(5), 6198. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.6936>
- Wang, L., Wang, Y., Lu, Y., Zhang, Q., & Qu, X. (2015a). Heterozygous deletion of ATG5 in Apc(Min/+) mice promotes intestinal adenoma growth and enhances the antitumor efficacy of interferon-gamma. *Cancer Biology & Therapy*, *16*(3), 383–391. <https://doi.org/10.1080/15384047.2014.1002331>
- Wang, L., Wang, Y., Lu, Y., Zhang, Q., & Qu, X. (2015b). Heterozygous deletion of ATG5 in ApcMin/+ mice promotes intestinal adenoma growth and enhances the antitumor efficacy of interferon-gamma. *Cancer Biology & Therapy*, *16*(3), 383–391. <https://doi.org/10.1080/15384047.2014.1002331>
- Wang, M., Jing, J., Li, H., Liu, J., Yuan, Y., & Sun, L. (2021). The expression characteristics and prognostic roles of autophagy-related genes in gastric cancer. *PeerJ*, *9*. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.10814>
- Wang, Y., Li, X., Huang, T., Wang, D., He, Y., Wei, M., Chen, Y., Zheng, M., Shi, Y., & Zhang, J. (2023). The efficacy and safety of anti-EGFR target agents in patients with potentially resectable metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *World Journal of Surgical Oncology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/S12957-023-03222-3>
- Wang, Z., Xiong, S., Wu, Z., Wang, X., Gong, Y., Zhu, W. G., & Xu, X. (2024). VCP/p97 UFMylation stabilizes BECN1 and facilitates the initiation of autophagy. *Autophagy*, *20*(9). <https://doi.org/10.1080/15548627.2024.2356488>
- Weigl, K., Chang-Claude, J., Knebel, P., Hsu, L., Hoffmeister, M., & Brenner, H. (2018). Strongly enhanced colorectal cancer risk stratification by combining family history and genetic risk score. *Clinical Epidemiology*, *10*(1), 143–152. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S145636>

- Xiang, H., Zhang, J., Lin, C., Zhang, L., Liu, B., & Ouyang, L. (2020). Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 10(4), 569–581.  
<https://doi.org/10.1016/J.APSB.2019.10.003>
- Xu, B., Yu, L., Zhao, L. Z., & Ma, D. W. (2016). Prognostic factors in the patients with T2N0M0 colorectal cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1), 76.  
<https://doi.org/10.1186/S12957-016-0826-4>
- Xu, Z., Zhu, C., Chen, C., Zong, Y., Feng, H., Liu, D., Feng, W., Zhao, J., & Lu, A. (2018). CCL19 suppresses angiogenesis through promoting miR-206 and inhibiting Met/ERK/Elk-1/HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A pathway in colorectal cancer. *Cell Death & Disease* 2018 9:10, 9(10), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1010-2>
- Yamamoto, H., & Matsui, T. (2024). Molecular Mechanisms of Macroautophagy, Microautophagy, and Chaperone-Mediated Autophagy. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 91(1), 2–9.  
[https://doi.org/10.1272/JNMS.JNMS.2024\\_91-102](https://doi.org/10.1272/JNMS.JNMS.2024_91-102)
- Yang, H. Z., Ma, Y., Zhou, Y., Xu, L. M., Chen, X. J., Ding, W. Bin, & Zou, H. B. (2015). Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment. *Cancer Letters*, 361(1), 128–136.  
<https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2015.02.045>
- Yang, S. Y., Cho, M. S., & Kim, N. K. (2018a). Difference between right-sided and left-sided colorectal cancers: from embryology to molecular subtype. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 18(4), 351–358. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1442217>
- Yang, S. Y., Cho, M. S., & Kim, N. K. (2018b). Difference between right-sided and left-sided colorectal cancers: from embryology to molecular subtype. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 18(4), 351–358. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1442217>
- Ye, L., Zhang, T., Kang, Z., Guo, G., Sun, Y., Lin, K., Huang, Q., Shi, X., Ni, Z., Ding, N., Zhao, K. N., Chang, W., Wang, J., Lin, F., & Xue, X. (2019). Tumor-Infiltrating Immune Cells Act as a Marker for Prognosis in Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*, 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02368>

- Ye, X., Zhou, X. J., & Zhang, H. (2018). Exploring the Role of Autophagy-Related Gene 5 (ATG5) Yields Important Insights Into Autophagy in Autoimmune/Autoinflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT).  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02334>
- Yoon, M. K., Ha, J. H., Lee, M. S., & Chi, S. W. (2015). Structure and apoptotic function of p73. *BMB Reports*, 48(2), 81–90. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2015.48.2.255>
- Yu, L. J., Wall, B. A., Wangari-Talbot, J., & Chen, S. (2017). Metabotropic glutamate receptors in cancer. *Neuropharmacology*, 115, 193–202.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.02.011>
- Yuan, W., Ji, J., Shu, Y., Chen, J., Liu, S., Wu, L., Zhou, Z., Liu, Z., Tang, Q., Zhang, X., & Shu, X. (2019). Downregulation of DAPK1 promotes the stemness of cancer stem cells and EMT process by activating ZEB1 in colorectal cancer. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 97(1), 89–102. <https://doi.org/10.1007/S00109-018-1716-8>
- Yun, C. W., & Lee, S. H. (2018). The roles of autophagy in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113466>
- Zachari, M., & Ganley, I. G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays in Biochemistry*, 61(6), 585–596.  
<https://doi.org/10.1042/EBC20170021>
- Zaika, A. I., Slade, N., Erster, S. H., Sansome, C., Joseph, T. W., Pearl, M., Chalas, E., & Moll, U. M. (2002). DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(6), 765–780. <https://doi.org/10.1084/JEM.20020179>
- Zawacka-Pankau, J., Kostecka, A., Sznarkowska, A., Hedström, E., & Kawiak, A. (2010). p73 tumor suppressor protein: A close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach? *Cell Cycle*, 9(4), 720–728. <https://doi.org/10.4161/cc.9.4.10668>
- Zeinali-Rafsanjani, B., jalli, R., Saeedi-Moghadam, M., & Pishdad, P. (2020). Magnetic resonance spectroscopy and its application in colorectal cancer diagnosis and

- screening: A narrative review. *Journal of Medical Imaging and Radiation Sciences*, 51(4), 654–661. <https://doi.org/10.1016/J.JMIR.2020.07.004>
- Zeng, C., Matsuda, K., Jia, W. H., Chang, J., Kweon, S. S., Xiang, Y. B., Shin, A., Jee, S. H., Kim, D. H., Zhang, B., Cai, Q., Guo, X., Long, J., Wang, N., Courtney, R., Pan, Z. Z., Wu, C., Takahashi, A., Shin, M. H., ... Thomas, D. C. (2016). Identification of Susceptibility Loci and Genes for Colorectal Cancer Risk. *Gastroenterology*, 150(7), 1633–1645. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2016.02.076>
- Zhang, C., Yuan, X. R., Li, H. Y., Zhao, Z. J., Liao, Y. W., Wang, X. Y., Su, J., Sang, S. S., & Liu, Q. (2015). Anti-cancer effect of metabotropic glutamate receptor 1 inhibition in human glioma U87 Cells: Involvement of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(2), 419–432. <https://doi.org/10.1159/000369707>
- Zhang, J., Liu, L., Sun, Y., Xiang, J., Zhou, D., Wang, L., Xu, H., Yang, X., Du, N., Zhang, M., Yan, Q., & Xi, X. (2016). MicroRNA-520g promotes epithelial ovarian cancer progression and chemoresistance via DAPK2 repression. *Oncotarget*, 7(18), 26516. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.8530>
- Zhang, J., Sun, W., Yan, W., Kong, X., Shen, T., Laubach, K., Chen, M., & Chen, X. (2023). TP73 Isoform-specific disruption reveals a critical role of TAp73beta in growth suppression and inflammatory response. *Cell Death and Disease*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05529-7>
- Zhang, X., Zhang, Y., He, Z., Yin, K., Li, B., Zhang, L., & Xu, Z. (2019). Chronic stress promotes gastric cancer progression and metastasis: an essential role for ADRB2. *Cell Death & Disease* 2019 10:11, 10(11), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2030-2>
- Zhao, H., Ming, T., Tang, S., Ren, S., Yang, H., Liu, M., Tao, Q., & Xu, H. (2022). Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Molecular Cancer*, 21(1), 144. <https://doi.org/10.1186/S12943-022-01616-7>
- Zhao, J., Quan, J., Chen, W., & Xie, X. (2023). Grid2 interacting protein is a potential biomarker related to immune infiltration in colorectal cancer. *European Journal of Medical Research*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/S40001-023-01468-X>

- Zhong, J., Liu, Y., Fu, Q., Huang, D., Gong, W., & Zou, J. (2024). Cost-Effectiveness Analysis of Regorafenib versus Other Third-Line Treatments for Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Management and Research*, 16, 593–602.  
<https://doi.org/10.2147/CMAR.S464831>
- Zhou, J., Ji, Q., & Li, Q. (2021). Resistance to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer: underlying mechanisms and reversal strategies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 40(1). <https://doi.org/10.1186/S13046-021-02130-2>
- Zhu, F., Zhu, Q., Ye, D., Zhang, Q., Yang, Y., Guo, X., Liu, Z., Jiapaer, Z., Wan, X., Wang, G., Chen, W., Zhu, S., Jiang, C., Shi, W., & Kang, J. (2018). Sin3a-Tet1 interaction activates gene transcription and is required for embryonic stem cell pluripotency. *Nucleic Acids Research*, 46(12), 6026–6040.  
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKY347>



***MATERIAL  
SUPLEMENTARIO***

Tabla S1: Características basales de la población DACHS

| Características                              | CCR<br>(n=4485) | Controles<br>(n=3513) | P                      |
|----------------------------------------------|-----------------|-----------------------|------------------------|
| Sexo, n (%)                                  |                 |                       |                        |
| Mujer                                        | 1768 (39.4%)    | 1355 (38.6%)          | --                     |
| Hombre                                       | 2717 (60.6%)    | 2158 (61.4%)          |                        |
| Edad, n (%)                                  |                 |                       |                        |
| 30-49                                        | 222 (04.9%)     | 146 (04.2%)           | --                     |
| 50-59                                        | 688 (15.3%)     | 524 (14.9%)           |                        |
| 60-69                                        | 1346 (30.0%)    | 1092 (31.1%)          |                        |
| 70-79                                        | 1529 (34.1%)    | 1175 (33.4%)          |                        |
| ≥80                                          | 700 (15.6%)     | 576 (16.4%)           |                        |
| Periodo de reclutamiento, n (%)              |                 |                       |                        |
| 2003-2008                                    | 2156 (48.1%)    | 1764 (50.2%)          | 0,06                   |
| 2009-2016                                    | 2329 (51.9%)    | 1749 (49.8%)          |                        |
| Educación, n (%)                             |                 |                       |                        |
| ≤9 years                                     | 2962 (66.0%)    | 1997 (56.8%)          | $3.92 \times 10^{-7}$  |
| 10-11 years                                  | 778 (17.3%)     | 719 (20.5%)           |                        |
| >11 years                                    | 735 (16.4%)     | 790 (22.5%)           |                        |
| Historia familiar de CCR, n (%)              |                 |                       |                        |
| Sí                                           | 647 (14.4%)     | 378 (10.8%)           | $1.33 \times 10^{-6}$  |
| Fumador, n (%)                               |                 |                       |                        |
| Nunca                                        | 1800 (40.1%)    | 1531 (43.6%)          | $5.47 \times 10^{-6}$  |
| Ex-fumador                                   | 1965 (43.8%)    | 1547 (44.0%)          |                        |
| Actual                                       | 705 (15.7%)     | 424 (12.1%)           |                        |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> , n %)                |                 |                       |                        |
| <25                                          | 1683 (37.5%)    | 1174 (33.4%)          | $1.31 \times 10^{-4}$  |
| 25-29.9                                      | 1902 (42.4%)    | 1644 (46.8%)          |                        |
| ≥30                                          | 872 (19.4%)     | 694 (19.8%)           |                        |
| Uso AINEs, n (%)                             |                 |                       |                        |
| Sí                                           | 1248 (27.8%)    | 1330 (37.9%)          | $3.35 \times 10^{-21}$ |
| Uso THS, n (%)                               |                 |                       |                        |
| Sí                                           | 518 (11.5%)     | 605 (17.2%)           | $6.55 \times 10^{-13}$ |
| Participación en programas de cribado, n (%) |                 |                       |                        |
| Sí                                           | 3774 (84.1%)    | 3207 (91.3%)          | $3.60 \times 10^{-22}$ |
| Localización tumoral, n (%)                  |                 |                       |                        |
| Colon                                        | 2732 (60.9%)    | -                     |                        |
| Rectosigma                                   | 242 (05.4%)     | -                     |                        |
| Recto                                        | 1511 (33.7%)    | -                     |                        |
| Estadio, n (%)                               |                 |                       |                        |
| I                                            | 1030 (23.0%)    | -                     |                        |
| II                                           | 1334 (29.7%)    | -                     |                        |
| III                                          | 1425 (31.8%)    | -                     |                        |
| IV                                           | 650 (14.5%)     | -                     |                        |

**Abreviaciones:** IMC, índice de masa corporal; CCR, cáncer colorrectal; THS, terapia de reemplazo hormonal; AINE, fármaco antiinflamatorio no esteroideo.

Faltan valores para los siguientes ítems: educación (n=17, 0.2%), antecedentes familiares de CCR (n=7, 0.1%), tabaquismo (n=26, 0.3%), IMC (n=29, 0.4%), AINE (n=98, 1.2%), THS (n=11, 0.1%), chequeo médico (n=37, 0.5%) y estadio del tumor (n=46, 1.0%).

a Los valores de p no se informan para el sexo y la edad, ya que estos fueron factores de emparejamiento.

b Antecedentes de CCR entre familiares de primer grado.

c El IMC se calculó a partir de la altura y el peso reportado 5-14 años antes del reclutamiento.

d Uso regular de aspirina o AINE (al menos dos veces por semana durante al menos 1 año).

e Los participantes se clasificaron en tres grupos (bajo, medio o alto PRS) según los terciles del PRS entre los controles.

Tabla S2: Características de la población CCRGen

| Características                                 | CCR<br>(n=948) | Controles<br>(n=1076) |
|-------------------------------------------------|----------------|-----------------------|
| <i>Sexo, n (%)</i>                              |                |                       |
| Mujer                                           | 337 (35.55)    | 527 (48.98)           |
| Hombre                                          | 611 (64.45)    | 549 (51.02)           |
| <i>Edad, n (%)</i>                              |                |                       |
| 20-29                                           | 3 (00.31)      | 3 (00.28)             |
| 30-39                                           | 7 (00.74)      | 17 (01.58)            |
| 40-49                                           | 53 (05.59)     | 86 (07.99)            |
| 50-59                                           | 150 (15.82)    | 240 (22.30)           |
| 60-69                                           | 286 (30.17)    | 382 (35.50)           |
| 70-79                                           | 320 (33.76)    | 265 (24.63)           |
| ≥80                                             | 124 (13.08)    | 83 (07.71)            |
| Desconocido                                     | 5 (00.53)      | -                     |
| <i>Fumador, n (%)</i>                           |                |                       |
| Nunca                                           | 414 (43.67)    | 553 (51.39)           |
| Exfumador                                       | 387 (40.82)    | 335 (31.13)           |
| Actual                                          | 119 (12.55)    | 180 (16.73)           |
| Desconocido                                     | 28 (02.95)     | 8 (00.74)             |
| <i>IMC (kg/m<sup>2</sup>, n %) <sup>a</sup></i> |                |                       |
| <25                                             | 364 (38.40)    | 376 (34.94)           |
| 25-29.9                                         | 381 (40.19)    | 431 (40.06)           |
| ≥30                                             | 148 (15.61)    | 209 (19.42)           |
| Desconocido                                     | 55 (05.80)     | 60 (05.58)            |
| <i>Uso de AINE, n (%) <sup>b</sup></i>          |                |                       |
| Si                                              | 136 (14.78)    | 294 (27.53)           |
| <i>Uso de THS, n (%) <sup>c</sup></i>           |                |                       |
| Si                                              | 10 (02.97)     | 28 (05.39)            |
| <i>PRS, n (%) <sup>d</sup></i>                  |                |                       |
| Bajo                                            | 211 (22.25)    | -                     |
| Medio                                           | 324 (34.18)    | -                     |
| Alto                                            | 413 (43.57)    | -                     |
| <i>Localización, n (%)</i>                      |                |                       |
| Proximal                                        | 254 (26.79)    | -                     |
| Distal                                          | 681 (71.84)    | -                     |
| Desconocido                                     | 13 (01.37)     | -                     |

**Abreviaciones:** IMC, índice de masa corporal; CCR, cáncer colorrectal; TRH, terapia de reemplazo hormonal; AINE, fármaco antiinflamatorio no esteroideo; PRS, puntuación de riesgo poligénico.

<sup>a</sup> El IMC se calculó a partir de la altura y el peso reportado de 5 a 14 años antes del reclutamiento.

<sup>b</sup> Uso regular de aspirina o AINE (al menos dos veces por semana durante al menos 1 año). Este parámetro estaba disponible en 920 casos de CCR y 1068 controles.

<sup>c</sup> Los datos sobre THS estaban disponibles en 337 casos de CCR y 520 controles sanos.

<sup>d</sup> Los participantes se clasificaron en tres grupos (bajo, medio o alto PRS) según los terciles del PRS entre los controles.

**Tabla S3: Características de los pacientes de la población CRC Jaén**

| Características                     | Casos CCR (N=212)  |
|-------------------------------------|--------------------|
| Edad (años)                         | 61.65 ± 11.07      |
| Ratio sexo (hombre/mujer)           | 1.75 (135/77)      |
| Media tiempo de seguimiento (meses) | 44.91 (24-61.5)    |
| Vivo                                | 55.13 (29-70.5)    |
| Éxito                               | 30.52 (15.5 -41.5) |
| Estado en el seguimiento            |                    |
| Vivo                                | 124 (58.49)        |
| Éxito                               | 88 (41.51)         |
| Estadio                             |                    |
| I                                   | 3 (1.42)           |
| IIA                                 | 22 (10.38)         |
| IIB                                 | 20 (9.43)          |
| IIIA                                | 28 (13.21)         |
| IIIB                                | 28 (13.21)         |
| IIIC                                | 23 (10.85)         |
| IV*                                 | 4 (1.89)           |
| IVA                                 | 45 (21.23)         |
| IVB                                 | 16 (7.55)          |
| IVC                                 | 23 (10.85)         |

**Abreviaciones:** CCR, cáncer colorrectal; SG, supervivencia global.

\* Casos de pacientes con CCR estadio IV no definido

**Figura S1: Informe favorable para la realización del estudio por parte del Comité de Ética de la Investigación Provincial de Jaén**



3.2.Mayo23.CEI

### COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN PROVINCIAL DE JAÉN

**D<sup>a</sup>. Ana Laura Ortega Granados, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación Provincial de Jaén,**

#### CERTIFICA

Que este Comité en su reunión de 25/05/2023, ha evaluado la propuesta para realizar el Estudio de Investigación titulado:

**TITULO DEL ESTUDIO (TD): "Estudio de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia y su relación con el pronóstico de cáncer colorrectal"**

**INVESTIGADOR/ES:** Tutor Asistencial: D. Pedro Sánchez Rovira, Tutor Académico: D. Juan Sainz Pérez, Alumno: D. Francisco José García Verdejo

**PROTOCOLO:** POLICCR / 0894-N-23      Versión y fecha: 1 de 10/05/2023

**HIP Versión y fecha:** 1.0 de 25/02/2020      **CI Versión y fecha:** 7 de 18/05/2021

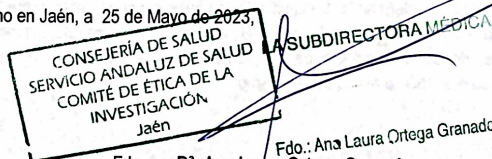
Y considera que,

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del Protocolo y de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado, en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos, aplicables a este tipo de estudios.
- La capacidad del/a Investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.
- Que los aspectos económicos involucrados en el Proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Por ello, el Comité de Ética de la Investigación de Jaén, tras la valoración del citado estudio, **APRUEBA** la realización del mismo, clasificando el estudio con un nivel de riesgo:

**BAJO**, lo que implica que el IP deberá remitir a este comité el informe final del estudio.

Lo que firmo en Jaén, a 25 de Mayo de 2023,



Fdo.: **D<sup>a</sup>. Ana Laura Ortega Granados**  
Secretaria del CEI Provincial de Jaén

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE JAÉN  
Avda. Ejército Español, 10. 23007 – Jaén  
Unidad de Investigación  
Tel. 953 00 85 19  
ul.chj.sspa@juntadeandalucia.es

Figura S2: Gráfico representativo del análisis Western blot de autofagia.

