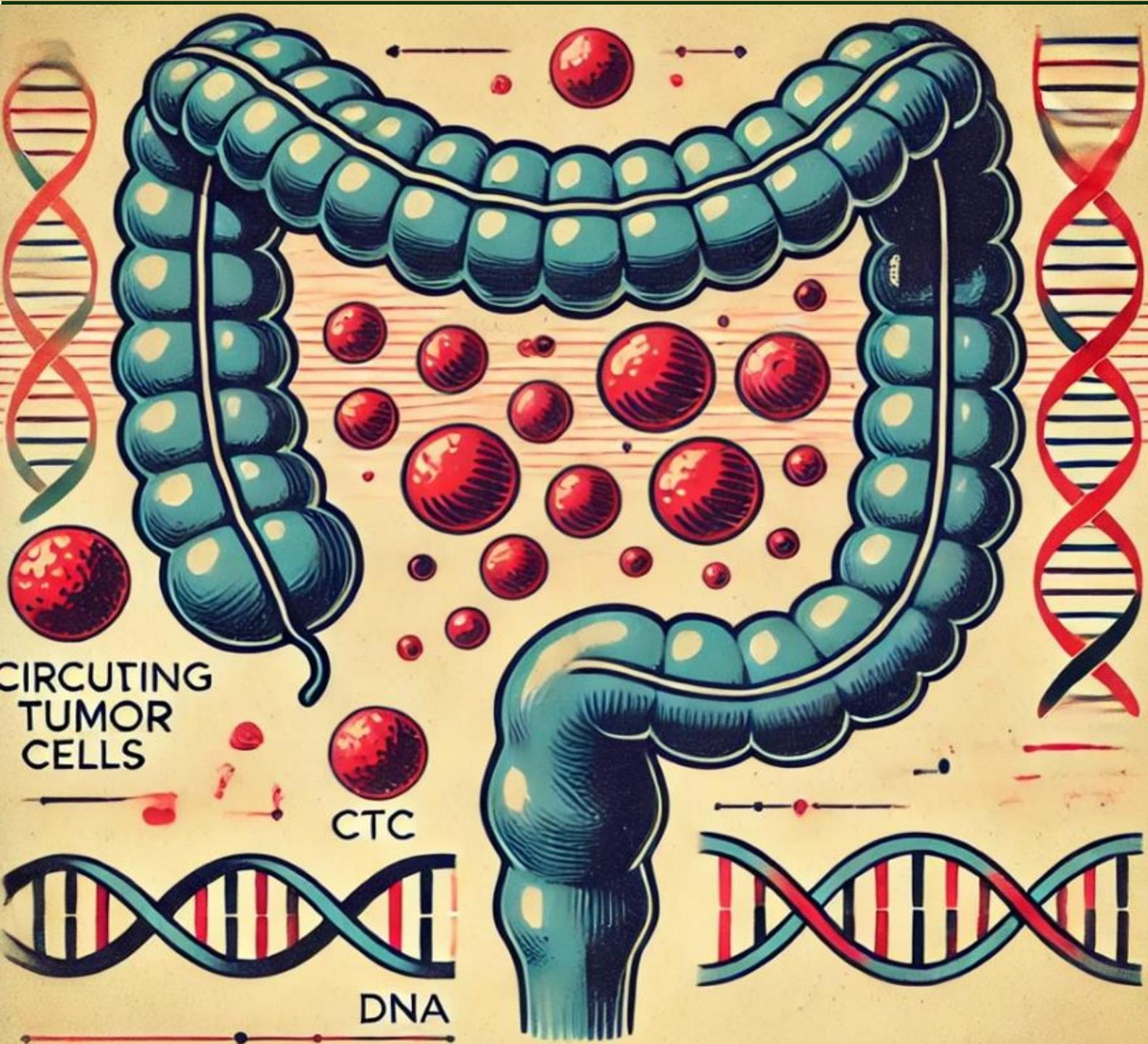


**TESIS DOCTORAL**

**INTERCEPCIÓN DE METÁSTASIS EN CÁNCER DE COLON: EVALUACIÓN  
DEL RIESGO DE RECIDIVA MEDIANTE BIOPSIAS LÍQUIDAS (CTCS Y  
CTDNA) EN ESTADIOS PRECOCES.**

**Doctorando: Antonio José Ruiz Rodríguez**

**Directoras: María José Serrano Fernández / María Cristina González Puga**



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Antonio José Ruiz Rodríguez  
ISBN: 978-84-1195-772-4  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/103580>





## **2. AGRADECIMIENTOS:**

En primer lugar, gracias a todos los pacientes que han ayudado de forma desinteresada en este estudio, sin esperar un beneficio a cambio, en una situación de gran vulnerabilidad, justo antes de quizás la intervención quirúrgica más difícil de su vida. Gracias por contestar amablemente a las preguntas y ofrecerse para que la ciencia pueda avanzar, comprender mejor y mejorar el pronóstico en un futuro de esta terrible enfermedad neoplásica.

A la Dra. María José Serrano, mi tutora y codirectora. Muchas gracias por tu tiempo, que francamente no ha sido poco, dedicación, y por sacar siempre un minuto donde no lo hay con el fin de poder avanzar en este arduo trabajo. Gracias por tus correcciones, tus ganas de innovar y tu visión más investigadora y orientada a las ciencias básicas, complemento fundamental que todo clínico debe de tener para crecer como médico.

A la Dra. Cristina González, mi codirectora. Muchas gracias por tu tiempo y por tu carácter innovador, que ha facilitado la concepción y el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al equipo del grupo de “Biopsia Líquida y Cancer Interception” del centro Genyo de Granada por su trabajo y dedicación a la ciencia, en especial a Pilar Molina, Inés y Carmen Garrido, por ser claves para la coordinación de la recogida de muestras.

Al servicio de Cirugía General y en especial a la unidad de Cirugía Coloproctológica del Hospital Universitario Clínico San Cecilio, por ser los garantes de la obtención de las muestras basales y de seguimiento, de forma totalmente desinteresada, facilitando en todo momento la recogida de muestras.

Al servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Clínico San Cecilio por motivarme, ayudarme en el inicio y el transcurso del proyecto y al servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Reina Sofía por facilitarme poder terminar este proyecto.

Al servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Clínico San Cecilio por su labor en el análisis de las muestras quirúrgicas utilizadas en este proyecto.

Al Dr. Javier Salmerón, catedrático de Aparato Digestivo por pensar en mí para este trabajo y por darme la oportunidad de poder comenzar a investigar en mis primeros años de residente.

A mis compañeros de residencia de Digestivo: Carmelo, María del Mar, Amparo, Joaquín, Begoña, Fernando y Alfredo y a mi compañera de residencia y cirujana Inés Cañas, por su apoyo y ayuda a recoger las muestras necesarias para este estudio.

A todo el equipo de enfermería de Aparato Digestivo y Coloproctología, en especial a Cristina Jiménez, Salvadora Benito y a Mercedes, por ser las principales extractoras de las muestras sanguíneas, facilitando en todo momento el trabajo de campo realizado.

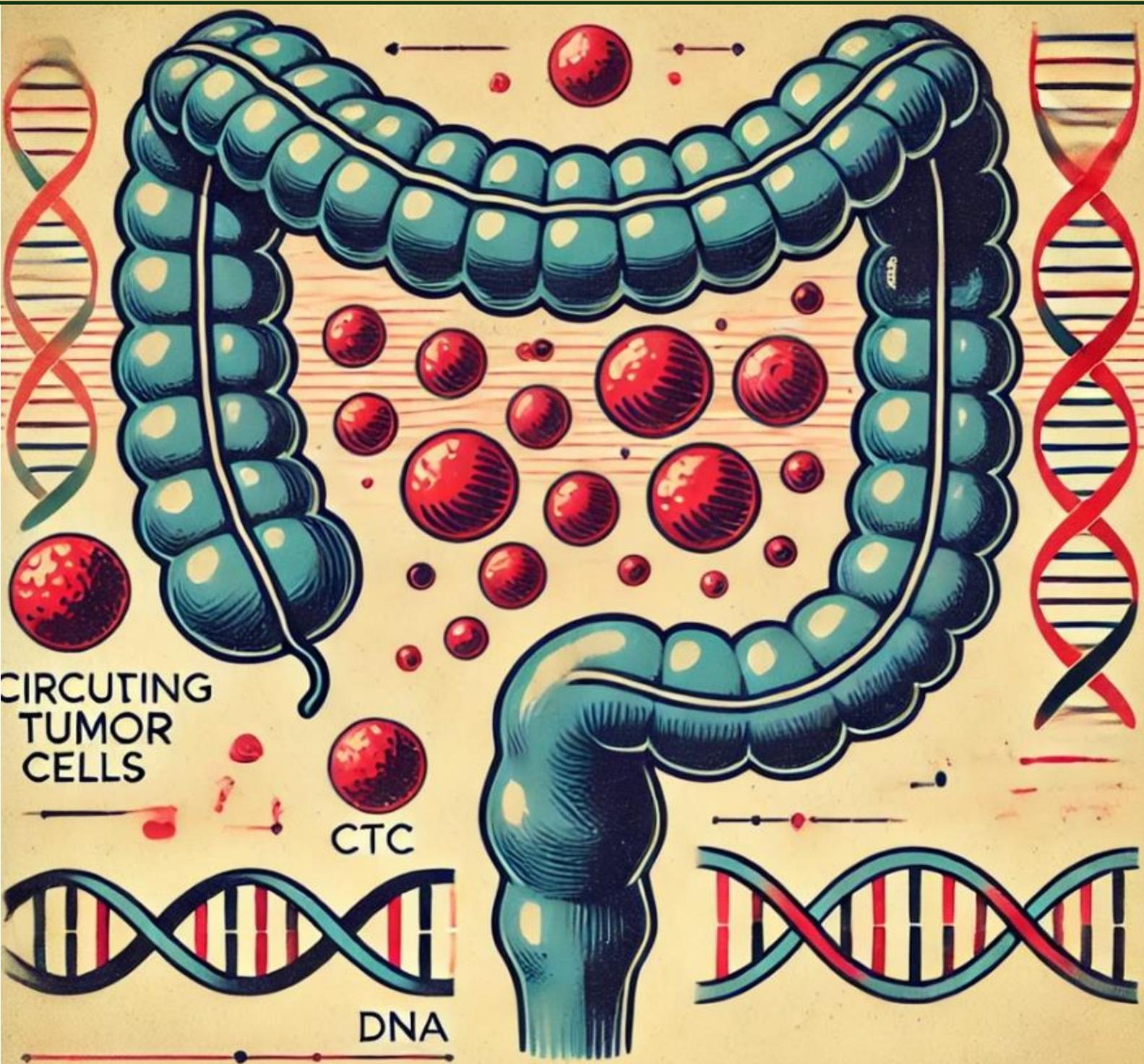
Finalmente, gracias a mi familia, y en especial a mis padres, Juan y Gracia, por su tiempo, apoyo y esfuerzo económico, así como haberme infundido el espíritu de sacrificio y esfuerzo necesario para poder finalizar este proyecto y llegar hasta esta meta. No podía terminar los agradecimientos sin agradecer también a María Ángeles, mi pareja actual, por su tiempo, paciencia, comprensión, conocimiento, ayuda y dedicación en los momentos finales de la elaboración de esta tesis doctoral

**TESIS DOCTORAL**

**INTERCEPCIÓN DE METÁSTASIS EN CÁNCER DE COLON: EVALUACIÓN  
DEL RIESGO DE RECIDIVA MEDIANTE BIOPSIAS LÍQUIDAS (CTCS Y  
CTDNA) EN ESTADIOS PRECOCES.**

**Doctorando: Antonio José Ruiz Rodríguez**

**Directoras: María José Serrano Fernández / María Cristina González Puga**



### **3. ÍNDICE**

1. Portada.
2. Agradecimientos.
3. Índice.
4. Abreviaturas.
5. Resumen.
6. Resumen en inglés (Abstract).
7. Lista de tablas y figuras.
8. Hipótesis.
9. Objetivos.
- A. Introducción.
  - A1. Cáncer colorrectal (CCR).
    - A1.1 Anatomía.
    - A1.2 Epidemiología e historia natural.
    - A1.3 Factores de riesgo.
    - A1.4 Clínica.
    - A1.5 Diagnóstico.
    - A1.6 Cribado poblacional.
    - A1.7 Estadificación clínica.
    - A1.8 Tratamiento.
      - A1.8.1 Estadios localizados.
        - A1.8.1.1 pT1. Adenocarcinoma sobre pólipo.
      - A1.8.2 Estadios localmente avanzados.
      - A1.8.3 Estadios avanzados. Metástasis a distancia.
    - A1.9 Pronóstico actual.
  - A2. Carcinogénesis del CCR.
    - A2.1 Vía tradicional o de inestabilidad de los cromosomas (CIN).
      - A2.1.1 Vía de señalización de WNT/APC/Beta-Catenina.
      - A2.1.2 Vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
        - A2.1.2.1 Vía señalización RAS/RAF/MEK/MAPK (Vía de las MAPs quinasas).
        - A2.1.2.2 Vía señalización PI3K/AKT/mTOR.
      - A2.1.3 Vía de señalización de MET.
      - A2.1.4 Vía del gen supresor TP53.

- A2.1.5 Vía de la activación de la prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (COX-2).
      - A2.1.6 Vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta).
    - A2.2 Vía de la inestabilidad de los microsatélites (MSI).
    - A2.3 Vía serrada.
    - A2.4 Clasificación Molecular del CCR.
  - A3. Biopsia líquida en el cáncer de colon.
    - A3.1 Concepto de biopsia líquida.
    - A3.2 Tipos de biopsia líquida.
      - A3.2.1. Células tumorales circulantes (CTCs).
        - A3.2.1.1 Metodología de aislamiento y caracterización de CTCs.
        - A3.2.2 ADN tumoral circulante (ctADN).
          - A3.2.2.1 Metodología de aislamiento y caracterización del ctADN.
      - A3.3 Presente de la biopsia líquida en la práctica clínica.
      - A3.4 Biopsia líquida y CCR. Nuevas metas. Intercepción del cáncer.
- B. Metodología.
  - B1. Diseño del estudio y criterios de inclusión y exclusión.
  - B2. Origen de las muestras.
  - B3. Análisis realizados
    - B3.1 Determinaciones de Células Tumorales Circulantes (CTCs).
    - B3.2 Determinaciones de ADN circulante tumoral (ctDNA).
  - B4. Extracciones.
  - B5. Desarrollo y validación de protocolo de aislamiento y purificación de CTCs.
    - B5.1 Ensayos de sensibilidad y especificidad para el proceso de aislamiento celular mediante Isoflux TM®.
    - B5.2 Ensayo de sensibilidad y especificidad del protocolo de detección y enumeración mediante citómetro de flujo de imagen multiespectral (ImageStreamX®)
      - B5.2.1 Determinación de la sensibilidad y especificidad del proceso.
      - B5.2.2 Tasa de rendimiento del proceso para la recuperación de CTCs.

B5.3 Ensayos con sangre periférica procedente de pacientes con cáncer de colon en estadio I-III.

B6. Protocolo de aislamiento y análisis de ctDNA.

B6.1 Extracción ADN tumoral circulante.

B6.2 Cuantificación y perfil de integridad del ADN circulante tumoral.

B7. Estudio estadístico.

## C. Resultados.

Parte A. Estudio descriptivo de las variables clínico-patológicas del estudio Fase II.

1. Estudio de las características clínico-patológicas de los pacientes donde se analizaron CTCs y ctDNA (n=28).

2. Estudio de las características clínico-patológicas de los pacientes donde se analizaron ctDNA (n=3).

Parte B. Estudio de las células tumorales circulantes (CTCs).

B.1 Establecimiento del protocolo para aislamiento y caracterización de CTCs mediante la combinación de plataformas Isoflux™ e ImagestreamX® en el estudio Fase I (Ensayo piloto)

B1.1 Estudio y caracterización de CTCs.

B.2 Impacto del análisis de CTCs sobre el resultado clínico del paciente. Estudio analítico de CTCs en muestra previa y postcirugía. Estudio prospectivo o Fase II.

B.2.1 Presencia de Células Tumorales Circulantes y su asociación con las variables clínico-patológicas antes de la cirugía.

B.2.2 Presencia y Persistencia de Células Tumorales Circulantes después de la intervención quirúrgica y su asociación con las variables clínico-patológicas.

B.2.3 Análisis de la presencia de Células tumorales Circulantes y el resultado clínico.

B.2.4 Análisis del perfil fenotípico de Células tumorales Circulantes.

Parte C. Impacto clínico del análisis de la concentración y perfiles de fragmentos del ADN circulante.

C1. Análisis de la concentración de DNA libre circulante.

- C1.1 CfDNA y presencia de enfermedad.
- C1.2 CfDNA y estadio clínico.
- C1.3 CfDNA y variables clínico-patológicas.
- C1.4 CfDNA y tratamiento quimioterápico.

C2. Análisis del perfil fragmentómico.

- C2.1 Análisis de fragmentos del CfDNA y la presencia de enfermedad.
- C2.2 Análisis de fragmentos del CfDNA y estadio.
- C2.3 Análisis de fragmentos del cfDNA y las variables clínico-patológicas.

Parte D. Impacto de la presencia de CTCs sobre la concentración y patrones de fragmentación de ctDNA.

D1. Relación entre CTCs y ctDNA en el estudio realizado.

D. Discusión.

1. Introducción.
2. Eficacia y Limitaciones de las Biopsias Líquidas.
3. Valor Pronóstico de las CTCs y ctDNA.
4. Comparación entre CTCs y ctDNA.
5. Impacto Clínico y Futuras Aplicaciones.
6. Fortalezas del estudio.
7. Limitaciones del estudio.

E. Conclusiones y recomendaciones.

F. Financiación.

G. Referencias.

H. Anexos.

1. Anexo 1. Estadificación TNM AJCC UICC 8º edición.
2. Anexo 2. Grupos pronósticos y estadio clínico.
3. Anexo 3: Hoja de datos analizador de cfDNA: Maxwell® CSC Blood DNA Kit.
4. Anexo 4: Consentimiento informado del estudio

#### **4. ABREVIATURAS**

- I. Genyo: Centro Pfizer-Junta de Andalucía-Universidad de Granada de Genómica e investigación Oncológica.
- II. CCR: cáncer colorrectal.
- III. CIN: Inestabilidad de los cromosomas.
- IV. EGFR: receptor contra el factor de crecimiento epidérmico.
- V. COX2: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2.
- VI. MSI: inestabilidad de los microsatélites.
- VII. CTC: célula tumoral circulante.
- VIII. ctDNA: ADN tumoral circulante.
- IX. BL: Biopsia Líquida.
- X. CC: cáncer de colon.
- XI. CK: citoqueratina.
- XII. cfDNA: ADN libre circulante.
- XIII. IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo I.
- XIV. UBEs: unidades básicas de etanol.
- XV. AF: antecedentes familiares.
- XVI. TC: tomografía computarizada.
- XVII. CEA: antígeno carcinoembrionario.
- XVIII. AJCC: comité americano sobre el cáncer.
- XIX. UICC: unión internacional para el control del cáncer.
- XX. PET-TC: tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada.
- XXI. F18 FDG: 18-F fluorodesoxiglucosa.
- XXII. FOLFOX: ácido folínico, fluorouracilo y oxaliplatino.
- XXIII. FOLFIRI: ácido folínico, fluorouracilo, irinotecán.
- XXIV. XELOX: capacítamina y oxaliplatino.
- XXV. FOLFOXIRI: ácido folínico, fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecán.
- XXVI. NGS: next generation sequencing. Secuenciación de nueva generación.
- XXVII. PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar.
- XXVIII. APC: adenomatous polyposis coli. Poliposis adenomatosa colónica.
- XXIX. CCND1: gen de la ciclina D1.
- XXX. VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.
- XXXI. PTEN: fosfatasa homóloga del tensinógeno.
- XXXII. HGF: factor de crecimiento de hepatocitos.
- XXXIII. TGF-alfa: factor de crecimiento tumoral alfa.

- XXXIV. MMR: DNA mismatch repair. (Sistema de reparación de errores de emparejamiento).
- XXXV. ISLB: International Society of Liquid Biopsy. Sociedad Internacional de Biopsia Líquida.
- XXXVI. EVs: vesículas extracelulares.
- XXXVII. miRNA: microARN.
- XXXVIII. TEP: plaquetas educadas por el tumor.
- XXXIX. CECs: células endoteliales circulantes.
  - XL. EpCAM: molécula de adhesión de células epiteliales.
  - XLI. TMB: Carga de mutación tumoral.
  - XLII. CCD: dispositivo de carga acoplada.
  - XLIII. TDI: modo de integración con retardo en el tiempo.
  - XLIV. FISH: hibridación fluorescente in situ.
  - XLV. pb: pares de bases.
  - XLVI. mtDNA: ADN mitocondrial.
  - XLVII. mPCR: multiplex polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa múltiple.
- XLVIII. SEPT9: septina 9.
- XLIX. TIMP1: Inhibidor de metalopeptidasa 1.
  - L. FBS: suero bobino fetal.
  - LI. DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium. Medio Modificado de Dulbecco.
  - LII. STR: short tandem repeat. Repetición corta en tándem.
  - LIII. PBS: buffer o solución amortiguadora de fosfato salino.
  - LIV. PBMC: célula mononuclear de sangre periférica.
  - LV. 7-AAD: 7-Aminoactinomicina D.
  - LVI. (LB&CI): Liquid Biopsy and Cancer Interception. Grupo de biopsia líquida e intercepción del cáncer.
  - LVII. IC: intervalo de confianza.
  - LVIII. IMC: índice de masa corporal.

## **5. RESUMEN**

**Introducción:** El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tumor más incidente y el segundo de mayor mortalidad en el mundo. El análisis de las células tumorales circulantes (CTCs) y de ADN circulante tumoral (ctDNA), dos de los analitos de la Biopsia Líquida (BL), han emergido como biomarcadores pronósticos y predictivos, en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal. Las técnicas de BL permiten la monitorización en tiempo real de los pacientes, así como la estratificación del riesgo de recidiva y/o metástasis ayudando a la toma de decisiones terapéuticas.

Esta tesis tiene como objetivo general la identificación precoz de las recidivas en cáncer de colon mediante el análisis de células tumorales circulantes (CTCs) y ADN circulante tumoral (ctDNA). Así, los objetivos específicos desarrollados son: 1) la puesta a punto de un protocolo semiautomatizado de aislamiento y multifenotipado de CTCs. 2) Determinar el valor pronóstico de las CTCs para la estratificación del riesgo de recaída. 3) Determinar el valor pronóstico de la concentración y perfil de fragmentos del ctDNA y 4) Correlacionar la presencia y número de CTCs con la concentración de ctDNA.

**Material y métodos:** Se obtuvieron 10 ml de sangre periférica de pacientes con cáncer de colon (CC), excluyendo a aquellos con cáncer de recto. El estudio se estructuró en dos fases:

1. **Fase I:** Incluyó 16 pacientes y se centró en el desarrollo y optimización del protocolo para el aislamiento y caracterización de CTCs.
2. **Fase II:** Incorporó una cohorte de validación de 31 pacientes en los que se analizó tanto las CTCs como el ctDNA, divididos en dos subgrupos:
  - **Cohorte 1:** 5 pacientes con CC en estadio I y 18 pacientes en estadio II.
  - **Cohorte 2:** 8 pacientes con CC en estadio III.

Además, se incluyó una **Cohorte 3** formada por 30 donantes sanos como grupo control. Se realizaron extracciones de sangre en dos momentos clave: una extracción basal, realizada dos horas antes de la cirugía, y otra al mes posterior a la intervención quirúrgica. Los pacientes de la fase II fueron **seguidos durante un período de dos años** para monitorear la aparición de recidivas tumorales. Para el análisis, aislamiento y caracterización fenotípica de las CTCs se empleó una metodología basada en la combinación de dos plataformas semiautomatizadas: **IsofluxTM®**, una plataforma de aislamiento celular mediante tecnología de microfluídica (Fluxion Biosciences), e **ImageStreamX®**, un citómetro de flujo avanzado que permite captar señales de fluorescencia integradas y obtener imágenes de fluorescencia de alta resolución. Este enfoque permitió una caracterización detallada y precisa de las CTCs

Para el análisis de ctDNA, se procesó el ADN libre circulante (cfDNA) del plasma de forma automatizada utilizando la tecnología **Maxwell®**. Una vez aislado, se determinó su concentración y calidad mediante los sistemas **Qubit®** y **Bioanalyzer Agilent 1000®**. Para la caracterización del perfil de fragmentación del ctDNA tumoral, se empleó la plataforma **TapeStation®**. Ambos protocolos fueron desarrollados específicamente para la ejecución de esta tesis doctoral. El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo utilizando el software estadístico **STATA**, versión 16.

**Resultados:** De los 31 pacientes incluidos en la fase II, tres desarrollaron recidiva tumoral en forma de metástasis. De estos, solo uno presentó CTCs en la muestra obtenida después de la cirugía. En uno de los tres casos no fue posible evaluar la dinámica de las CTCs. La concentración de ctDNA fue significativamente mayor en los pacientes con cáncer de colon en comparación con los controles sanos, con un aumento especialmente notable en aquellos en estadio II. Además, se observó que los fragmentos de ctDNA tenían una longitud menor (100-200 pb) en comparación con el cfDNA de los controles. Este patrón fue particularmente pronunciado en las mujeres, quienes presentaron una mayor frecuencia de fragmentos cortos de ctDNA.

Por otro lado, se identificó que la concentración de cfDNA era significativamente más alta en las muestras basales de pacientes que presentaban clústeres de CTCs. Sin embargo, esta diferencia no se mantuvo en las muestras obtenidas durante el seguimiento.

**Discusión:** La integración del análisis de CTCs y ctDNA permite obtener una visión más completa y dinámica de la heterogeneidad tumoral en tiempo real. El estudio del número y las subpoblaciones de CTCs ofrece una evaluación detallada de la heterogeneidad tumoral, permitiendo identificar subclones tumorales predominantes y potencialmente más agresivos. Paralelamente, el perfil fragmentómico del ctDNA proporciona información valiosa para la detección temprana de recidivas tumorales y posibilita el análisis de mutaciones específicas, que pueden servir como dianas terapéuticas en tratamientos personalizados.

**Conclusiones:** Los hallazgos de esta investigación constituyen una base sólida para considerar las biopsias líquidas como herramientas prometedoras en el manejo del cáncer de colon en estadios tempranos. Sin embargo, es fundamental llevar a cabo estudios multicéntricos adicionales para confirmar la utilidad clínica de estas tecnologías. Asimismo, es necesario avanzar en su validación y protocolización para garantizar su aplicación estandarizada en la práctica clínica.

## **6. RESUMEN EN INGLÉS (ABSTRACT)**

**Introduction:** Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy and the second leading cause of cancer-related mortality worldwide. The analysis of circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor DNA (ctDNA), two key components of liquid biopsy (LB), has emerged as a prognostic and predictive biomarker in various cancer types, including colorectal cancer. LB techniques enable real-time patient monitoring and support risk stratification for recurrence and/or metastasis, aiding therapeutic decision-making.

This thesis aims to identify early recurrences in colon cancer through the analysis of circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor DNA (ctDNA). The specific objectives are as follows: 1) To establish a semi-automated protocol for the isolation and multi-phenotyping of CTCs. 2) To determine the prognostic value of CTCs for risk stratification of recurrence. 3) To evaluate the prognostic significance of ctDNA concentration and fragment profile. 4) To correlate the presence and number of CTCs with ctDNA concentration.

**Materials and Methods:** Peripheral blood samples (10 ml) were collected from patients with colon cancer (CC), excluding those with rectal cancer. The study was divided into two phases:

1. **Phase I:** Included 16 patients focused on the development and optimization of the protocol for CTC isolation and characterization.
2. **Phase II:** Incorporated a validation cohort of 31 patients where both CTCs and ctDNA were analyzed. This phase included two subgroups:
  - **Cohort 1:** 5 patients with stage I CC and 18 patients with stage II CC.
  - **Cohort 2:** 8 patients with stage III CC.

Additionally, **Cohort 3** consisted of 30 healthy donors as the control group.

Blood samples were collected at two critical time points: a baseline sample, taken two hours before surgery, and another one month after surgery. Patients in Phase II were followed for two years to monitor for tumor recurrence.

For CTC analysis, isolation, and phenotypic characterization, a methodology combining two semi-automated platforms was used: **IsofluxTM®**, a microfluidics-based cell isolation platform (Fluxion Biosciences), and **ImageStreamX®**, an advanced flow cytometer capable of capturing integrated fluorescence signals and high-resolution fluorescence images. This approach enabled detailed and precise CTC characterization. For ctDNA analysis, circulating free DNA (cfDNA) was processed automatically from plasma using **Maxwell® technology**. Once isolated, concentration and quality were

determined using **Qubit®** and **Bioanalyzer Agilent 1000®** systems. To characterize the fragment profile of tumor ctDNA, the **TapeStation®** platform was employed.

Both protocols were specifically developed for this doctoral thesis. Data analysis was performed using the STATA statistical software, version 16.

**Results:** Of the 31 patients included in Phase II, three experienced tumor recurrence in the form of metastases. Of these, only one presented CTCs in the post-surgery sample. In one of the three cases, it was not possible to evaluate the dynamics of CTCs.

The concentration of ctDNA was significantly higher in colon cancer patients compared to healthy controls, with a particularly notable increase in stage II patients. Furthermore, ctDNA fragments were observed to be shorter (100–200 bp) compared to cfDNA from controls. This pattern was particularly pronounced in women, who exhibited a higher frequency of short ctDNA fragments.

Additionally, the cfDNA concentration was significantly elevated in baseline samples from patients with CTC clusters. However, this difference was not observed in follow-up samples.

**Discussion:** The integration of CTC and ctDNA analysis provides a more comprehensive and dynamic understanding of tumor heterogeneity in real time. Studying the number and subpopulations of CTCs allows for a detailed assessment of tumor heterogeneity, identifying predominant and potentially more aggressive tumor subclones. Simultaneously, the fragmentomic profile of ctDNA offers valuable information for the early detection of tumor recurrence and enables the analysis of specific mutations that may serve as therapeutic targets in personalized treatments.

**Conclusions:** The findings of this research provide a solid foundation for considering liquid biopsies as promising tools in the management of early-stage colon cancer. However, further multicenter studies are essential to confirm the clinical utility of these technologies. Additionally, continued efforts are needed to validate and standardize these methods to ensure their widespread application in clinical practice.

## **7. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS**

1. Tabla 1 A-B-C: Supervivencia CCR. Páginas 42-43.
2. Tabla 2: Clasificación molecular del CCR. Página 52.
3. Figura 1: Tipos de biopsia líquida en sangre. Página 57.
4. Figura 2: Diseminación de CTCs y "escape inmune" en el torrente sanguíneo. Página 58.
5. Figura 3: Métodos de aislamiento de CTCs. Página 61.
6. Figura 4: Caracterización celular de CTCs. Página 63.
7. Figura 5: Papeles potenciales de la biopsia líquida en el "cancer interception". Página 70.
8. Figura 6: Diagrama que resume la extracción de CTCs en las 2 fases del estudio realizado (Fase 1 o ensayo piloto y Fase 2). Página 74.
9. Figura 7: Diagrama que resume la extracción de ctDNA en la fase 2. Página 74.
10. Figura 8: Diagrama del proceso de extracciones sanguíneas. Página 75.
11. Figura 9: Isoflux TM. Página 76.
12. Tabla 3: Anticuerpos utilizados en la caracterización fenotípicas de CTCs con ImageStreamX®. Páginas 77-78.
13. Figura 10: ImageStreamX®. Página 78.
14. Tabla 4: Perfil fenotípico de las líneas celulares utilizadas para la valoración de los anticuerpos utilizados. Página 79.
15. Figura 11: Protocolo de aislamiento y caracterización de CTCs. Página 80.
16. Figura 12: Protocolo de procesamiento de muestras (CTCs) en GENYO. Página 81.
17. Figura 13: Maxwell RSC48 Automated Nucleic Acid Extraction Platform® Página 83.
18. Figura 14: Sistema de cuantificación fluorimétrica Qubit®. Página 84.
19. Figura 15: Sistema automatizado de electroforesis TapeStation® Página 85.
20. Figura 16: Protocolo de aislamiento de ctDNA. Página 85.
21. Tabla 5 y 6: Características clínicas de los pacientes del estudio. Desglosada en páginas 87-98.
22. Figura 17 A y B: Optimización de protocolos. Página 101.
23. Figura 18 A, B, C, D. Recuento y caracterización de células tumorales circulantes (CTC) basadas en la expresión de citoqueratina (CK). Página 101.
24. Tabla 7: Resumen de pacientes con CCR temprano analizados para recuentos de CTC y subpoblaciones de CTC. Página 102.
25. Figura 19. Relación entre pacientes y % fenotípico de CTCs. Página 103.

26. Figura 20: Caracterización de subpoblaciones de CTC de pacientes con CRC en función de la expresión de BRAFV600E y PD-L1. Página 104.
27. Figura 21. Localización nuclear de la expresión de PD-L1 en CTC. Página 105.
28. Figura 22 A, B, C: Evaluación de recuentos de CTC y evolución de subpoblaciones durante el seguimiento de los pacientes. Página 106.
29. Tabla 8a. Distribución de la presencia de CTCs antes y después de la cirugía. Página 108.
30. Tabla 8b: Distribución de la presencia/ausencia de CTCs después de la cirugía. Página 108.
31. Tabla 9: Cambios dinámicos de CTCs y asociación estadística. Páginas 109-110.
32. Tabla 10: Número de CTCs y % por paciente analizado en pacientes previo a la cirugía, distinguiendo entre sexos. Páginas 111-112.
33. Tabla 11. Porcentaje de poblaciones de CTCs en los pacientes con marcadores doblemente positivos y negativos (BRAF-V600/PD-L1) en pacientes antes de la cirugía. "F" = mujer/"M" = hombre. Páginas 113-114.
34. Tabla 12. Porcentaje de CTCs con marcador BRAFV-600 y número de células con marcador PD-L1 en el núcleo en pacientes antes de la cirugía. "F" = mujer/ "M" = hombre. Páginas 115-116.
35. Tabla 13: Número de células CD45 y número de CTCs en clústers en pacientes antes de la cirugía. "F" = mujer/ "M" = hombre. Páginas 117-118.
36. Figura 23: Número de pacientes precirugía con ausencia o presencia de las distintas poblaciones de CTCs. Página 118.
37. Tabla 14: Número de CTCs y % por paciente analizado en pacientes después de la cirugía, distinguiendo entre sexos. Páginas 119-120.
38. Tabla 15. Porcentaje de poblaciones de CTCs en los pacientes con marcadores doblemente positivos y negativos (BRAF-V600/PD-L1) en pacientes después de la cirugía. "F" = mujer/ "M" = hombre. Páginas 121-122.
39. Tabla 16. Porcentaje de CTCs con marcador BRAFV-600 y marcador PD-L1 en el en pacientes después de la cirugía. "F" = mujer/ "M" = hombre. Página 123.
40. Tabla 17: Número de células CD45 y número de CTCs en clústeres en pacientes después de la cirugía. "F" = mujer/ "M" = hombre. Páginas 124-125.
41. Figura 24: Número de pacientes postcirugía con ausencia o presencia de las distintas poblaciones de CTCs. Página 125.
42. Figura 25: Concentración de cfDNA entre controles y pacientes. Página 126.
43. Figura 26 A y B: Concentración de cfDNA por estadios vs controles. Página 127.

44. Figura 27: Concentración de cfDNA entre los pacientes que recibieron quimioterapia. Página 128.
45. Figura 28 A y B: Longitud de los fragmentos de ctDNA en pares de bases (pb) de las muestras de controles vs basal y postcirugía. Página 129.
46. Figura 29: longitud de los fragmentos de ctDNA en pares de bases (pb) de las muestras de controles vs pacientes según su estadio. Página 130.
47. Figura 30: Perfil de fragmentos de cfDNA. La figura identifica el rango de pares de bases que corresponde al cfDNA (100-250pb). Página 130.
48. Figura 31: comparación entre la longitud de cfDNA entre pacientes mujeres y hombres. Página 131.
49. Tabla 18: Anexo 1. Estadificación TNM AJCC UICC 8º edición. Páginas 159-160.
50. Tabla 19: Anexo 2. Grupos pronósticos y estadio clínico. Página 160.
51. Anexo 3: Hoja de datos analizador de cfDNA: Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Páginas 161-162.
52. Anexo 4: Consentimiento informado del estudio. Páginas 163-164.

## **8. HIPÓTESIS**

En etapas tempranas del cáncer de colon, las recidivas pueden ocurrir localmente en el área donde se originó el cáncer (recidiva local), en los ganglios linfáticos cercanos (recidiva ganglionar) o incluso en localizaciones distantes dando lugar a metástasis en el hígado, en los pulmones o en otros tejidos. Estas recidivas pueden presentarse meses o incluso años después del tratamiento inicial.

El seguimiento tras el tratamiento es un elemento crucial para detectar cualquier signo de recidiva. En este contexto, la biopsia líquida (BL) basada en el análisis de células tumorales circulantes (CTCs) y ADN tumoral circulante (ctDNA), pueden constituir herramientas prometedoras para la detección temprana de dichas recidivas en el cáncer de colon temprano. La **posibilidad de identificar precozmente la recurrencia** podría conducir a intervenciones más efectivas y mejores resultados para los pacientes. Basándonos en esta idea se nos plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

**Hipótesis 1:** En relación a la eficacia de los métodos para detectar CTCs esperamos que nuestro protocolo semiautomatizado para la detección y caracterización de CTCs muestre una alta sensibilidad y especificidad en la identificación de estas células en muestras de pacientes con estadios precoces de cáncer de colon.

**Hipótesis 2:** En relación al impacto clínico del análisis de CTCs, se nos plantea la cuestión de si la detección y caracterización de CTCs en estadios tempranos del cáncer de colon proporcionarán información valiosa que contribuirá significativamente a la predicción del curso clínico de la enfermedad, permitiendo una intervención más temprana y efectiva.

**Hipótesis 3:** En relación al análisis de ctDNA nos basamos en la potencial utilidad del análisis de concentración y patrones de fragmentación del ctDNA que podrían revelarse como marcadores específicos asociados con la progresión del cáncer de colon y a la aparición de recidivas, lo que permitirá desarrollar un modelo predictivo para la detección temprana de la recurrencia de la enfermedad.

## **9. OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

Identificar precozmente las recidivas en cáncer de colon mediante el análisis de células tumorales circulantes (CTCs) y ADN circulante tumoral.

### **Objetivos Específicos:**

1. Evaluar la validez técnica de un protocolo semiautomatizado para la detección y multifenotipado de CTCs.
2. Determinar el valor pronóstico de las CTCs para la estratificación del riesgo de recaída.
3. Determinar el valor pronóstico de la concentración y perfil de fragmentos del ctDNA.
4. Correlacionar la presencia y número de CTCs con la concentración de ctDNA.

# A. INTRODUCCIÓN

## A 1. CÁNCER COLORRECTAL (CCR)

### A1.1 Anatomía del colon

El colon mide aproximadamente entre unos 70 y 90 centímetros de longitud y unos 6.5 centímetros de diámetro, siendo mayor en su porción más distal y proximal. Conecta a través de la válvula ileocecal con el intestino delgado. Se distinguen seis segmentos anatómicos, diferenciándose ciego, colon derecho o ascendente, colon transverso, colon izquierdo o descendente, sigma y recto. Además, se aprecian 3 angulaciones fisiológicas localizadas en el ángulo hepático, ángulo esplénico y el sigma.

Su función principal es la **reabsorción de agua y la absorción de electrolitos** como el sodio y el magnesio. También representa una función inmunitaria marcada ya que alberga a la microbiota intestinal, encargada de la digestión de fibra alimentaria y la producción de vitamina K.

Está irrigado por las arterias mesentérica superior que interviene en la vascularización de ciego, colon ascendente y los dos tercios proximales del colon transverso a través de las arterias ileocólica, cólica derecha y cólica media. La arteria mesentérica inferior irriga el otro segmento del colon transverso, colon descendente, sigmoide, recto y parte superior del canal anal. Los otros dos segmentos del recto son irrigados por la arteria rectal media e inferior. El drenaje venoso viene establecido por las venas mesentéricas superior e inferior y las venas hemorroidales superiores, medias e inferiores. Esto último es importante debido a que las **venas hemorroidales media e inferiores drenan en la vena iliaca interna y ésta drena sin paso hepático a la vena cava y al pulmón**, pudiendo producir metástasis directamente en el pulmón sin necesidad de metástasis previamente en el hígado. La inervación del ciego, colon ascendente y transverso depende del nervio vago, mientras que la del colon sigmoide, recto y ampolla rectal son inervados por las raíces sacras (1).

En cuanto a las capas de la pared colónica se distinguen la mucosa, que es la capa más interna y donde se realiza el proceso de absorción; la submucosa que es la capa donde se encuentra la mayoría de los vasos linfáticos y sanguíneos, siendo esto fundamental para la diseminación tumoral; la muscular propia que es la encargada de la peristalsis y la serosa, que es la capa más exterior y la que sirve de armazón y de fijación al resto de estructuras (2).

### **A1.2 Epidemiología e historia natural**

El CCR es una de las mayores causas de neoplasia a nivel mundial, siendo su incidencia y prevalencia elevada.

El **CCR es la tercera causa de cáncer en hombres y mujeres** en Estados Unidos, afectando el 70 % de estos al colon y el 30% al recto. Globalmente es la tercera causa de cáncer en hombres y la segunda en mujeres (3). Es el **tumor más incidente** (39.421 casos en 2022) y el **segundo de mayor mortalidad** (16.608 fallecidos en 2022) **a nivel nacional** tras el cáncer de pulmón. Dicha prevalencia e incidencia, es similar en hombres (2º causa tras c. de pulmón) que en mujeres (2º causa tras c. de mama). Se proyecta que para 2024 será el cáncer más frecuente en la población, con una estimación de 44,294 nuevos casos (29.648 de colon y 14.646 de recto). La incidencia en España se sitúa en 78.3 por cada 100,000 habitantes, con una mortalidad de 32.00 por cada 100.000, cifras muy similares a las de la Unión Europea (incidencia de 73.5 y mortalidad de 32.30 por cada 100.000) (4).

Su mortalidad ha disminuido progresivamente en la última década gracias a los avances diagnóstico-terapéuticos y de detección precoz en estadios precoces, así como a la implementación a nivel nacional de los programas de cribado que implican la realización de polipeptomías profilácticas mediante el uso de colonoscopios, método cada vez más implantado en la práctica clínica en numerosos países y que se desarrollan actualmente dentro de sus planes estratégicos (5). En contraste, la incidencia en menores de 50 años ha aumentado porcentualmente en probable relación con los cambios de alimentación, siendo cada vez mayor la influencia de la cultura y alimentación anglosajona (3). Con respecto a esto, España era típicamente una región de baja prevalencia e incidencia de CCR debido al factor protector de la dieta Mediterránea. También se ha detectado una mayor tasa de diagnósticos de cáncer proximales o que afectan al colon derecho, relacionado con los métodos de cribado y el avance en las técnicas diagnósticas (6).

### **A1.3 Factores de riesgo**

Dentro del CCR, podemos distinguir el CCR esporádico, siendo el más prevalente y el CCR no esporádico o familiar. En apartados posteriores (A.2 Carcinogénesis) lo desarrollaremos más ampliamente. Dicho tipo puede afectar a las estrategias de cribado, sobre todo en lo referente al familiar.

Dentro de los CCR esporádicos, los factores de riesgo más involucrados son:

- **Edad:** La **edad es el factor de riesgo más importante**, siendo infrecuente la afectación por debajo de los 45 años. No obstante, cada vez es más común la incidencia

en edades más tempranas, motivo por el cual se está abogando más frecuentemente por iniciar los métodos de cribado en edades más jóvenes, como recientemente se está implantando en EE. UU., con el inicio del programa de cribado desde los 40 años (7)(8).

- **Raza:** la raza africana está relacionada con una mayor incidencia, así como una afectación a edades más tempranas (9).

- **Género:** los hombres tienen mayor incidencia que las mujeres, mientras que éstas últimas tienen un mayor riesgo de afectación proximal (10).

- **Inmunosupresión:** los pacientes trasplantados y otras enfermedades autoinmunes que necesiten inmunosupresión están relacionados con una mayor incidencia (11).

- **Obesidad:** está relacionada con un aumento moderado de la incidencia (12) así como una menor tasa de diagnóstico precoz debido a la dificultad técnica en la realización de colonoscopia.

- **Diabetes y resistencia insulínica:** esta relación podría estar explicada debido a que la insulina es un factor de crecimiento, siendo el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) uno de los más importantes para las células de la mucosa colónica y pudiendo estar relacionado con la carcinogénesis en esta zona (13). Por otra parte, la resistencia insulínica también podría desempeñar un papel crucial en la mayor tasa de morbimortalidad postoperatoria en estos pacientes.

- **Consumo de carne roja procesada:** el consumo de dicha carne está relacionado con aumento de CCR, particularmente con localización izquierda, **a partir de un consumo estimado de 50 gramos diarios** (14). Dicha afectación podría estar relacionada con la producción de hidrocarburos poliaromáticos en la cocción y su consumo (15).

- **Tabaco:** está relacionada con aumento de incidencia y mortalidad, sobre todo rectal. También es factor de riesgo independiente para la producción de adenomas (16).

- **Alcohol:** se ha demostrado un mayor riesgo en pacientes que consumen más de 4 unidades básicas de etanol (UBEs) diarias (17).

- **Colecistectomía:** está relacionado con aumento de localización derecha debido a alteración de la composición del ácido biliar (18).

- **Enfermedad inflamatoria intestinal:** Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa están relacionadas con un mayor riesgo debido al daño crónico de la mucosa, así como indirectamente por el uso de inmunosupresores como la Azatioprina y la 6-mercaptopurina (19)(20).

- **Antecedentes de pólipos colónicos:** la presencia previa de pólipos > 1 centímetro, histología vellosa o tubulovellosa está relacionado con un mayor riesgo (21).

Otros factores de riesgo menos importantes del CCR esporádico son la radiación abdominal, la acromegalia, el uso de terapia sustitutiva con andrógenos y la fibrosis quística (22).

En relación al CCR familiar, los factores de riesgo más influyentes son:

- **Antecedentes familiares (AF) de CCR esporádico:** puede estar relacionado con la presencia de variantes genéticas no descritas aún en la actualidad. Dicha relación es importante sobre todo **en AF de 1º grado (padre, madre, hermanos o hijos)** (23). Actualmente, según las últimas guías clínicas europeas (ESGE guidelines) se recomienda iniciar el cribado con colonoscopia a partir de los 40 años cuando el paciente tiene dos AF de 1º grado de CCR o 1 AF de 1º grado menor de 50 años (24).
- **AF de poliposis:** está aumentado el riesgo de CCR en AF de poliposis adenomatosa familiar (25), poliposis asociada al gen MUTYH, síndrome de Lynch (26), síndrome de cáncer hereditario de mama y ovario (27), síndrome de Gardner (28) y síndrome de Turcot (29).

#### **A1.4 Clínica**

La mayoría de los pacientes son asintomáticos en estados iniciales, lo que hace que con anterioridad a la era del cribado poblacional los diagnósticos fueran en estadios más avanzados. Los síntomas más frecuentes son:

- **Alteración del hábito intestinal:** afectando al 74% de los pacientes en algunos estudios (30), produciéndose episodios de alternancia de estreñimiento y diarrea.
- **Rectorragia o sangrado hemático** por el recto en el 51 % de los casos (31).
- **Masa abdominal o rectal** que puede afectar al 24.5% de los pacientes (30).
- **Anemia ferropénica:** 9.6% de los pacientes (30).
- **Dolor abdominal** aislado en el 3.8% (30). Muy asociado a complicaciones secundarias como la obstrucción, perforación o carcinomatosis peritoneal (32).
- **Síndrome constitucional:** caracterizado por la pérdida pertinaz de peso.
- **Metástasis en otros órganos:** hasta el 20% pueden debutar de esta forma, produciéndose fundamentalmente a nivel linfático, hepático, pulmonar o peritoneal (32).

#### **A1.5 Diagnóstico**

El **diagnóstico de confirmación** se basa en el **estudio histológico** de la muestra. Generalmente, se puede obtener dicha muestra mediante la toma de biopsias en una colonoscopia. No obstante, a veces debido a complicaciones morfológicas o características del debut clínico (obstrucción) o del paciente que impiden la realización

de la colonoscopia (angulaciones, espasticidad colónica, mala preparación catártica) se obtiene directamente de la pieza quirúrgica.

Como **métodos diagnósticos actuales** encontramos:

- **Rectosigmoidoscopia/colonoscopia:** ambos procedimientos permiten visualizar directamente la mucosa colónica y permiten en un mismo acto la **obtención de muestra histológica mediante biopsias**, la toma de imágenes, la valoración y extirpación en un mismo acto de otras posibles lesiones adenomatosas potencialmente malignas, así como la inyección de tinta para realizar un tatuaje de marcado que facilite la intervención quirúrgica posterior. Siempre que sea posible, se recomienda la realización de una colonoscopia completa con intubación de ciego y con una adecuada preparación catártica, que permita una correcta valoración de la mucosa (33). Si no es posible esto antes de la intervención quirúrgica, se recomienda previo a la intervención un estudio con una técnica de imagen como la colonoscopia virtual y completar estudio con una colonoscopia completa en los próximos 6 meses a la operación.

Estos procedimientos han experimentado una gran mejora técnica en los últimos años debido en gran parte al uso de nuevos colonoscopios de materiales más flexibles, con una mejor visualización de las mucosa, contando actualmente con procesadores 4K y FullHD, el uso de técnica de cromoendoscopia digital y con tinciones, el uso de inteligencia artificial, así como la mejora sustancial de las preparaciones catárticas, con nuevos preparados basados en el ácido ascórbico y el polietilenglicol que permite un efecto de arrastre mayor que anteriores compuestos, consiguiendo una mejor visualización de la mucosa colónica (34).

- **Tomografía computarizada (TC) abdominopélvica:** consiste en la visualización radiológica de una neoformación en una prueba radiológica con o sin contraste yodado. Este método se considera inferior a la colonoscopia, ya que no permite la obtención de muestras, su sensibilidad y especificidad es menor a la colonoscopia y obliga en un segundo tiempo a la realización de una colonoscopia para la obtención de muestras necesarias para el diagnóstico de confirmación (35). Puede ser útil en pacientes frágiles o que debutan con una obstrucción abdominal (36). Esta técnica también permite el diagnóstico incidental de CCR cuando se ha solicitado por otra patología.

- **Colonoscopia virtual o TC colonografía:** método radiodiagnóstico de mayor precisión que el anterior y que con la utilización de un preparado catártico permite la valoración de la mucosa colónica. Es un método válido en **pacientes que no consiguen una buena preparación catártica** e impide la valoración mucosa mediante colonoscopia. Permite visualizar en la mayoría de los casos lesiones colónicas mayores

de 1 centímetro (37). También es posible la realización de esta prueba mediante resonancia magnética.

- **Enema opaco de bario:** técnica en desuso actualmente que consiste en la realización de varias radiografías del colon tras la aplicación de una papilla de bario permitiendo distinguir estenosis y defectos mucosos (38).

- **Cápsula endoscópica:** consiste en una cápsula de pequeño tamaño que se ingiere vía oral y que consta de una minicámara que realiza varios fotogramas por segundo y permite la visualización de la luz intestinal. Esta prueba está encaminada en principio al estudio del intestino delgado, permitiendo analizar la mucosa que es difícilmente valorable con procedimientos endoscópicos. No tiene capacidad de obtener muestras biológicas.

- **Test de sangre oculta en heces:** muy utilizado actualmente gracias a los programas implantados de **cribado poblacional**. Lo desarrollaremos en el siguiente apartado de forma más extensa. Existen varios tipos según el tipo de mecanismo utilizado (químico o inmunológico) y permite la detección en las heces del paciente de hemoglobina humana procedente de las lesiones tumorales o precancerosas (adenomas avanzados). No es una técnica de diagnóstico en sí, su positividad recomienda la realización de un procedimiento endoscópico para visualizar posibles lesiones causantes, ya que la tasa de falsos positivos por patología no tumoral es relativamente elevada (hemorroides, diverticulosis, fisura anal, angiodisplasias).

- **Marcadores tumorales:** En desuso. Dentro de ellos, el más destacado en el colon es el **antígeno carcinoembrionario (CEA)**. Actualmente ha quedado relegado en la práctica clínica al **seguimiento de pacientes intervenidos** como marcador precoz de recidiva ya que como marcador diagnóstico presenta una alta tasa de falsos positivos (fumadores) y negativos (39). Niveles elevados preoperatorios confieren un peor pronóstico (40).

#### **A.1.6 Cribado poblacional**

La implantación de **estrategias de cribado de CCR** en los últimos años ha supuesto una detección precoz de CCR y ha permitido un **diagnóstico** y abordaje multidisciplinar **en estadios menos avanzados**, consiguiendo una mejora en la morbimortalidad del CCR.

Existen numerosas pruebas para realizar dicho cribado, distinguiéndose en métodos que utilizan la detección de hemoglobina en heces, métodos endoscópicos, métodos por técnica de imagen y métodos basados en marcadores sanguíneos.

- **Test basados en el análisis de heces:** Son test fáciles de realizar y no necesitan su realización en centros sanitarios, pudiendo el paciente realizarlos en su domicilio. Sus principales ventajas son que no precisan de preparación catártica, son más baratos y rápidos de realizar. Los principales inconvenientes son los falsos positivos debido a toma de anticoagulantes y antiagregantes y que no permiten diferenciar el tipo de lesiones.

- ❖ **Test inmunológicos:** requieren **una sola toma** de heces y no necesitan limitar la alimentación previa ni el uso de aspirina ni otros antiinflamatorios (41). Permite la detección de **hemoglobina humana**. Otra de las ventajas de estos, es que su resultado es cuantitativo. Tiene según algunos estudios, una sensibilidad del 80% para detectar CCR y una sensibilidad entre el 25-56% y una especificidad entre el 68-96% para la detección de adenomas avanzados (42). Actualmente es la base del cribado del CCR realizado en nuestra comunidad por la Junta de Andalucía.
- ❖ **Test químicos:** se basan en la reacción del guayacol, que identifica la hemoglobina y tras la reacción de la peroxidasa produce un color azulado en el papel reactivo. Tiene una sensibilidad dependiente de la marca de hasta el 80% (Hemoccult SENSA), aunque es menor en términos generales que las pruebas inmunológicas (43). Como desventajas necesita una dieta restrictiva en carne roja, vegetales y una dosis baja de vitamina C durante los 3 días previos (44). Además, se recomienda su realización anualmente y se necesitan 3 tomas en días sucesivos para su valoración aumentando la probabilidad de falsos positivos.
- ❖ **Test de detección de ADN mediante pruebas inmunológicas:** son test que combinan la detección de mutaciones del ADN (K-RAS), técnicas de amplificación de genes para detectar biomarcadores asociados a CCR y un ensayo inmunoquímico que detecta la hemoglobina vertida en las heces (45). Se recomienda realizarlo cada 3 años y no necesita restricciones en dieta ni medicación. Tiene una sensibilidad cercana al 92% y una especificidad del 87% (46), siendo similar a los métodos inmunológicos, pero con un mayor coste.

- **Métodos endoscópicos:** permiten la visualización directa de la lesión, la toma de biopsias de la muestra, el tatuaje de las lesiones para la posterior resección quirúrgica y el tratamiento mediante la extirpación de las lesiones precursoras de CCR, como los adenomas avanzados. Sus principales inconvenientes son la necesidad de una adecuada preparación catártica, siendo fundamental el grado de limpieza y estando directamente relacionado con la tasa de detección de lesiones; las complicaciones relacionadas con la sedación y el riesgo de iatrogenia debido al procedimiento endoscópico, destacando la perforación colónica, el síndrome postpolipectomía y la hemorragia tras polipectomía endoscópica (47). Para la realización de este procedimiento se necesita el uso de un endoscopio flexible con un canal que permite la introducción de distintos instrumentos, así como el uso de una preparación catártica que posibilite la limpieza de la mucosa colónica. También se recomienda la realización de una dieta sin fibra en los días previos y suspender la toma de antiagregación y anticoagulación en el caso de que se prevea una acción terapéutica.

- ❖ **Colonoscopia:** se considera el **gold-standard**, y consiste en la utilización de un endoscopio flexible que se introduce por el canal anal, progresando por los distintos tramos y segmentos colónicos hasta la intubación del ciego y la visualización de la válvula ileocecal y la fosa apendicular. Distintos consensos recomiendan la utilización de **escalas de preparación colónica**, siendo la más validada y usada la “**Escala de Boston**” para valoración de la mucosa colónica, recomendándose la repetición de la prueba si su valor no es óptimo (global menor de 6 o un segmento menor de 2) y un tiempo de retirada desde el ciego hasta el canal anal de un mínimo de 6 minutos para una correcta visualización de la mucosa colónica. Su sensibilidad es mayor que las pruebas basadas en el análisis de heces, siendo ampliamente superior en la detección de adenomas no avanzados, con una sensibilidad del 75 al 93 % (48).

Como método de cribado en pacientes asintomáticos y sin antecedentes familiares de CCR, se recomienda su realización cada 10 años si no se observa patología en la mucosa colónica (49). Dichos intervalos se ajustarán dependiendo de las lesiones visualizadas en anteriores procedimientos.

- ❖ **Sigmoidoscopia:** consiste en la introducción de un endoscopio flexible de 60 cm por el canal anal, pero a diferencia de la colonoscopia, su objetivo es visualizar desde el ano hasta el ángulo esplénico. Como ventaja frente a la

colonoscopia presenta la posibilidad de omitir la sedación en estos pacientes. Tiene las mismas desventajas que la colonoscopia, sumando a esta la imposibilidad de explorar a partir del ángulo esplénico por la limitación de longitud del endoscopio utilizado, presentándose sólo un 41-45 % de los CCR en la región explorada por la sigmoidoscopia (50). Actualmente no se utiliza como método de cribado debido a su baja sensibilidad y a su sustitución por otros métodos endoscópicos.

❖ **Cápsula endoscópica:** se reserva su uso en cribado sólo para paciente con colonoscopias incompletas y en donde se ha descartado lesiones estenosantes, si bien esta indicación no está ampliamente establecida. Tiene una sensibilidad con adenomas mayores de 1 cm del 92 % y una especificidad del 95 % (51). Sus principales desventajas son el riesgo de obstrucción intestinal, el elevado coste, y su objetivo meramente diagnóstico.

- **Métodos radiológicos:** se basan en pruebas de imagen, siendo esencialmente diagnósticos, por lo que ante el hallazgo de lesiones se necesitarán posteriormente métodos endoscópicos que los complementen. Destaca la **colonoscopia virtual o TC colonografía:** consiste en la realización de un TC abdominal con una preparación catártica que permite la reconstrucción en 2 o 3 dimensiones de la mucosa colónica. Se recomienda como método de cribado cada 5 años. Su sensibilidad ronda entre el 67 y el 94% y su especificidad entre el 96 y 98 % (52), siendo un método que valorar en pacientes con colonoscopias incompletas o con importante pluripatología que impida la realización de un procedimiento endoscópico. El uso en estrategias de cribado está muy discutido.

- **Métodos basados en el análisis de sangre:** estos métodos aún no están validados para el cribado actualmente, y no se contemplan actualmente en las guías clínicas, pero podrán formar parte de ella si se confirma su utilidad en estudios futuros. Todos ellos se basan en la detección de posibles marcadores que predisponen al desarrollo de CCR o que estén aumentados con la presencia de CCR.

En la actualidad, desde 2018, en nuestra **comunidad andaluza** existe un **programa de cribado de CCR dirigido a personas comprendidas entre los 50 y 69 años**, asintomáticos, y sin antecedentes familiares ni personales de CCR. Se basa en la realización de una **prueba de sangre oculta en heces inmunológico** y cuantitativo de forma **bienal**, realizándose una invitación por carta, si se confirma la aceptación, se

envía un kit para la determinación de la prueba. Si su resultado es positivo, desembocará en la realización de una colonoscopia. Tras la realización de la colonoscopia, se estratificará al paciente según los hallazgos en grupos de bajo, medio y alto riesgo, enviándole una carta posterior sobre los plazos de seguimiento y el método utilizado para el seguimiento (53).

En el año 2019 la tasa de participación fue del 35.01% y la tasa de aceptación de la colonoscopia del 89.73%. En el año 2022 se llegó a un 95% de cobertura de la población diana, pero la tasa de participación bajó al 20% (4).

### **A1.7 Estadificación clínica**

Una vez establecido el diagnóstico de CCR, es necesario una estadificación del tumor, tanto localmente como a distancia para poder elegir la estrategia terapéutica más adecuada, así como evaluar su pronóstico.

La clasificación más utilizada para estadificar el CCR es la clasificación Tumor, Node, Metastasis (**TNM**) creada por el Comité Americano sobre el cáncer (AJCC) y la unión internacional para el control del cáncer (UICC). La clasificación más reciente es la 8ª edición de 2017 (54) (*Anexo 1*). Dicha clasificación se basa en la utilización de diferentes estadios según la afectación de las distintas capas del colon (T), la afectación de ganglios linfáticos (N) y la presencia o no de metástasis en otros órganos (M).

Otros datos clínico-analíticos que pueden ser importantes para la estadificación y el pronóstico del CCR son los **niveles iniciales de antígeno carcinoembrionario (CEA)**, la invasión perineural o linfovascular en el análisis patológico de la muestra quirúrgica, la presencia de inestabilidad de los microsatélites ya que está relacionada con la respuesta a fluorpiridinas y la mutación de los genes KRAS, NRAS, BRAF que están asociados a una pérdida de respuesta a dianas contra el receptor del factor de crecimiento epidermoide (EGFR).

Por tanto, para una correcta estadificación del CCR se necesitarán una analítica sanguínea que incluya los niveles preoperatorios de CEA, hemograma, bioquímica básica con pruebas de función hepática, coagulación, pruebas de imagen, estudio anatomopatológico de la muestra quirúrgica y en algunas ocasiones pruebas de medicina nuclear (PET-TC o tomografía por emisión de positrones) que permita establecer la afectación a distancia.

- **TC abdominopélvico:** permite la **estadificación de (N) y (M)** y descartar otras complicaciones como obstrucción, perforación o la formación de fístulas. Es la técnica más utilizada en la estadificación inicial junto al TC de tórax. Tiene una sensibilidad elevada, cercana al 90 %, para detectar metástasis a distancia (55) y afectación de los ganglios linfáticos locales (56).

- **TC torácico:** permite el diagnóstico de **metástasis a distancia**, siendo de especial relevancia en los tumores rectales debido a su drenaje venoso por la vena hemorroidal que conecta directamente con la vena cava sin paso hepático, produciéndose en un elevado porcentaje metástasis pulmonares sin afectación hepática previa (57). En determinados estudios (58), se aprecia hasta un 9 % de pacientes con afectación pulmonar por nódulos inespecíficos, siendo un 10 % de estas metástasis.

- **RM hepática:** es más sensible para la afectación hepática, pero se reserva en la práctica clínica para **imágenes indeterminadas en el TC** abdominal (59).

- **RM pélvica:** es la técnica de elección para la estadificación local del **cáncer de recto**, junto a la ecoendoscopia endoanal. Permite localizar la neoformación con respecto a la reflexión peritoneal, teniendo esto unas implicaciones determinantes en el abordaje quirúrgico.

- **Tomografía por emisión de positrones / tomografía computarizada (PET/TC):** es una técnica mixta que combina los beneficios de un TC toracoabdominopélvico con las ventajas de una prueba nuclear como es el PET (60). Permite combinar ambas técnicas, descubriéndose la lesión morfológicamente mediante el TC y observando si dicha lesión es capaz de captar fluorodesoxiglucosa F-18 (FDG), observándose con una tonalidad anaranjada en el mapa morfológico. No se realiza de rutina en la estadificación del CCR, pero puede ser útil en pacientes con elevados niveles de CEA y sospecha clínica de recidiva, cuando mediante otras pruebas de imagen como el TC abdominopélvico o la colonoscopia no se ha observado afectación (61). También puede ser beneficioso en pacientes con CCR y metástasis única en el hígado, ya que permite dilucidar si hay otras captaciones a otros niveles que contraindiquen la resección quirúrgica de dichas lesiones.

- **Ecoendoscopia endoanal:** consiste en la utilización de un endoscopio el cual en su punta tiene alojada una sonda ecográfica. Permite junto a la RM pélvica la estadificación de (T) al poder discernir entre las distintas capas anatómicas del recto.

## **A1.8 Tratamiento**

### **A1.8.1 Estadios localizados**

En primer lugar, debemos de diferenciar el CCR localizado del CCR metastásico, ya que esta cuestión diferenciará el tratamiento utilizado.

El CCR localizado se define como el CCR que sólo afecta a una o a las distintas capas colónicas (mucosa, submucosa, muscular propia, serosa) y/o a los ganglios linfáticos que lo rodean.

Aproximadamente el **80 % de los diagnosticados se encuentran en esa fase**. El objetivo en esta etapa es reseca el tumor, el pedículo vascular que lo nutre y el sistema linfático al que drena. En esta fase el manejo será quirúrgico con apoyo o no quimioterápico con la salvedad de algunos casos, los llamados tumores pT1 (afectan hasta la submucosa colónica).

#### **A1.8.1.1 pT1. Adenocarcinoma sobre pólipo**

Los adenocarcinomas sobre pólipos (pT1) están localizados en la mucosa y/o en la submucosa colónica, y se podría **considerar la resección endoscópica** (mucosectomía o disección submucosa) como **curativa** siempre y cuando presente una resección completa en bloque y los siguientes criterios anatomopatológicos:

- Bien/moderadamente diferenciado.
- Sésiles o planos con infiltración submucosa < 1000 micras.
- Pediculados y nivel de Haggit 0,1,2 o < 3000 micras (3 mm).
- Ausencia de budding o nidos celulares.
- Margen profundo no afecto > 1000 micras.

Cuando se cumplen dichos criterios, se estima **un bajo riesgo de metástasis nodular**, y por tanto se recomienda una vigilancia activa con TC abdominopélvico y colonoscopias de control. En cambio, si no presentan todos los anteriores criterios, la resección endoscópica ha sido incompleta, o presentan criterios de riesgo intermedio o alto se deberá presentar el caso en un comité multidisciplinar para decidir una actitud de vigilancia activa o resección quirúrgica una vez valorado al paciente de forma integral (62):

Criterios de riesgo intermedio:

- Sésiles o planos con infiltración submucosa entre 1001-2000 micras.
- Pediculados nivel de Haggit 3 o infiltración submucosa > 3000 micras.
- Margen profundo no valorable.
- Tamaño del CCR menor de 4000 micras (4 mm).
- Budding de bajo grado.

Criterios de riesgo alto:

- Grado alto, pobremente diferenciado.
- Sésiles o planos con infiltración de > 2000 micras en profundidad.
- Tamaño de la anchura de la infiltración submucosa del carcinoma > 4000 micras.
- Pediculados con nivel de Haggit 4 o > 3000 micras.
- Invasión linfática o vascular.
- Budding de alto grado.
- Margen profundo afecto menor de 1000 micras (1 mm).

### **A1.8.2 Estadios localmente avanzados**

En las lesiones más avanzadas es fundamental un estudio de extensión completo como nos referimos en anteriores epígrafes. En Andalucía, el Proceso Asistencial Integrado del cáncer colorrectal de la Junta de Andalucía (63), actualizado en 2018, nos aporta una guía clínica a la que seguir en nuestra práctica asistencial y en la que nos basaremos a continuación.

En estos estadios la **resección quirúrgica es la opción terapéutica de primera línea**. Se basa en la extirpación del tejido tumoral junto con el pedículo vascular y el circuito linfático al que drena. Se recomienda unos márgenes de seguridad de 5-7 centímetros en el margen distal y para la estadificación ganglionar apropiada se debe **disponer de al menos 12 ganglios linfáticos**. Según el estadio (*Anexo 2*) en el que se encuentre el tumor se aplicará quimioterapia neoadyuvante/ adyuvante o no.

- Estadio I: no precisa quimioterapia. Está indicada la resección quirúrgica con márgenes libres.
- Estadio II: Aunque el beneficio de la **quimioterapia adyuvante** se ha establecido inequívocamente para los pacientes con cáncer de colon en estadio III, su utilidad

para los pacientes con enfermedad en estadio II continúa siendo **debatida**. La cirugía como única terapia puede curar a más del 80% de los pacientes con cáncer de colon en estadio II, y no se ha observado un beneficio claro en la supervivencia general en los ensayos de terapia adyuvante. Por lo tanto, las guías actualmente recomiendan que se considere la **quimioterapia** adyuvante para pacientes con cáncer de colon en estadio II con **características clinicopatológicas de alto riesgo**, que pueden tener más probabilidades de beneficiarse del tratamiento adyuvante. Sin embargo, las definiciones actuales de "alto riesgo" son inadecuadas, ya que muchos pacientes con cáncer con características de alto riesgo no tienen recurrencia de la enfermedad, mientras que algunos con enfermedad que se considera de bajo riesgo sí la tienen. Además, el beneficio en la supervivencia conferido por la quimioterapia adyuvante sigue siendo escaso (<5%) incluso cuando se trata selectivamente a pacientes con enfermedad de alto riesgo, y por lo tanto muchos pacientes están expuestos a una quimioterapia innecesaria. Por tanto, se valorará la indicación de quimioterapia adyuvante tras la resección quirúrgica dependiendo de los factores de alto riesgo:

- T4.
  - Comorbilidad.
  - Presencia de perforación u obstrucción intestinal al diagnóstico.
  - Pobremente diferenciado.
  - Invasión vascular/perineural.
  - Número de ganglios analizados menor de 12.
  - Ausencia de inestabilidad de microsatélites.
- Estadio III: se recomienda adyuvancia con fluoropirimidinas combinadas con oxaliplatino. En pacientes mayores de 70 años y/o comorbilidad importante se valorará el uso de fluoropirimidinas en monoterapia.

En estadios localmente avanzados en los que sea la enfermedad localmente irreseccable se aconseja el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante como objetivo radical o como objetivo de reducción de carga tumoral para una revaloración posterior hacia una cirugía radical.

### A1.8.3 Estadios avanzados. Metástasis a distancia

Para plantear el tratamiento quimioterápico en estadios avanzados es fundamental **obtener una biopsia de tejido tumoral**, ya sea a través del tejido extirpado quirúrgicamente o mediante una biopsia endoscópica. Esto permitirá **crear un perfil biomolecular del tumor**, fundamental para plantear el tratamiento quimioterápico y el pronóstico posterior.

La decisión terapéutica seleccionada dependerá de una serie de factores como:

- Estado general y comorbilidades.
- Número y localización de las metástasis.
- Estado mutacional (K-RAS, N-RAS y BRAF), así como presencia o no de inestabilidad de los microsatélites.
- Localización del tumor primario.
- Tipo de tratamiento sistémico recibido en la adyuvancia.
- Deseo del paciente.

Se considerará la resección quirúrgica de las metástasis hepáticas y pulmonares siempre que sea posible y seguida posteriormente de adyuvancia quimioterápica. Será planteable el uso de radioterapia externa en pacientes con metástasis pulmonares seleccionadas.

En lo referente al **tratamiento oncológico quimioterápico**, es un **campo en continuo desarrollo y avance científico, con modificación constante de los esquemas terapéuticos**. En 1º línea terapéutica, la combinación de FOLFOX (ácido folínico, fluorouracilo y oxaliplatino), FOLFIRI (ácido folínico, fluorouracilo, irinotecán) y XELOX (capacitabina y oxaliplatino) como esquemas quimioterápicos son similares, independientemente del orden de secuencia y superiores al empleo de fluoropirimidinas en monoterapia. La combinación de FOLFOXIRI (ácido folínico, fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecán) asociado a antiangiogénicos como el Bevacizumab o no, puede ser considerado en pacientes con buen estado general y sin comorbilidades.

El tratamiento de 2º línea se elegirá en función del tratamiento utilizado en 1º línea. En estos casos, será muy útil completar los estudios biomoleculares si no se han realizado al diagnóstico en la muestra tumoral. Podemos incluir:

- Mutación K-RAS y NRAS: útiles para plantear tratamiento con quimioterápicos anti-EGFR en CCR metastásicos. Los tumores con mutaciones de los genes **KRAS o NRAS son resistentes a tratamiento con cetuximab o panitumumab**. Esta determinación se recomienda en todos los CCR metastásicos. Estas determinaciones se pueden realizar tanto en el tumor primario como en las metástasis. Se recomienda la realización de los codones 12 y 13 del exón 2, del 59 y 61 del exón 3 y del 117 y 146 del exón 4 antes de iniciar tratamiento con anti-EGFR.
- HER2/NEU: se estudia su sobreexpresión (3% en general). Está indicado en CCR metastásicos y en tumores con KRAS y BRAF nativo refractarios a tratamiento con antiEGFR. Su **sobreexpresión posibilita el tratamiento con agentes anti HER2/neu** como el Trastuzumab y Lapatinib.
- Inestabilidad de los microsatélites/sistema de reparación de errores de emparejamiento: MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6.
- BRAF v600E: es una mutación presente entre el 4-9% de los casos y que aporta una **resistencia contra agentes anti-EGFR** (Cetuximab o Panitumumab). Se recomienda su genotipado en pacientes metastásicos en estadio IV.
- Carga de mutación tumoral: (**TMB, por sus siglas en inglés**): se define como el número de mutaciones somáticas detectadas por megabase de ADN tumoral (nº mutaciones/Mb). El cálculo del TMB se realiza utilizando paneles de *Next Generation Sequencing* (NGS), que analizan el ADN tumoral para identificar mutaciones somáticas en regiones específicas del genoma.

La evidencia científica actual sugiere que los tumores con TMB alto contienen un gran número de neoantígenos tumorales, que pueden ser reconocidos como no propios por el sistema inmune. Esto facilita la activación de las células T, promoviendo una respuesta inmune específica contra las células tumorales.

Este marcador biomolecular, aprobado por la FDA, está indicado en pacientes con alta carga tumoral metastásica irresecable que han progresado tras el tratamiento inicial. Aunque su uso no se recomienda de manera sistemática en la práctica clínica, en pacientes con estas características, el tratamiento con pembrolizumab puede ofrecer ciertos beneficios (64).

En 2º línea de CCR avanzado se debe considerar el uso de quimioterapia en combinación con agentes antiEGFR o con agentes antiangiogénicos (63).

En el tratamiento de 3º línea será importante considerar el “performance status” del paciente, valorando riesgo-beneficio de nuevas terapias y su toxicidad. Como opciones en esta línea podemos distinguir los agentes antiEGFR aislados o en combinación con Irinotecán, Regorafenib o Trifluridina/Tipiracilo.

### **A.1.9 Pronóstico**

Los factores pronósticos **más importantes** del cáncer CCR son su **clasificación según TNM y el estadio al diagnóstico** (65). Podemos distinguir otros factores pronósticos anatomopatológicos/quirúrgicos, clínicos y moleculares:

- Factores anatomopatológicos y quirúrgicos:
  - Extensión local del tumor: la invasión de la serosa está relacionado con un mayor riesgo de extensión peritoneal (66).
  - Tamaño: un tamaño mayor de 4.5 centímetros es un factor predictivo de riesgo independiente para un peor pronóstico (67).
  - Localización: los tumores que afectan a **colon ascendente tienen un peor pronóstico** que los de colon descendente, debido a un debut clínico posterior al ser los del margen derecho más silentes que los izquierdos y a una relación con las alteraciones biomoleculares más frecuentes en estos segmentos (BRAF-KRAS más frecuentemente afectado en los derechos).
  - Integridad de los márgenes tras intervención: una resección circunferencial R0 indica que los márgenes resecaados se encuentran libres histopatológicamente de tumor. En cambio, el R1 indica márgenes microscópicamente afectados y el R2 informa de tejido residual macroscópico no resecaado (68).
  - Margen circunferencial de resección: el margen de resección circunferencial corresponde a la superficie sin peritoneo que se ha resecaado quirúrgicamente. Se utiliza en los segmentos de colon y recto que no están recubiertos o están parcialmente cubiertos por peritoneo. Su relevancia clínica se debe a que si el punto de penetración del tumor está en la cara mesentérica puede condicionar una afectación local y considerarse una resección con márgenes afectados, implicando una mayor tasa de recidiva local. Es un factor pronóstico **clave en el cáncer de recto** (69).
  - Micrometástasis nodales: la presencia de agrupaciones de células tumorales de más de 2 mm en los nódulos linfáticos está relacionada con peor pronóstico (70).

- Depósitos tumorales no ganglionares: los depósitos tumorales no ganglionares en el territorio de drenaje linfático del tumor (grasa pericólico o perirrectal y el mesenterio adyacente) sin identificarse una estructura linfática representan un factor pronóstico adverso. En la 8ª edición de la clasificación TNM (Anexo 2) se **codifica como N1c y se consideran equivalente a las metástasis ganglionares** (71)(72).
- Invasión linfovascular: ambos representan factores pronósticos independientes. Dicha afectación también puede producirse en pólipos colónicos y también representa un factor pronóstico adverso, como en el caso de los pT1 resecados con afectación linfovascular (73).
- Invasión perineural: representa un factor de alto riesgo en el estadio II y puede significar la necesidad de quimioterapia adyuvante tras la resección (74).
- Grado histológico: es un factor independiente, no obstante, es subjetivo y con variabilidad interobservador. Por otra parte, cuando la variante es de células en anillo de sello representa una mayor virulencia y un peor pronóstico (75).
- Budding tumoral o gemación: consiste en la afectación microscópica y la formación de nidos de células tumorales en los márgenes afectados por tejido tumoral. **Representa un paso precoz de la metastatización a otros tejidos.** Se clasifican en 3 escalones: Budding 1: (1-3 nidos celulares), Budding 2: (3-10 nidos); Budding 3: > 10 nidos celulares, representando este un factor de alto riesgo en el estadio II (76).
- Factores clínicos-analíticos:
  - Obstrucción, estenosis o perforación colónica: representan una carga tumoral importante y por tanto peor pronóstico. Los tumores estenóticos tienen peor pronóstico por el riesgo de obstrucción consecuyente y la necesidad de una intervención quirúrgica urgente que impida una correcta valoración previa de la enfermedad a distancia. En los casos de perforación podría provocar una extensión de la enfermedad por contigüidad (77)(78).
  - Niveles preoperatorios de CEA: niveles preoperatorios mayores de 5.0 ng/mL representan un factor pronóstico adverso (79).
- Factores moleculares: Es un campo en investigación y que promoverá numerosos avances en los próximos años. **Actualmente** el único factor investigado de rutina en estadios precoces en la práctica clínica es la **inestabilidad de los microsatélites**.
  - Inestabilidad de los microsatélites: Mutaciones en al menos 1 de los genes reparadores están **asociado al síndrome de Lynch**, aunque también se puede

encontrar en el 15-20 % de los cánceres de colon esporádicos. La inestabilidad de los microsatélites confiere un **factor de buen pronóstico en estadios precoces**, al contrario que en estadios avanzados (metastásicos) ya que suele estar asociados con mutaciones en el gen BRAF V600E y resistencia a fármacos (80)(81). Por otra parte, la inestabilidad de los microsatélites también permite el uso de inmunoterapia lo que aporta otra diana adicional en estos casos.

- KRAS y N-RAS: son factores pronósticos en los CCR metastásicos. La mutación de K-RAS en el codón 12 o 13 del exón 2 está presente en el 12-75% de los tumores (82). Su mutación adquiere **resistencia al tumor a la terapia anti-EGFR (83)**.
- BRAF v-600E: está presente en un 10 % de los tumores esporádicos, sobre todo en pacientes fumadores. Es un factor pronóstico negativo en tumores en estadios precoces y avanzados que no asocian inestabilidad de los microsatélites (84). La mutación BRAF debe **testarse en tumores con inestabilidad de los microsatélites por pérdida de función del MLH1**. La presencia de mutación en BRAF favorece que se trate de un tumor esporádico, pero su ausencia no excluye el síndrome de Lynch (85).

Una vez analizados los principales factores pronósticos del CCR, la **supervivencia CCR** a 5 años en Estados Unidos (EE. UU.) en el periodo recogido entre 2011 y 2017 es del **64.7 %**, representando un 8.7% de todas las muertes por cáncer. Descifrando los porcentajes por estadios, el localizado presenta una supervivencia a 5 años del 37%, el localmente avanzado del 36% y el metastásico del 22% (86). En España, la supervivencia del CCR a 1,3 y 5 años ha sido recogida por la red REDECAN en España desde el año 2004 al 2013, siendo su última actualización en 2013 y representando en 58% de supervivencia global a los 5 años (4)(87). Estas cifras son similares a las de EE. UU. y su discrepancia a favor del estudio más reciente podría estar relacionada con los avances en los últimos años en materia de tratamiento y diagnóstico precoz.

Supervivencia (%)	Mujeres	Hombres
1 año	78.6%	77.2%
3 años	65.2%	63.7%
5 años	59.8%	57.5%

Supervivencia a 5 años	Mujeres	Hombres
Edad 15-44 años	69.6%	66.6%
Edad 45-54 años	66.7%	64.8%

<b>Edad 55-64 años</b>	67.4%	62%
<b>Edad 65-74 años</b>	61.1%	59%
<b>Edad 75-99 años</b>	47.1%	47.1%

<b>Supervivencia a 5 años</b>	
<b>Estadio I</b>	90-92%
<b>Estadio II</b>	60-75%
<b>Estadio III</b>	25-55%
<b>Estadio IV</b>	< 8%

Tabla 1 A-B-C: Supervivencia estimada de CCR.

## A2. CARCINOGENESIS DEL CÁNCER COLORRECTAL

La carcinogénesis es el **proceso por el cual las células adquieren un comportamiento invasivo**. Este proceso se debe a alteraciones genéticas de los sistemas de proliferación, regulación y diferenciación celular. El CCR puede agruparse según 3 patrones diferenciados:

- Cáncer esporádico: en este patrón no hay antecedentes familiares de CCR y representa el **70% de los casos**. Está relacionado con factores de riesgo como la edad, la dieta y factores medioambientales. Se producen **por mutaciones genéticas a nivel somático**.

- Cáncer genético: en este patrón hay una relación con generaciones anteriores y suelen estar relacionados con síndromes. Representa un 10% de los CCR y se pueden distinguir según la presencia o no de pólipos como manifestación clínica principal en: síndromes asociados a poliposis o no asociados a poliposis. Podemos distinguir dentro de los primeros al síndrome de Lynch, la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF), las poliposis asociadas al gen MUTYH, las poliposis hamartomatosas (PTEN, Peutz-Jeghers, poliposis juvenil, síndrome de Cowden). Su diagnóstico es posible en muchas ocasiones mediante paneles genéticos que identifican la mutación. **Se producen por mutaciones a nivel germinal**.

- Cáncer familiar: este patrón representa al 20 % de los casos. Afecta a personas con antecedentes familiares de CCR, sobre todo de 1º grado (hijos, padres o hermanos) pero que no forman parte de los síndromes anteriormente reflejados. Se producen por alteraciones genéticas con baja penetrancia o alteraciones complejas en “locis” susceptibles con efecto sumatorio.

El primer modelo de carcinogénesis del CCR fue postulado en la década de los noventa del siglo anterior por Fearon y Vogelstein proponiendo un modelo genético multistadio de carcinogénesis (88). Desde entonces, los avances científicos han permitido descubrir y desarrollar el conocimiento de las nuevas vías de carcinogénesis del CCR, ya que es un tumor con una gran heterogeneidad genética. Si bien, aún es necesario profundizar en el conocimiento sobre las diversas vías moleculares y biológicas implicadas en la carcinogénesis. El CCR puede estar producido por docenas de mutaciones somáticas o por alteraciones germinales. El CCR se clasifica en hipermutado (cuando presenta

más de 12 mutaciones por 1.000.000 de bases) o no hipermutado (menos de 8 mutaciones por cada millón de bases) (89).

Se distinguen **3 vías fundamentales de carcinogénesis como son la vía de la inestabilidad cromosómica (CIN), la vía de la inestabilidad de los microsatélites (MSI) y la vía de la neoplasia serrada (90)**. Estas vías carcinogénicas pueden originar el CCR de forma individual o puede haber solapamiento entre ellas, dando lugar a una mayor heterogenicidad tumoral.

### **A2.1 Vía tradicional o de inestabilidad de los cromosomas (CIN).**

Es la primera vía descrita, aunque su conocimiento se ha ido actualizando y completando progresivamente con la aparición de nuevos trabajos científicos. Se basa en una **alteración gradual, sumatoria o modelo de “sucesivos impactos”** debido a mutaciones progresivas de los distintos mecanismos de regulación de la proliferación y supresión de tumores. Describe como la mayoría de los CCR proceden de pólipos precancerosos que degeneran debido a la alteración de los mecanismos de reparación del ADN y a la proliferación celular (88). Esto se fundamenta en que se necesita una cierta renovación epitelial que sucede en la base de las criptas intestinales y que a medida que se van degenerando avanzan por la cripta hacia el lumen para continuar con el proceso de apoptosis. En esta ruta, el proceso se ve alterado, resultando en la formación de pequeños adenomas que, con el tiempo, debido a mutaciones acumulativas y pérdidas sucesivas de la función de los mecanismos reguladores, aumentan de tamaño y de potencial de malignización. Este crecimiento se debe a su progresión hacia una displasia de mayor grado, avanzando gradualmente hasta evolucionar en un carcinoma con potencial invasivo.

**No todos los adenomas de bajo grado evolucionan a carcinoma, se necesitan una serie de alteraciones específicas y con un orden determinado para que esta secuencia degeneren.** El tiempo estimado de la **secuencia adenoma-carcinoma** según esta vía se estima en unos **10 años**, con el consiguiente significado clínico que tiene este evento en los plazos de seguimiento endoscópico. La mayoría de las guías clínicas actuales se basan en este modelo para fijar los plazos de seguimiento mediante colonoscopias regladas.

La alteración de la vía CIN en alguno de sus niveles se observa en un 75-80% de los CCR esporádicos y en algunos síndromes polipósicos como la PAF y la poliposis ligada al MUTYH y se caracteriza por cambios cromosómicos que incluyen alteraciones genéticas somáticas o germinales en el caso de las poliposis, causadas por deleciones, inserciones, aneuploidías, silenciamiento, amplificaciones o pérdida de heterocigosidad en los genes supresores de tumores (APC y p53) y/o activaciones de los genes de la familia RAS, RAF y PI3K (91). Es una vía que produce **tumores no hipermutados** debido a la escasez de mutaciones en los pares de bases. Las distintas vías que a continuación desarrollaremos pueden ser afectadas en su conjunto o sólo algunas de forma parcial.

#### **A2.1.1 Vía de señalización de WNT/APC/Beta-Catenina**

El inicio de esta cascada se debe a la modificación del gen que codifica la proteína **APC** (adenomatous polyposis coli) produciéndole una **pérdida de funcionamiento** o truncamiento que provoca una cascada de errores (92). Para ello necesita la pérdida de funcionamiento de los dos alelos. La función de la proteína APC es degradar la beta-catenina citoplasmática al conjugarse con la ubiquitina. Al truncarse la APC, la beta-catenina se acumula y facilita la adhesión celular, así como interrelaciona con la vía del gen WNT1 (93). El gen WNT1 codifica una proteína que actúa en la señalización extracelular y además ejerce como factor de crecimiento, por lo que su activación inhibe la actividad de la quinasa GSK3-beta **impidiendo la degradación de la beta-catenina citoplasmática** anteriormente comentada, y por tanto favoreciendo su acumulación y paso al núcleo donde activa a genes como el oncogen c-MYC, el gen de la ciclina D1 (CCND1) y los genes del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que en situaciones normales se encuentra reprimidos (94). La alteración de la WNT1 está activada en prácticamente todos los tumores con inestabilidad cromosómica.

Por otra parte, c-MYC es un oncogen que regula la progresión del ciclo celular, el metabolismo y la apoptosis, observándose una amplificación de este gen en la mayoría de CCR.

### **A2.1.2 Vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**

EGFR es un factor de crecimiento y progresión tumoral que afecta la regulación de mecanismos de proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis (95). La familia del receptor EGFR comprende 4 moléculas: HER1, HER2, HER3 y HER4. La activación de esta vía se puede realizar por unión de ligando específicos del EGFR o por mutación de los efectores del EGFR, cuestión clave debido a que provocaría una resistencia a fármacos anti-EGFR (96). Dicha activación independiente se puede realizar por mutación de las vías RAS/RAF/MEK/MAPK o por la vía PI3K/PTEN/AKT/mTOR.

#### **A2.1.2.1 Vía señalización RAS/RAF/MEK/MAPK (Vía de las MAPs quinasas)**

La mutación en el gen de la familia RAS (K-RAS, H-RAS y N-RAS) surge generalmente de forma posterior a la mutación del gen APC en la vía tradicional y se observa en el 40% de los tumores CCR. La familia RAS son reguladores de señalización del EGFR y actúa fosforilando y activando a la familia de las RAF, que éstas a su vez ejercen acción sobre las proteínas MEK y MAPK (conocidas como MAP quinasas) ayudando a la proliferación y supervivencia celular (96).

Cuando se produce una mutación en la familia RAS (generalmente en el codón 12) se produce una activación continua de RAF (en esta vía BRAF, que es su principal efectora) y posteriormente de MEK y MAPK que desemboca en una estimulación celular continua y provoca el crecimiento, progresión del ciclo celular de la fase G1-S, la estimulación de la angiogénesis inducida por tumor y la invasión y metástasis (97).

Por otra parte, BRAF se encuentra mutada en un 13% de los CCR, siendo su mutación más frecuente la V600E (99% de los casos) (98). Por tanto, la **mutación de BRAF en estos casos provocaría su activación independiente de EGFR y sería un mecanismo de resistencia a terapia anti-EGFR.**

#### **A2.1.2.2 Vía señalización PI3K/AKT/mTOR/PTEN**

La vía PI3K/AKT/mTOR comienza con la activación PI3K por el EGFR, quinasa que activa a PIP2 convirtiéndose en PIP3, que a su vez también puede ser activada directamente por K-RAS, proceso clave en esta vía (96). Este paso de PIP2 a PIP3

puede ser regulado por la fosfatasa homóloga del tensinógeno (PTEN) ejerciendo de proteína supresora tumoral. PIP3 fosforila AKT y PDK1 que activan a los complejos mTOR 1 y 2 activando el metabolismo tumoral, incrementando movilidad, adquiriendo resistencia a la apoptosis y un aumento de angiogénesis tumoral y progresión del ciclo celular.

**Mutaciones en el gen PTEN** desregularían a PI3K y por tanto activaría la vía del factor de crecimiento independientemente, provocando **resistencia a los fármacos anti-EGFR** (99).

### A2.1.3 Vía de señalización de MET

El **MET es un protooncogén** que codifica una proteína cuyo ligando es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que juega un papel fundamental en la regeneración de los tejidos. Alteraciones en esta vía afectan a los procesos de proliferación, apoptosis y migración celular (96). Su efecto lo ejercen activando a las dos vías anteriores, actuando sobre AKT (vía PI3K/AKT/mTOR) y sobre la familia RAS (vía MAPs quinasa) produciendo los mismos efectos comentados anteriormente. Además, MET **favorece la angiogénesis** ya que es un inductor del VEGF tipo A y un inhibidor de la trombospondina-1, dando lugar a un aumento de la vascularización tumoral (100). En el caso de CCR, se ha observado que en ausencia de mutación de la familia RAS y cuando existe sobreexpresión del factor de crecimiento tumoral alfa (TGF-alfa) como ligando de EGFR se podría dar lugar a la activación de la vía MET, por lo que también sería causa de resistencia frente a terapias anti-EGFR (101).

### A2.1.4 Vía del gen supresor TP53

El gen TP53 está situado en el cromosoma 17p. Es el **gen mutado más frecuente en todos los tipos de cáncer** y su producto, la proteína p53, es una de las proteínas más importantes del ciclo replicativo puesto que regula la transcripción de genes que intervienen en la reparación del ADN y en las respuestas celulares al estrés oxidativo deteniendo el ciclo ante estímulos como la hipoxia que podrían dañar el ADN (102). La pérdida de función de p53 se observa en adenomas avanzados y en carcinomas iniciales interviniendo en la etapa tardía de la tumorigénesis (91). El 60% de los tumores CCR tienen alterado la función de p53, siendo mayor el porcentaje en edades tempranas.

### **A2.1.5 Vía de la activación de la prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (COX-2)**

Su acción fundamental es convertir el ácido araquidónico libre en prostanoïdes como la prostaglandina 2, que regulan la proliferación de células tumorales colorrectales, interviniendo en la angiogénesis tumoral y contribuyendo en las actividades invasivas y migratorias de las células tumorales de CCR, sobre todo en las primeras etapas, ya que aumenta el tejido estromal y sirve como base de sustentación al tumor (102). Esta acción podría explicar la acción de fármacos inhibidores de COX como los antiinflamatorios no esteroïdeos y el ácido acetilsalicílico a bajas dosis en la reducción del riesgo de desarrollo del CCR en adultos (90).

### **A2.1.6 Vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta)**

Forma parte de una familia de 5 genes (TFG-beta 1 al TFG-beta 5). Se unen a 3 tipos de receptores denominados tipo 1,2 y 3 del TFG-beta. Estos factores transformantes son producidos por el tumor en fases avanzadas y aportan capacidades de adhesión tisular y celular, favoreciendo el proceso metastásico (96). También intervienen en el mantenimiento de las células madre pluripotenciales y en la transición epitelio-mesénquima (103).

### **A2.2 Vía de la inestabilidad de los microsatélites (MSI)**

Esta vía se considera una **vía de hipermutación**, ya que presenta numerosas mutaciones de pares de bases de ADN somático o germinal. En esta vía se produce la mutación de los genes de reparación de errores del ADN o como se conoce en inglés "mismatch repair" (MMR) como son los **genes MLH1, MSH2, MSH6, PSM1 PMS2 o una alteración en EPCAM**, molécula que codifica una proteína que regula a MSH2, causando una inestabilidad o errores en las regiones de los microsatélites de ADN (91). Estos microsatélites son secuencias en tándem de bases repetidas que son procesados por la ADN polimerasa. En condiciones normales, estos errores se solucionan mediante la escisión de ese fragmento, pero cuando se encuentran mutadas las proteínas de la familia MMR se produce un error en este sistema produciendo una proteína no funcional por hipermutación (90).

La inestabilidad de los microsatélites **se observa en cerca del 15% de los CCR esporádicos** y en casi todos los CCR en pacientes con síndrome de Lynch (104). En el caso de los tumores esporádicos, esta pérdida de función se produce por hipermetilación, generalmente del gen MLH1, provocando su silenciamiento, mientras que en los síndromes de CCR hereditario como el anterior se produce por mutaciones en la línea germinal.

Esta vía también se puede combinar con mutaciones anteriormente comentadas en la vía de la inestabilidad cromosómica como la mutación de APC, BRAF V600E y pT53, pero son menos frecuentes que en la vía tradicional. Una vez que se inicia la vía de la inestabilidad, la secuencia adenoma-carcinoma suele ser más rápida que en la vía tradicional, desarrollándose el CCR en 1-3 años, siendo también este aspecto fundamental en el seguimiento y tratamiento de los pacientes (105). La presencia o no de inestabilidad de los microsatélites se realiza de rutina en todos los CCR por consenso mediante inmunohistoquímica para su estadificación. Pacientes con **alta inestabilidad de los microsatélites pueden beneficiarse de terapia con anti-PD-L1** (106).

### **A2.3 Vía serrada**

La tercera ruta de la carcinogénesis es la ruta serrada, la cual ha sido descrita en los últimos años. Esta vía da lugar a los pólipos serrados, pólipos que hasta hace pocos años pasaban desapercibidos en su gran mayoría por su dificultad de detección con la luz blanca endoscópica, pero que con los avances endoscópicos suponen un mayor grado de detección que en épocas previas. Se estima que esta vía podría dar lugar al 15 % de los CCR y **ser causa de la mayoría de los carcinomas de intervalo** (107). Está **relacionada con la obesidad y el consumo de tabaco**, siendo su etiología fundamentalmente ambiental, aunque también hay algunos genes asociados como el gen RNF43, siendo su afectación muy inusual. Los pólipos serrados son un grupo heterogéneo de lesiones caracterizadas por un patrón en dientes de sierra en las criptas al análisis anatomopatológico, y que incluyen pólipos hiperplásicos benignos, adenomas serrados tradicionales y adenomas serrados sésiles.

La vía serrada es una **ruta de carcinogénesis acelerada** si la comparamos con la tradicional, asemejándose a la ruta de los microsatélites con inestabilidad alta. En esta vía **destaca la mutación V600E del BRAF**, ya comentado en anteriores epígrafes y

que produciría una activación continua de la vía de las MAPs quinasas, siendo una diana poco frecuente en la vía tradicional (90).

Tras la mutación de BRAF, los tumores de estirpe serrada podrían originarse según dos vías. Por una parte, la vía convergente de la ruta de la inestabilidad de los microsatélites caracterizadas por alteraciones en los genes MMR dando a un perfil similar a los tumores de la vía de MSI y siendo típica de los adenomas serrados sésiles. En la otra vía alternativa, tras la mutación de BRAF, se producen mutaciones de p53, la activación de WNT no dependiente de truncamientos de APC, la producción de TGFB y una menor supervivencia, siendo típicas estas alteraciones de los adenomas serrados tradicionales (90).

En ambas vías serradas, se produce también característicamente una hipermetilación de islas CpG, grupos de dinucleótidos de citosina y guanina que provocan el silenciamiento genético de genes supresores y la progresión tumoral (108).

#### **A2.4 Clasificación Molecular del CCR**

Una vez definidas los distintos modelos de carcinogénesis más importantes y las vías implicadas, en 2015 se publicó "The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer", en el que tras el análisis de 18 conjuntos de datos mediante "Next Generation Sequencing" (NGS) se incluyeron 4.151 pacientes y se clasificaron en 4 subtipos moleculares de CCR incluyendo a 3.104 muestras de las 4.151 (un 13 % no correspondieron a ningún subtipo) (109).

- **CMS1. Subtipo inmune:** Se caracteriza por la presencia de alta inestabilidad de los microsatélites, fenotipo metilador de islas CpG y mutación BRAF frecuente. Tiene bajo número de mutaciones somáticas y **peor pronóstico**. Representa el 14 % de los CCR. Clínicamente tienen peor pronóstico debido a la mutación BRAF, aunque en ellos se puede utilizar fármacos inmunoterápicos.

- **CMS2. Subtipo canónico:** Tiene alto número de mutaciones somáticas, y sin inestabilidad de los microsatélites. Tienen mutación de la vía WNT y de los oncogenes c-MYC, alta expresión de EGFR y mutación de TP53. Representa el 37% de los CCR y tienen un **pronóstico intermedio**. Se recomienda en este subtipo tratamiento con anti-EGFR como panitumumab y cetuximab.

- **CMS3. Subtipo metabólico:** Tienen **características intermedias**. Baja presencia de mutaciones somáticas, activación moderada de WNT y c-MYC, inestabilidad de los microsatélites variable, mutación de K-RAS, PIK3 frecuente y sobreexpresión del gen IGBP3. Se recomienda tratamiento con antiangiogénicos como Bevacizumab

- **CMS4. Subtipo mesenquimático:** Tiene alta tasa de mutaciones somáticas, alta concentración de TGB-bm, angiogénesis y citoquinas proinflamatorias. Se recomienda tratamiento con Irinotecan o inhibidores de TGF-beta (Galunisertib o Fresolimumab) aunque estos últimos aún están en fase de estudio.

Tipo	CMS 1	CMS 2	CMS 3	CMS 4
<b>Frecuencia</b>	14%	37%	13%	23%
<b>Localización más frecuente</b>	Colon derecho	Colon izquierdo, sigma y recto	Sin predominancia	Colon izquierdo, sigma y recto
<b>Perfil genómico predominante</b>	CIMP alto MSI alto Mutación BRAF	APC mutado SCNA alto	CIMP alto SCNA bajo MSI variable Mutación KRAS	SCNA alto
<b>Terapias propuestas o en investigación</b>	Inmunoterapia QT con Irinotecan + Cetuximab + Vemurafenib	Anti-EGFR (Panitumumab y Cetuximab)	Anti-angiogénicos (Bevacizumab)	Inhibidores de TGF-beta Irinotecan
<b>Otras características</b>	Infiltración y activación inmune	Activación de vías c-MYC y WNT	Desregulación metabólica	Infiltración estromal Activación TGF-beta Angiogénesis

Tabla 2: Clasificación molecular del CCR. Adaptado de: González J, Valenzuela G, Ahumada M. Clasificación molecular del cáncer colorrectal, su impacto pronóstico y terapéutico: un paso crucial hacia la medicina personalizada. Rev Hosp Clín Univ Chile 2020; 31: 231-41. Abreviaturas: MSI: Inestabilidad microsatelital. CIMP: Fenotipo metilador de islas CpG. SCNA: Alteración de número de copias somáticas. Anti-EGFR: inhibidores del factor de crecimiento epitelial.

## **A3. BIOPSIA LÍQUIDA EN CÁNCER DE COLON.**

### **A3.1 Concepto de biopsia líquida**

La biopsia líquida (BL), según la definición de la Sociedad Internacional de Biopsia Líquida (ISLB), es un examen mínimamente invasivo que utiliza fluidos corporales (orina, sangre, semen, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, etc) para identificar biomarcadores circulantes asociados a una enfermedad. El propósito es recopilar información diagnóstica, pronóstica o predictiva de la enfermedad.

Durante los últimos 15 años, esta área del conocimiento ha experimentado un desarrollo exponencial, especialmente en los últimos 10 años, sobre todo en el campo de la oncología. Se han desarrollado numerosas técnicas que han ampliado el conocimiento sobre la heterogeneidad tumoral, lo que permite identificar diferentes subpoblaciones tumorales y comprender sus mecanismos de adaptación, resistencia y selección positiva ante diversos tratamientos antitumorales (110).

Este avance ha llevado a la identificación de clones tumorales más resistentes, permitiendo anticipar estos cambios en la práctica clínica y modificar estrategias terapéuticas previamente a que se manifieste el fracaso terapéutico, algo que no sería posible con las técnicas tradicionales como las biopsias de tejido o las pruebas de imagen. Además, la biopsia líquida **permite conocer el perfil biomolecular del tumor en diferentes etapas sin necesidad de recurrir a procedimientos invasivos.**

Comparada con la biopsia tisular, la BL presenta como principal ventaja la capacidad de detectar la heterogeneidad tumoral en tiempo real. Esto se diferencia de la biopsia tisular, donde solo se obtiene información biológica de un fragmento de tejido y en un momento específico.

Otra ventaja, posiblemente la más significativa, es la capacidad de realizar análisis de forma secuencial para observar la evolución de la enfermedad en cada paciente y cómo responde al tratamiento administrado. Esto permite anticiparse a posibles recaídas y resistencias tumorales potenciales, ya que se monitorea en tiempo real la situación del paciente (111).

En este aspecto, es justo destacar el papel fundamental que ha desarrollado el centro granadino Genyo, siendo un referente regional, nacional e internacional en la investigación de la biopsia líquida. Esta importancia cobró especial relevancia tras la

creación en 2016 de la ISLB, organización que aglutina a multitud de grupos internacionales líderes en el campo de la biopsia líquida, facilitando la integración del conocimiento y el acceso a los avances más novedosos en este campo, permitiendo comprender y aglutinar todo el conocimiento obtenido (110).

Entre las limitaciones de la BL, destaca la falta de protocolos estandarizados para su implementación en la clínica. Esto ha provocado que su implantación en la práctica clínica sea progresiva pero aún en desarrollo. La biopsia líquida aún no se considera un procedimiento de prueba estándar, aunque se está implantando progresivamente. La biopsia de tejido sigue siendo el estándar para la confirmación y el diagnóstico de enfermedades, incluidos varios tipos de cáncer, y para la determinación de las características de una enfermedad. En la actualidad, la biopsia líquida se utiliza como reemplazo de la prueba de biopsia de tejido, solo en el caso del ADN circulante tumoral, cuando la muestra de biopsia convencional no es de buena calidad o no es posible obtenerla y solo en el caso de algunas enfermedades tumorales y estadios definidos: pulmón y colon metastásicos. La biopsia líquida es en la actualidad una prueba complementaria a la biopsia de tejido (112).

Si bien el ADN circulante tumoral (ctDNA) ha sido aceptado como un marcador pronóstico independiente en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de colon en estadios metastásicos, su utilidad no está igualmente establecida en estadios tempranos. En cuanto a las células tumorales circulantes (CTCs), la Sociedad Internacional de Biopsia Líquida (ISLB) destaca la necesidad de ensayos clínicos adicionales que demuestren su validez y utilidad clínica, tanto en estadios iniciales como en contextos metastásicos (113).

Todavía existen desafíos en la sensibilidad de la prueba. Dado que las células tumorales o el ADN circulante son relativamente raros en comparación con el número de moléculas hematológicas encontradas en una muestra de sangre, por lo que existen desafíos en la capacidad de detección de la prueba.

En referencia al CCR, la biopsia líquida es un campo muy prometedor, no sólo en los estadios avanzados, donde el ctDNA es utilizado en la práctica clínica para detectar los perfiles de resistencia tumoral frente a fármacos anti-EGFR, fluoropirimidinas o antiangiogénicos permitiendo cambios precoces en el tratamiento. En el caso de los estadios precoces, objeto de estudio de esta tesis doctoral, la biopsia líquida tiene un papel destacado en la idea de intercepción del cáncer o “**cancer interception**”,

concepto en inglés que hace referencia a la **detección del cáncer en sus etapas precoces**. Dicho término será utilizado a lo largo de la tesis. El concepto “cancer interception” implica la **identificación de biomarcadores que puedan predecir con antelación el potencial riesgo de desarrollo de cáncer o de una progresión a la metástasis, e incluye el análisis tanto de alteraciones genéticas y epigenéticas, así como de la detección de células tumorales circulantes en individuos de riesgo, y la implementación de estrategias terapéuticas para prevenir el inicio del cáncer y detener su desarrollo** (114).

### **A3.2 Tipos de biopsia líquida**

El espectro de la biopsia líquida cada vez es más amplio como hemos comentado anteriormente y podemos distinguir distintos elementos analizados en diferentes fluidos corporales. En esta tesis el objetivo de estudio se centra en biomarcadores detectados en los distintos componentes sanguíneos:

#### ✓ **Plasma:**

Dentro del plasma se pueden identificar:

- **Vesículas extracelulares (EVs):** pueden dividirse ampliamente en dos categorías, ectosomas y exosomas. Los ectosomas son vesículas que se desprenden de la superficie de la membrana plasmática mediante una protrusión hacia afuera, e incluyen microvesículas, micropartículas y vesículas grandes en un rango de tamaño de aproximadamente 50 nm a 1 µm de diámetro. Los exosomas son EVs con un rango de tamaño de aproximadamente 40 a 160 nm (promedio de aproximadamente 100 nm) de diámetro y tienen un origen endosomal. Dependiendo de la célula de origen, las EVs, incluidos los exosomas, pueden contener muchos constituyentes de una célula, incluyendo ADN, ARN, lípidos, metabolitos, proteínas citosólicas y de superficie celular (115).

- **Proteínas:** El estudio de la proteómica mediante BL es un campo en avance, si bien, es dificultoso poder examinarlo, ya que se incluyen unos 25000 genes traducibles a proteínas dentro del genoma humano, abarcando a más de un millón de proteoformas diferentes a través de la regulación epigenética de esta. Además, esta proteómica está sometida a distintos estímulos y cambios que hacen que sea mucho más dinámica que

el genoma humano. Actualmente la mayoría de los estudios relacionados con BL y proteómica se relacionan con diagnóstico precoz, usando espectrometría de masas para detección de marcadores tumorales; ensayos antígeno/anticuerpos, útiles en diagnóstico precoz del cáncer de vejiga y de ovario y el estudio de aptámeros u oligonucleótidos, utilizados como screening de adenomas o CCR precoz (116).

- **MicroARN (miRNA):** Los microARN son un grupo altamente conservado de pequeñas moléculas de ARN no codificante, que tienen un tamaño de 19 a 25 nucleótidos y que desempeñan una función crucial en la regulación genética postranscripcional. Anteriormente considerados desechos evolutivos sin una función evidente, se ha descubierto que estos pequeños ARN **controlan principalmente la expresión génica con la capacidad de silenciar genes**. Los microARN son cruciales para la fisiología celular y el desarrollo. También están implicados en procesos patológicos como enfermedades autoinmunes, infecciones virales y carcinogénesis. Pueden **regular el microambiente tumoral, afectar a la angiogénesis o a la interacción estromal de las células tumorales**. La desregulación de estos podría implicar el desarrollo de la tumorogénesis. Los microARN regulados negativamente podrían funcionar como supresores de tumores al reprimir los oncogenes mientras que los microARN sobreexpresados podrían funcionar como oncogenes al suprimir los supresores de tumores. Numerosos micro-ARN están relacionados con el CCR. Destacan la presencia de microARN con función supresora como son: miR-145, miR-143, miR-194, miR-34, miR-28, miR-93, miR-126, miR-27b, miR-18-3p. Con función oncogénica, la pérdida del miR-122 podría estar relacionada con el CCR, como ocurre con el hepatocarcinoma (117).

- **ADN libre circulante (cfDNA):** Fragmentos de ADN liberados en el torrente sanguíneo que provienen principalmente de la apoptosis de células hematopoyéticas. Dentro de ellos, el ADN liberado por células tumorales, conocido como **ADN circulante tumoral (ctDNA)** puede contener alteraciones que pueden proporcionar marcadores altamente específicos para la detección (115).

✓ **Fracción celular**

De la fracción celular se pueden obtener:

- **Células tumorales circulantes (CTCs):** Células procedentes de las masas tumorales que son capaces de sobrevivir en el torrente sanguíneo. Podemos detectarlas: aisladas, en clústeres o en microémbolos (115). Nos centraremos posteriormente en ellas.

- **Células endoteliales circulantes (CECs):** son células endoteliales vasculares que actúan como marcadores de daño endotelial y su aumento también se observa en procesos autoinmune, infeccioso o tumoral. Intervienen en la angiogénesis tumoral (115).

- **Plaquetas educadas por el tumor (TEP):** Las plaquetas son el segundo tipo de células más abundantes en la sangre periférica y su aislamiento se realiza por métodos rápidos y bien establecidos. Son depósitos importantes de posibles biomarcadores de cáncer (ARNm, miARN y ARN mitocondrial) y proteínas. Además, después de la interacción con células tumorales o biomoléculas asociadas a tumores, las plaquetas pueden alterar su perfil de ARN y este proceso da lugar a las denominadas **plaquetas educadas por el tumor, efectuando una función reguladora** y por tanto consideradas **como mensajeras tumorales**. También han sido reconocidas como participantes efectivos en las respuestas sistémicas y locales al crecimiento tumoral y metástasis. La inducción por el tumor de su agregación es considerada como promotora de la angiogénesis y metástasis (118).

## TIPOS DE BIOPSIA LÍQUIDA EN SANGRE

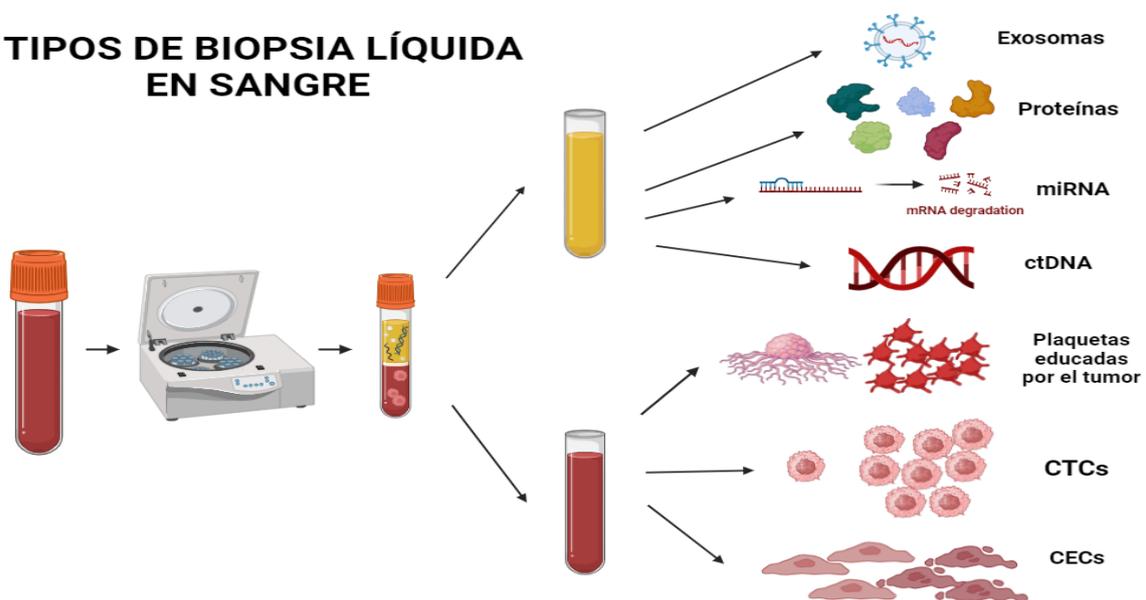


Figura 1: Tipos de biopsia líquida en sangre.

En esta tesis doctoral nos centraremos en las CTCs y el ctDNA.

### A3.2.1. Células tumorales circulantes (CTCs)

Las **CTCs** son células procedentes del tumor que se encuentran en el torrente circulatorio en una proporción aproximada de 1 por cada millón de células (119). Esta proporción explica la gran dificultad para su aislamiento. Estas células son capaces de ser liberadas al torrente sanguíneo desde el tumor y tras distintos procedimientos de "escape inmunológico" aún por dilucidar completamente, son capaces de alcanzar otros órganos dianas y tejidos dando lugar a la enfermedad metastásica a distancia. Se conoce que dicho proceso es un proceso muy selectivo y cuya vida media oscila entre las 1 y 4 horas (120), necesitando para ello la interacción con el mesénquima (pérdida de EpCAM), el endotelio y células del sistema inmune como las plaquetas y los macrófagos que ejercen un papel regulador (121).

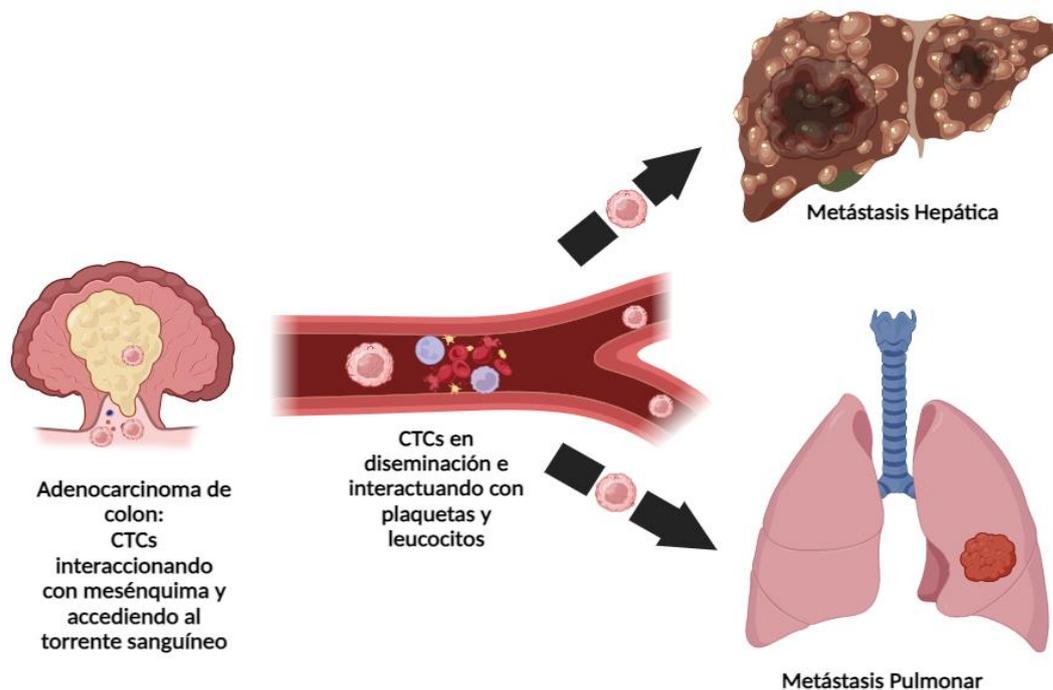


Figura 2: Diseminación de CTCs y "escape inmune" en el torrente sanguíneo

#### A3.2.1.1 Metodología de aislamiento y caracterización de CTCs

La detección y análisis cuantitativo y cualitativo de CTCs en sangre periférica implica varios pasos procedimentales. La **identificación de CTCs es dificultosa debido a su escasez y por su dificultad de separarla del resto del componente sanguíneo**. La separación de las CTCs del resto del componente sanguíneo se puede realizar mediante

propiedades biofísicas como la deformidad, la densidad, el tamaño celular o la forma nuclear o basadas en propiedades biológicas de las CTCs que generalmente implican el uso de anticuerpos que permiten seleccionar las células de interés.

- **Fase de conservación:** Las muestras si no son procesadas dentro de las primeras 12 horas desde la obtención, deben ser coleccionadas en tubos especializados, que, si bien encarecen el proceso, garantizan su viabilidad, debido a la presencia de aditivos que permiten fijarlas. La conservación en estos tubos, no obstante, pueden afectar a la expresión de algunos receptores. En el mercado existen diferentes compañías que comercializan estos tubos. La conservación en estos recipientes garantiza la viabilidad de las CTCs hasta 96 horas.

- **Fase de aislamiento celular o enriquecimiento:** permite diferenciar y separar las CTCs del resto de componentes sanguíneos. El objetivo de esta fase es condensar la fracción de CTCs y eliminar los elementos no útiles en nuestro estudio, como los eritrocitos y los leucocitos.

Existen diferentes tipos de metodologías y enfoques para el aislamiento de CTCs.

- ❖ **Microfiltración:** Se basa en la diferencia de morfología entre las CTCs (15-40  $\mu\text{m}$  de diámetro) y los leucocitos (< 10  $\mu\text{m}$  de diámetro). Es un método simple y rápido que suele utilizar una membrana de sílice. Ejemplos pueden ser el CanPatrol®, MetaCell®, ISET®, y los filtros de hendidura cónica. Este método permite la captura de CTCs individuales y pequeños clústeres o agregados de células con una tasa de recuperación relativamente alta. Como problemática fundamental destaca la presión de cizallamiento que puede dañar las células, disminuyendo la vitalidad de las CTCs (122).
- ❖ **Centrifugación mediante gradiente de densidad:** Permite separar las CTCs debido a la alta proporción de su núcleo comparado con el citoplasma, dando como resultado un coeficiente de sedimentación específicos de las CTCs, lo que permite separarlo del resto de componentes. Su principal inconveniente es la alta contaminación con leucocitos debido a tener una densidad similar a las CTCs. Para mejorar la tasa de recuperación (cerca al 20%) cuando se usan individualmente suelen usarse combinados con otros métodos complementarios.
- ❖ **Inmunoafinidad negativa para el anticuerpo CD45. Selección negativa de CTCs:** Permite diferenciar las CTCs de los leucocitos ya que estos últimos se unen específicamente al antígeno CD45. Previo a esto, suele necesitar la lisis o

separación del componente eritrocitario. A continuación, la muestra se incuba con anti-CD45 unido a partículas magnéticas y se expone a un imán que retiene a los leucocitos marcados separándolos así de las CTCs. La tasa de recuperación es mayor, cercana al 80 %.

- ❖ **Inmunoafinidad positiva a EpCAM. Selección positiva de CTCs:** En este caso el objetivo es capturar a las CTCs mediante el uso de marcadores específicos de CTCs. Destaca el uso de anticuerpos contra la molécula de adhesión de células epiteliales (**EpCAM**). **Esta molécula suele estar presente en las CTCs debido a que permite la interacción con la matriz extracelular en su proceso de migración endotelial.** Es el caso de las plataformas como CellSearch® e Isoflux TM®. CellSearch® utiliza nanopartículas de ferrofluido funcionalizadas con anticuerpos EpCAM para la separación magnética de las células marcadas. En el caso de Isoflux TM® combina el uso de microfluidos con partículas inmunomagnéticas preconjugadas con anticuerpos EpCAM para la separación de CTCs mientras pasan a través de un canal de flujo que atraviesa un campo magnético. Ambas técnicas permiten unos porcentajes de recuperación entre el 40-75% siendo su principal inconveniente la incapacidad para capturar CTC con baja o nula expresión de marcadores epiteliales (122). El **sistema IsoFluxTM®** (Fluxion Biosciences, Inc., Alameda, CA, EE. UU.) es una plataforma semiautomática para el enriquecimiento de CTCs mediante una combinación de selección inmunomagnética positiva con microesferas magnéticas y microfluidos que aumenta significativamente la eficiencia de aislamiento. Se logró una tasa de **recuperación y aislamiento de hasta el 90 %** usando diferentes líneas celulares de cáncer. Sin embargo, solo recientemente se ha utilizado la plataforma IsoFluxTM® para aislar CTCs de pacientes con cáncer colorrectal para evaluar la relación entre el estado de inestabilidad de microsatélites (MSI) y la liberación perioperatoria de CTCs (123). En cualquier caso, la enumeración de las CTCs aisladas con esta plataforma se realiza mediante inmunocitoquímica (**principalmente buscando selección positiva para citoqueratina y negativa para CD45**).
- ❖ **Enriquecimiento impulsado por microfluidos sin necesidad de filtros:** La separación se basa en el uso de canales que atrapan a las CTCs debido a su mayor tamaño y menor deformabilidad en comparación con el resto del componente sanguíneo, permitiendo el paso del resto del componente. Permiten además la enumeración y la tinción directamente de las CTCs como es

el caso de CD-PRIMETM®. En este caso, a diferencia de la microfiltración, no es necesario pasar por una membrana, evitando así el posible daño de las CTCs, quedando atrapadas en el canal para su posterior recuperación. Como principal inconveniente destaca el atrapamiento también de leucocitos debido a sus características morfológicas similares, cuestión que puede ser resuelta con el uso de técnicas de inmunoselección (122).

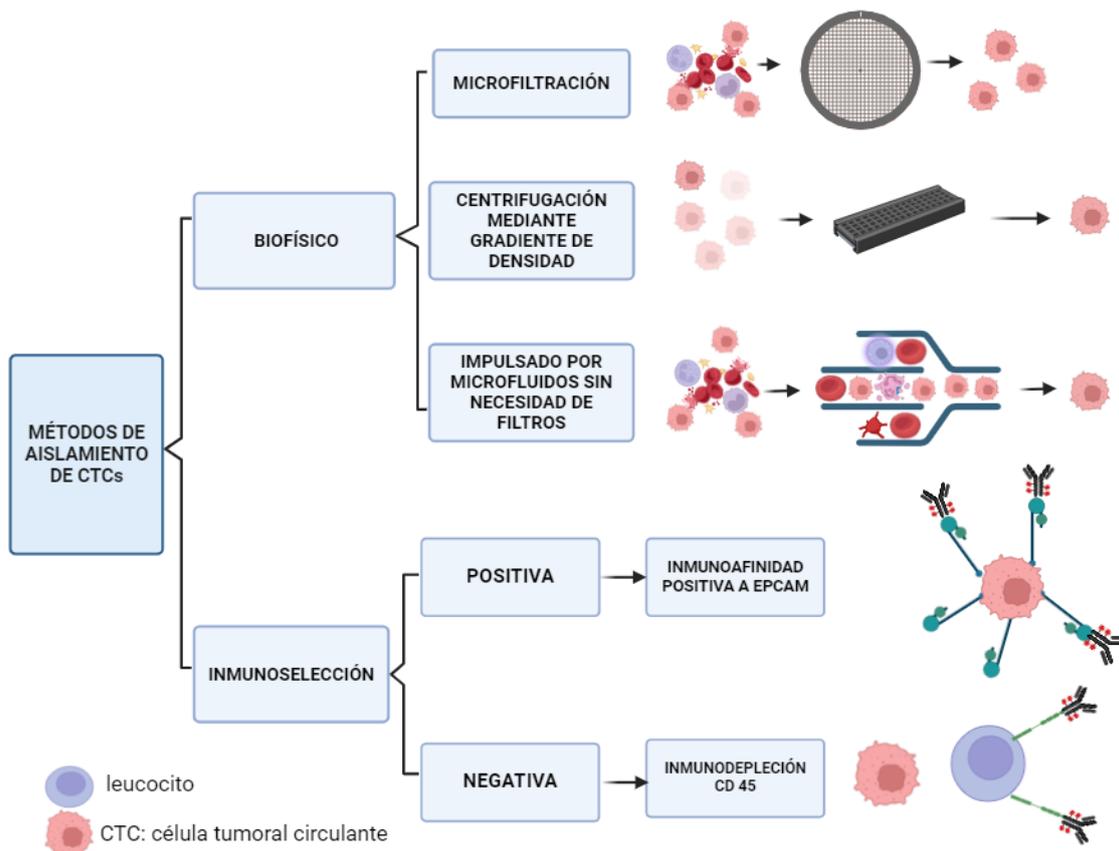


Figura 3: Métodos de aislamiento de CTCs.

- **Fase de detección/enumeración/caracterización celular:** Tras el aislamiento se realiza la identificación que consiste en el análisis fenotípico y/o genético de las características de las CTCs. Esta fase se puede realizar con microscopios de fluorescencia, con plataformas que se basa en citómetros de flujo para la caracterización fenotípica o uso de técnicas de PCR para la caracterización genómica.

En relación con la **microscopía de epifluorescencia**, también conocida como microscopía de fluorescencia de campo amplio (WFM, por sus siglas en inglés), es el método de microscopía de fluorescencia más comúnmente utilizado en este contexto de

caracterización de CTCs. La microscopía de fluorescencia permite la visualización de la morfología celular, los compartimentos celulares/subcelulares, así como los marcadores celulares, lo que permite identificar la célula tumoral del resto de células de la serie blanca, así como su fenotipo. El uso de microscopía de fluorescencia puede ir unido a plataformas automatizadas controladas por programas específicos que buscan las células de interés identificando el tipo y el número de estas. Esta opción facilita la visualización de la muestra, evitando sesgos por el observador humano y una mayor rapidez en la obtención de resultados

En cuanto a las plataformas, destaca el **citómetro de flujo Amnis ImageStream X MKII®** (Luminex, Bélgica), que utiliza un dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés) operado en modo de integración con retardo en el tiempo (TDI, por sus siglas en inglés). Este modo permite la captura de imágenes de objetos en movimiento con una calidad de imagen muy alta y una sensibilidad fotónica excepcional. En el modo TDI, la carga fotónica se transfiere a lo largo de cada fila de píxeles con una sincronización precisa con el tránsito de la célula, lo que permite un mayor tiempo de integración de la luz. Este efecto es similar a mover físicamente una cámara con el objeto. Luego, cada fila de píxeles se lee desde la parte inferior del chip y se utiliza para reconstruir la imagen de la célula para su investigación mediante herramientas de software de análisis de imágenes. Está compuesto por 12 canales de detección divididos en dos cámaras CCD con 6 canales, cada una de las cuales permite la evaluación simultánea de hasta 12 marcadores e incluye una imagen microscópica de cada evento que se está analizando. La **principal ventaja** sobre la microscopía es **la profundidad de la caracterización, ya que se pueden analizar hasta 12 marcadores por células de forma simultánea**, permitiendo identificar colocalizaciones de diferentes proteínas e incluso identificación de amplificaciones genéticas, mediante hibridación fluorescente in situ (FISH). Esta opción **permite identificar el número y el tipo de diferentes subpoblaciones celulares de una forma totalmente automatizada**.

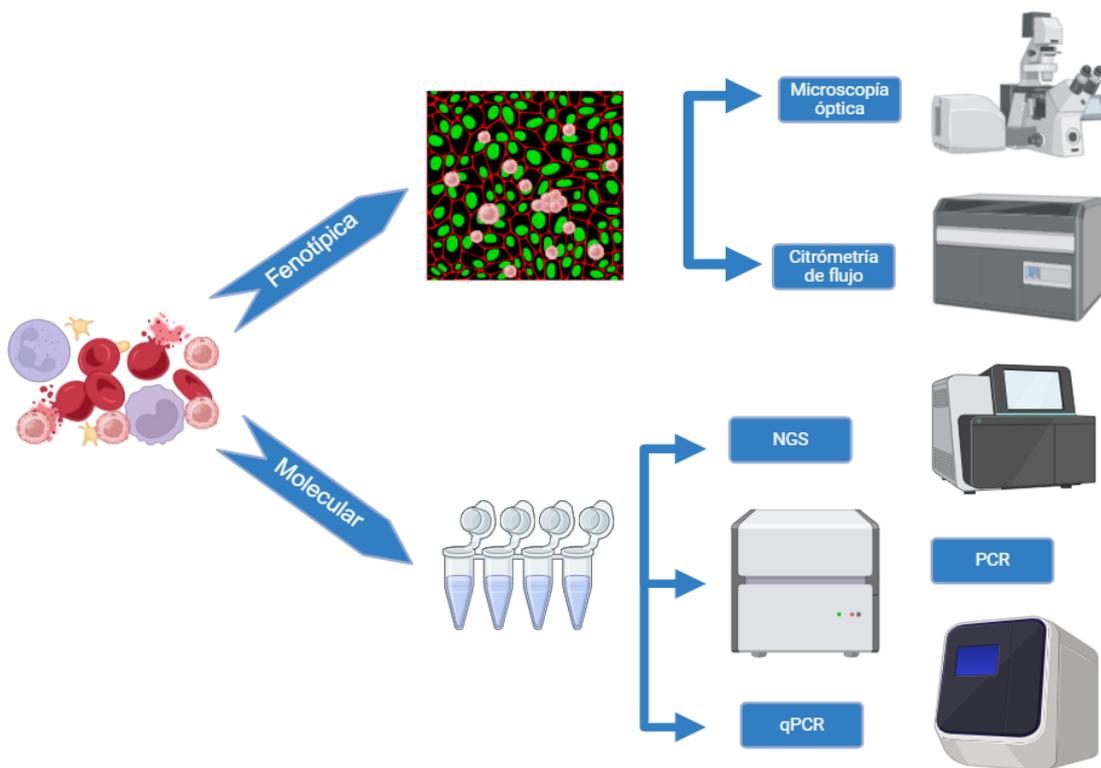


Figura 4: Caracterización celular de CTCs.

### A3.2.2. ADN tumoral circulante (ctDNA)

Inicialmente descrito por Mandel y Metais en 1948 (124), el **cfDNA se refiere al ADN fragmentado encontrado en el componente libre de células de la sangre total**. El vertido del ADN al torrente sanguíneo se produce tanto por parte de las células normales como por parte de las células tumorales liberándose a la circulación a través de procesos activos y pasivos. Normalmente, el cfDNA está fragmentado y tiene una medida entre 160 y 200 pares de bases, correspondiendo al ADN asociado a los nucleosomas. La longitud de las hebras de cfDNA sugiere que el ADN se libera al torrente sanguíneo a través de la muerte celular; sin embargo, los mecanismos exactos aún deben ser aclarados (125). Aunque también se ha identificado cfDNA en otros fluidos corporales como la orina, el líquido cefalorraquídeo, el líquido pleural y la saliva, esta tesis se centra en el cfDNA detectado en la sangre.

En individuos sanos, se entiende que el cfDNA es principalmente de origen hematopoyético y generalmente se encuentra en niveles bajos (aproximadamente 1-10 ng/mL de plasma), con variaciones diurnas (126). La eliminación del cfDNA, que ocurre

principalmente en el hígado, es rápida y su vida media es corta: 2.5 horas o menos (127). Los niveles observados de cfDNA varían; los pacientes con cáncer pueden tener niveles de 5 a 10 veces superiores a los de individuos sanos. Numerosas condiciones además del cáncer pueden elevar los niveles de cfDNA, como son los traumatismos, isquemia, infección, o inflamación. **Existe evidencia de que una proporción del cfDNA se origina desde el tumor (alrededor del 1%); esto se denomina ADN tumoral circulante (ctDNA, por sus siglas en inglés).** Los estudios de Stroun revelaron que los fragmentos de ctDNA procedentes del tumor albergan las mismas alteraciones genómicas somáticas que el tumor de un paciente (128). Desde entonces, se han detectado ctDNA en una variedad de tumores sólidos, con fracciones de ctDNA que van desde menos del 0.1% hasta más del 50%. Curiosamente, los **fragmentos de ADN derivados del tumor parecen ser más pequeños**, aproximadamente 143 a 145 pares de bases (compatible con el tamaño de un mononucleosoma sin unión) (129), que la distribución normal del tamaño de fragmentos de cfDNA no tumorales, que muestra un pico alrededor de 166 pares de bases (el tamaño del ADN en un mononucleosoma con unión). Por lo tanto, los cambios genómicos, los marcadores epigenéticos y el tamaño del fragmento se pueden usar para detectar la presencia de ctDNA en la circulación e intuir el tejido de origen (130). A lo largo de los años, la utilidad clínica del ctDNA ha sido un área de investigación activa en oncología, y los métodos de detección mejorados han llevado a la amplia aplicabilidad del ctDNA como biomarcador en varios tipos de tumores y en diferentes etapas de la enfermedad, predominando en estadios avanzados.

El estudio de ctDNA en pacientes con cáncer ha proporcionado conocimiento no invasivo sobre alteraciones genéticas y epigenéticas, siendo relevante la cantidad y la integridad de estos fragmentos en el seguimiento de la progresión de la enfermedad, **usándose como biomarcador de recidiva metastásica precoz (131).** El análisis de ctDNA y cfDNA es rentable, aunque su **principal limitación es la posible ausencia de niveles detectables de ctDNA en las etapas iniciales, la falta de estandarización de los procedimientos para detectarlos, la contaminación con ADN de los leucocitos, la necesidad de un rápido procesamiento y la ausencia de estudios en cohortes de amplia muestra (111).** La calidad del ctDNA y el cfDNA es prioritaria. El ADN de alto peso molecular puede influir negativamente en el rendimiento de la biblioteca obtenida y en la calidad de la secuenciación posterior, por lo que es fundamental evaluar la distribución de la longitud de los fragmentos utilizando métodos automatizados de electroforesis.

Otro parámetro fundamental del análisis del cfDNA es el rendimiento del ADN. La mayoría contiene secuencias repetitivas como elementos intercalados cortos y largos (SINE y LINE respectivamente). Los segmentos ALU son fragmentos de ADN de aproximadamente 300 pares de bases, siendo los más repetidos del genoma humano y clasificándose dentro de los elementos SINE. La cuantificación y valoración mediante qPCR de estos elementos se usa comúnmente para determinar las concentraciones e integridad del cfDNA.

La integridad del cfDNA se define como la proporción de repeticiones ALU largas respecto a cortas o la totalidad de repeticiones ALU. Por tanto, la integridad representa la relación entre el ADN derivado de células tumorales y el ADN derivado de células normales propias de su apoptosis natural. Esto se debe a que el cfDNA liberado de las células apoptóticas de forma natural consta de fragmentos de ADN pequeños (160-250 pares de bases (pb) uniformemente truncados, mientras que la necrosis de las células tumorales genera fragmentos de ADN también pequeños, menores de 200 pb, pero no truncados uniformemente (132).

#### **A3.2.1.1 Metodología de aislamiento y caracterización de ctDNA**

Existe una creciente demanda de tecnologías estandarizadas y de alto rendimiento para el aislamiento de cfDNA y ctDNA. En este contexto, los sistemas automatizados son fundamentales para ofrecer resultados reproducibles y consistentes, además de facilitar la integración de los marcadores de cfDNA y ctDNA en la práctica clínica habitual. El alto grado de automatización, el rápido procesamiento y el reducido tiempo de manipulación que proporcionan los kits de aislamiento basados en perlas magnéticas los convierten en el método preferido en las rutinas clínicas, por encima de las técnicas basadas en membranas de sílice.

Aunque teóricamente los métodos basados en membranas de sílice pueden lograr mayores rendimientos de cfDNA total y ctDNA, estudios comparativos han demostrado que los kits automatizados para el aislamiento de cfDNA alcanzan rendimientos equivalentes a los obtenidos con métodos basados en membranas de sílice. Estos estudios han destacado que, en términos de cantidad de cfDNA, el kit Maxwell produjo rendimientos iguales o incluso superiores a los generados por los kits manuales que actualmente se consideran el Gold Standard (133)(134)(135).

En este contexto, Lehle comparó dos plataformas automatizadas para el aislamiento de ctDNA y cfDNA como son el **EZ2®** (QIAGEN, Hilden, Alemania) y el **Maxwell® RSC**

(Promega, Walldorf, Alemania). De estas plataformas, el EZ2® mostró mejores resultados en términos de rendimiento de cfDNA y ADN mitocondrial (mtDNA), mientras que el Maxwell® RSC fue superior en el aislamiento de fragmentos cortos, resultando más útil para la detección de ctDNA (132).

En relación con la determinación de variantes en ctDNA, existen diversas plataformas para su análisis como herramientas para la detección del cáncer; algunas de ellas ya están integradas en la práctica clínica. Entre los ejemplos más destacados se encuentran los ensayos de secuenciación de corrección de errores específicos (TEC-Seq®) y CancerSEEK® multiplex PCR (mPCR). TEC-Seq® es una plataforma basada en NGS que utiliza una tecnología de enriquecimiento de captura e hibridación de 81 kbp y estrategias de control de errores para detectar mutaciones de baja frecuencia, mientras que CancerSEEK® combina tecnología NGS de cfDNA además de información de biomarcadores proteicos (136).

En un estudio que empleó la plataforma TEC-Seq® con 200 pacientes que presentaban diferentes tumores sólidos en estadio I a II (cáncer colorrectal, de mama, de pulmón o de ovario), Phallen detectó mutaciones somáticas en cfDNA en el 71 %, 59 %, 59 % y 68 % de los casos, respectivamente, con una alta concordancia entre los resultados de la biopsia líquida y la biopsia tisular (136).

CancerSEEK® fue evaluado en un estudio con 1005 pacientes que presentaban cánceres en etapas I a III de ocho tipos de tumores comunes (ovario, hígado, estómago, páncreas, esófago, colorrectal, pulmón y mama). Las pruebas CancerSEEK® arrojaron resultados positivos en una mediana del 70 %, con un rango de sensibilidad del 69 % al 98 % para la detección de cinco tipos de cáncer (ovario, hígado, estómago, páncreas y esófago), y una especificidad superior al 99 % (137). Esta plataforma también se utilizó en combinación, como en el estudio DETECT-A, que integró el uso de PET-TC para aumentar la posibilidad de cirugía curativa en pacientes con niveles elevados de ctDNA en sangre periférica (138).

En cuanto al CCR, se desarrolló un modelo de diagnóstico basado en nueve marcadores de metilación de cfDNA seleccionados, el cual permitió discriminar con precisión a pacientes con cáncer colorrectal de individuos sanos, con una sensibilidad y especificidad superiores al marcador tumoral comparado (antígeno carcinoembrionario). Además, se diseñó un modelo de predicción de pronóstico con un panel de cinco marcadores, que fue capaz de distinguir eficazmente a los pacientes con cáncer colorrectal según sus diferentes pronósticos. Por último, se identificó un único marcador

de metilación MYO1-G (*cg10673833*) en cfDNA, que demostró una alta sensibilidad (89,7 %) y especificidad (86,8 %) para la detección de cáncer colorrectal y lesiones precancerosas en una población de alto riesgo (139).

### **A3.3 Presente de la biopsia líquida en la práctica clínica**

En la actualidad, la biopsia líquida (BL) ha experimentado un notable auge en la práctica clínica, siendo empleada para diversos fines, incluyendo la detección temprana de recidivas, la evaluación pronóstica y la identificación de resistencias farmacológicas. Entre estos, la detección de resistencias a fármacos destaca como la aplicación más utilizada en la actualidad.

En el CCR, las CTCs pueden ser utilizadas para el diagnóstico de estadios precoces de CCR (140). Numerosos estudios han detectado distintos niveles de CTCs en estadios tempranos (I, II), como es el caso de Tsai (141), Bork (142) o Hinz (143), pero los resultados son inconcluyentes y dependen del protocolo de aislamiento utilizado.

Por otra parte, las CTCs se han considerado un potencial marcador de diagnóstico y pronóstico no invasivo para metástasis de CCR en múltiples estudios. Wu (144) clasificó las CTCs en 3 subgrupos dependiendo de la expresión de EpCAM (E-CTCs), el marcador mesenquimal vimentina (M-CTCs) o ambos marcadores expresados (E/M-CTCs). Sugirieron que la presencia de M-CTCs estaba relacionada con la presencia de metástasis en mayor medida que los otros grupos. Posteriormente, Zhong (145) confirmó lo expuesto por Wu, relacionando el tamaño del tumor, el estadio TNM, la invasión vascular y el valor del CEA con la presencia de M-CTCs.

Otra aplicación de las CTCs es la evaluación de PD-L1, molécula fundamental para el uso de inmunoterapia antiPD-L1. Raimondi (146) observaron **la expresión de PD-L1 en CTCs en pacientes con CCR metastásico refractarios a inmunoterapia**. Satelli (147) posteriormente describió que la presencia nuclear de PD-L1 estaba asociada a una menor supervivencia de la inmunoterapia.

El ctDNA se puede utilizar como marcador pronóstico para la recurrencia temprana. Los pacientes que presentan niveles elevados de ctDNA a los 30 días después de la cirugía tienen un pronóstico peor en comparación con aquellos que no los presentan (148). Además, los pacientes con niveles elevados de ctDNA antes de la cirugía también tienen

un peor pronóstico que aquellos con niveles bajos. De manera similar, los pacientes con niveles elevados de ctDNA después de la quimioterapia adyuvante comparten un pronóstico más desfavorable (149).

Church identificó la hipermetilación de la septina 9 (SEPT9) en el cfDNA como un biomarcador potencial para el riesgo de cáncer colorrectal (CCR) (150), el cual ha sido aprobado por la FDA como el primer test de cribado sanguíneo para CCR. Otra aplicación del ctDNA es su cuantificación tras los ciclos de quimioterapia en pacientes con estadio III. La presencia o aumento del ctDNA se correlacionó con una tasa de recurrencia a los 3 años del 70% (151). Además, el análisis del ctDNA permite determinar el estado mutacional de KRAS y BRAF V600E, lo cual es útil en pacientes metastásicos como marcador de resistencia a fármacos anti-EFGR (152), siendo esta la principal aplicación en la práctica clínica actual.

Los microRNAs pueden utilizarse como indicadores no invasivos para el diagnóstico precoz y el pronóstico. MiR-125a-3p y miR-320c están asociados con infiltración neural (153). MiR-17-92a y miR-19a se relacionan con la recurrencia en estadios tempranos (154). Niveles bajos de miR-99b-5p y miR-150-5p se asocian con estadios tempranos de CCR (155), mientras que niveles reducidos de miR-601 y miR-760 se correlacionan con la presencia de CCR o adenomas (156). La baja expresión de miR-548c-5p y miR-638 se asocia con CCR metastásico (157). Los microRNAs también están vinculados a perfiles de resistencia a fármacos, como el miR-208b, que se asocia a una disminución de la sensibilidad al oxaliplatino (158).

El papel de las plaquetas educadas por el tumor en el CCR aún no está completamente elucidado. Sin embargo, Yang demostró que los niveles de ARNm de TIMP1 (Inhibidor de metalopeptidasa 1) son mayores en plaquetas de pacientes con CCR en comparación con voluntarios sanos, sugiriendo su potencial utilidad como biomarcador diagnóstico (159), si bien, parece que su función fundamental es de mensajera y reguladora permitiendo la interacción entre las distintas subpoblaciones de CTCs.

**Las principales limitaciones de la aplicación de la BL con respecto a las CTCs y ctDNA son su dificultad de aislar y purificar**, ya que sus concentraciones son bajas en el componente sanguíneo. Además, existe una falta de metodología estándar y el uso de numerosos sistemas que dificultan la interrelación entre los distintos estudios.

#### **A3.4 Biopsia líquida y CCR. Nuevas metas. Intercepción del cáncer**

El futuro de la biopsia líquida es prometedor. Ya hemos comentado anteriormente sus ventajas y sus aplicaciones actuales, destacando la no invasividad comparada con la biopsia tumoral, y la posibilidad de monitorizar la progresión y resistencia tumoral en el tiempo. Sin embargo, el futuro más prometedor de la BL es en referencia al término “intercepción del cáncer”. En el campo del CCR, los estudios se enfocan en el paso previo a su desarrollo, es decir, diagnosticar precozmente la formación de estructuras polipoides que puedan progresar a cáncer por las distintas vías de la carcinogénesis comentadas antes y conocidas actualmente. Dentro de estas lesiones precursoras avanzadas de CCR destacan la presencia de lesiones adenomatosas o serradas mayores de 10 milímetros o con displasia de alto grado. Actualmente la forma de diagnóstico de estas es mediante pruebas de cribado como la sangre oculta en heces, conociéndose su alto porcentaje de falsos positivos, su baja sensibilidad para lesiones precursoras y su poca adherencia poblacional (30-40% de la población objetivo); pruebas invasivas como la colonoscopia, con los riesgos que supone este procedimiento y pruebas de imagen como el TC abdominopélvico o la colonoscopia virtual con su menor sensibilidad en comparación a las pruebas endoscópicas.

En este sentido, nuestro grupo lleva trabajando varios años, con la realización de un estudio innovador que combina la utilización de BL de sangre periférica, en este caso basado en la fragmentómica del ADN circulante y su comparación con la presencia constatada mediante colonoscopia de lesiones precursoras avanzadas de CCR, así como su histología en la pieza (patrón oro actual). El análisis de ctDNA y sus fragmentos permite intuir el origen tisular del mismo (160) y podría contribuir al desarrollo de un programa de detección precoz de lesiones precursoras o células cancerosas basadas en la biopsia líquida que ponga solución a los problemas anteriormente comentados.

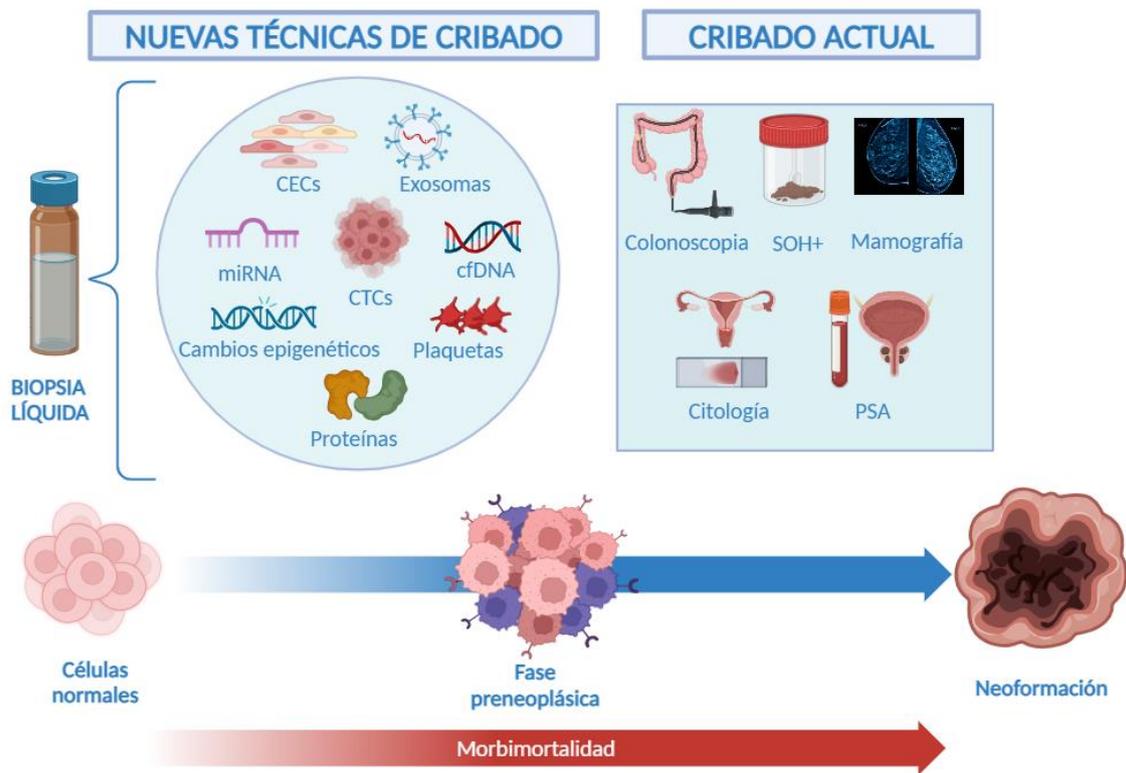


Figura 5: Papeles potenciales de la biopsia líquida en el "cancer interception". Adaptado de (111): Se describen los distintos tipos de BL: exosomas, microARN, cambios epigenéticos, metabolómica, CTCs y CECs y ADN comparándose con las estrategias actuales de cribado implantadas en la práctica clínica.

## B. METODOLOGÍA

### **B1. Diseño del estudio y criterios de inclusión y exclusión**

Estudio observacional prospectivo en el que se han incluido a pacientes diagnosticados de cáncer de colon no metastásico susceptibles de cirugía primaria en el **Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada entre marzo de 2019 y febrero de 2022**. Las muestras fueron analizadas en el **Centro Pfizer-Junta de Andalucía-Universidad de Granada de Genómica investigación Oncológica (Genyo)**. El transporte de las muestras desde el Hospital Clínico San Cecilio hasta el centro Genyo se realizó por personal miembro del estudio y con las medidas de seguridad, trazabilidad y anonimización adecuadas. Este proyecto ha seguido la normativa de protección bioética del protocolo de Helsinki. Dicho proyecto ha sido presentado al Comité Ético del Hospital del Hospital Universitario San Cecilio (Granada) con el código CPI-2017-11-SAS-4B aprobando el protocolo de estudio y todos los pacientes fueron informados presencialmente y firmaron el respectivo consentimiento informado antes de entrar en el estudio.

En estos pacientes se ha proyectado **un seguimiento de 2 años posterior a la intervención quirúrgica**. Los pacientes incluidos en el estudio se han dividido en 3 grupos de la siguiente forma:

- Grupo 1: pacientes en **estadio I-II** (sin ganglios linfáticos afectados) que serán sometidos a tratamiento quirúrgico con intención curativa en el Hospital Clínico San Cecilio de Granada y que no hayan recibido quimioterapia ni radioterapia previamente a la cirugía (neoadyuvancia).
- Grupo 2: pacientes en **estadio III** (ganglio/s linfático/s afectado/s) que serán sometidos a tratamiento quirúrgico con intención curativa en el Hospital Clínico San Cecilio de Granada y que no hayan recibido quimioterapia ni radioterapia previamente a la cirugía (neoadyuvancia).
- Grupo 3: pacientes **grupo control** (sanos) reclutados en el Centro de Salud de la Zubia, Granada.

Como **criterios de inclusión** se han definido:

- Pacientes grupo 1:
  - Pacientes mayores de 18 años.
  - Exclusión de afectación linfática peritumoral por técnica de imagen.
- Pacientes grupo 2:

- Pacientes mayores de 18 años.
- Identificación por técnicas de imagen de afectación linfática sin afectación metastásica a distancia.
- Pacientes grupo 3:
  - Pacientes mayores de 18 años.
  - Pacientes pertenecientes al Centro de Salud de la Zubia, Granada.

Como **criterios de exclusión** se han definido:

- **Paciente con neoplasia de recto.** De manera conceptual, se decidió excluir a los pacientes con cáncer de recto en el diseño del estudio, debido a la divergente ruta de diseminación venosa vascular que presenta en comparación con el cáncer de colon. En el caso del colon, el drenaje venoso es obligado a través de la vena porta hepática, lo que implica un paso hepático previo a la diseminación sistémica. Sin embargo, en el cáncer de recto, el drenaje venoso a través de los plexos venosos medio e inferior se realiza directamente hacia la vena ilíaca interna y posteriormente a la vena cava inferior, omitiendo así el paso hepático.

Pacientes grupo 1:

- Pacientes que no hayan firmado el consentimiento informado.
- Presencia de invasión linfática o a distancia.
- Presencia de patrón hereditario.

Pacientes grupo 2

- Pacientes que no hayan firmado el consentimiento informado.
- Pacientes con enfermedad metastásica diagnosticada por técnica de imagen o intraoperatoria.
- Presencia de patrón hereditario.

Pacientes grupo 3:

- Pacientes con patología neoplásica previa.

Para calcular el **tamaño muestral** nos hemos basado en la incidencia de casos de cáncer de colon en Andalucía, siendo ésta de 6.189 casos en 2019, teniendo en cuenta la incidencia en dicha fecha en el hospital clínico San Cecilio, y teniendo como objetivo obtener unos resultados a corto-medio plazo y un reclutamiento durante 24 meses, se recomendaba el siguiente tamaño muestral:

- Pacientes grupo 1 (n=40)  
Estadio I → n=20

Estadio II → n=20

- Pacientes grupo 2 (n=20)
- Pacientes grupo 3 (n=30)

Dicho **reclutamiento previsto tuvo que ser reducido** en 10 meses debido a la **pandemia covid-19** que impedía éticamente el desarrollo del estudio de forma completa, al sustituirse las consultas presenciales por telemáticas y establecerse el estado de alarma, impidiendo así la obtención de la 2<sup>o</sup> muestra (muestra postcirugía) en el hospital, siendo esta situación alargada en nuestro contexto epidemiológico debido a la gran afectación de la población granadina referente de nuestro hospital, en especial en la 2<sup>o</sup> y 3<sup>o</sup> ola epidemiológica de la pandemia.

Por lo tanto, finalmente el reclutamiento incluyó 31 casos entre los grupos I y II.

- Pacientes grupo 1 (N=23)  
Estadio I → n= 5  
Estadio II → n= 18
- Pacientes grupo 2 (N=8)  
Estadio III → n= 8
- Pacientes grupo 3 → N=30

## **B2. Origen de las muestras**

Las muestras biológicas fueron obtenidas de sangre periférica de pacientes del Hospital Universitario San Cecilio (Granada) tras la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario San Cecilio (Granada) (código: CPI-2017-11-SAS-4B).

## **B3. Análisis realizados**

### **B3.1 Determinaciones de Células Tumorales Circulantes (CTCs)**

El estudio se llevó a cabo en **dos fases: la fase I o ensayo piloto** que incluyó a 16 pacientes para el desarrollo y optimización del protocolo de aislamiento y caracterización de CTCs y **la fase II** que añadió una cohorte de validación de 31 pacientes, cuyas características clínico-patológicas son descritas en la sección de resultados además de validar el protocolo previo. El seguimiento clínico que incluía la determinación al mes de la cirugía se realizó sobre 21 pacientes, puesto que 7 de las 28 muestras iniciales no pudieron ser analizadas por problemas tanto metodológicos (mala calidad de la muestra) o clínicos (mal estado físico o rechazo del paciente).

En la fase I, se incluyeron pacientes con cáncer de colon temprano y 5 donantes sanos que firmaron los formularios de consentimiento informado. En la fase II, se incluyeron pacientes con cáncer de colon temprano y 30 donantes sanos que también firmaron los formularios de consentimiento informado. En la figura 6 se describe el algoritmo utilizado para el desarrollo de los análisis asociados a CTCs.

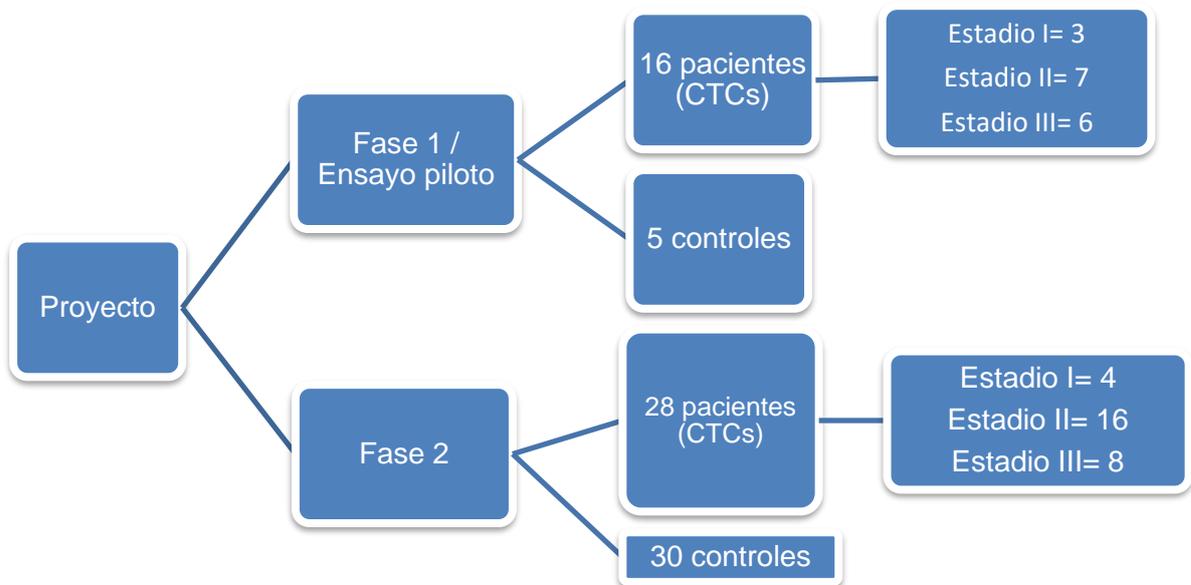


Figura 6: Diagrama que resume la extracción de CTCs en las 2 fases del estudio realizado (Fase 1 o ensayo piloto y Fase 2)

### B3.2 Determinaciones de ADN circulante tumoral (ctDNA)

En relación a la detección de ctDNA, **31 pacientes fueron incluidos en este análisis y el seguimiento fue realizado sobre 21** (extracciones basales y postcirugía).

El análisis de ctDNA se realizó extrayendo sangre periférica del paciente.

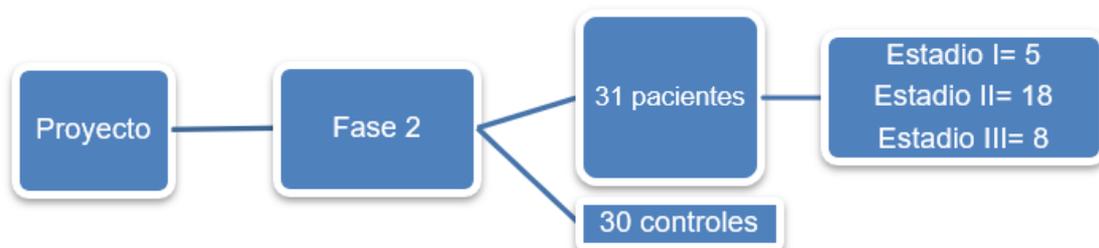


Figura 7: Diagrama que resume la extracción de ctDNA en la fase 2.

#### **B4. Extracciones**

Las extracciones para la determinación de incluían 3 tomas:

- **Toma basal (CTCs y cfDNA):** Extracción de sangre de vena periférica (**10 ml**) dos horas antes de la cirugía. Se han utilizado 5 ml para análisis de CTCs y 5 ml para análisis de ctDNA.
- **Toma postcirugía (CTCs y cfDNA):** se ha extraído una muestra de sangre periférica al mes después de la cirugía. Se ha extraído **10 ml** de sangre periférica, dedicando 5 ml para el análisis de CTCs y 5 ml para el análisis de ctDNA.

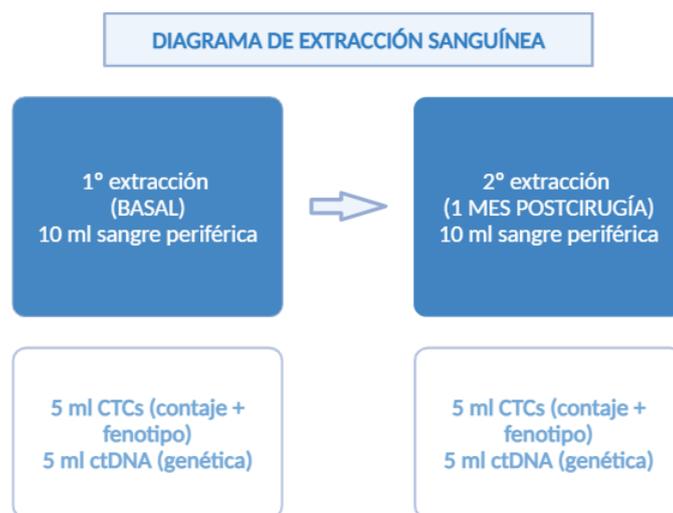


Figura 8: diagrama del proceso de extracciones sanguíneas

#### **B5. Desarrollo y validación de protocolo de aislamiento y purificación de CTCs**

En la prueba de concepto se realizó la optimización de protocolo que conforma los pasos de aislamiento y de detección de CTCs mediante la plataforma Isoflux® e ImageStream® respectivamente.

La prueba de concepto incluyó ensayos de especificidad y sensibilidad para ambas plataformas que implican los siguientes ensayos:

##### **B5.1 Ensayos de sensibilidad y especificidad para el proceso de aislamiento celular mediante Isoflux TM®**

Los ensayos incluyeron el uso de controles negativos y positivos:

- **Controles negativos:** incluyeron el uso de células hematopoyéticas aisladas de donantes sanos. Los controles negativos determinan la especificidad de la metodología, puesto que estas células son positivas para el anticuerpo anti-CD45 y negativas para el resto de los anticuerpos específicos del tumor.
- **Controles positivos:** que incluyeron el uso de líneas celulares de cáncer colorrectal humano, en concreto la HT-29 y SW480, que además incluían diferencias en la expresión del gen BRAF-V600, siendo la HT-29 positiva para BRAF-V600 y la SW480 negativa para este. Las líneas celulares fueron cultivadas usando Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 10 % de suero bovino fetal (FBS). Se evaluó la contaminación por micoplasma en las células y se confirmó la autenticidad de las células mediante técnicas "short tandem repeat" (STR).



Figura 9: Isoflux TM®.

Para evaluar la eficiencia del enriquecimiento de las células, se realizaron diluciones de 300 células cultivadas (HT-29 y SW480) en PBS (buffer de fosfato salino) por duplicado en IsoFluxTM®. Para garantizar un error mínimo en los recuentos de las líneas celulares, se diluyó 2-3 millones de células del cultivo de tejidos (en 3 ml de PBS 1x) a una dilución 1/100, y luego se analizó visualmente 5 µl de la dilución bajo el microscopio (ya que este volumen cubría el diámetro visual del objetivo 20x). Posteriormente, se agregó el volumen apropiado de la dilución 1/100 a un volumen total de 500 µL de PBS. Después del aislamiento de CTCs con el IsofluxTM®, las células recuperadas fijadas

con paraformaldehído se contaron manualmente en un microscopio de fluorescencia para la tinción con citoqueratina (anti-CK-FITC, 130-060-301) y se calculó la proporción de recuperación o aislamiento celular para cada línea celular.

## **B5.2 Ensayo de sensibilidad y especificidad del protocolo de detección y enumeración mediante citómetro de flujo de imagen multispectral (ImageStreamX®)**

La detección y enumeración de células tumorales tras el enriquecimiento se realizó con la plataforma ImageStream® (Luminex, Bélgica), un citómetro de flujo de imagen multispectral diseñado para el análisis de múltiples células. El protocolo para el análisis de CTCs envuelve los siguientes pasos. Para ello se realizó un análisis de sensibilidad y especificidad del protocolo de caracterización de las CTCs, acorde con el siguiente proceso:

### **B5.2.1 Determinación de la sensibilidad y especificidad del proceso:**

- **Desarrollo de la matriz de compensación:** Este proceso permite corregir el traslape del espectro de emisión entre los fluoróforos conjugados con los anticuerpos a utilizar, reduciendo la autofluorescencia y la posibilidad de obtener falsos positivos. La matriz se realizó usando unas partículas UltraComp eBeads™®, microesferas que contienen una mezcla de perlas de compensación positivas recubiertas con anticuerpos y perlas de compensación negativas no recubiertas, combinadas en un solo vial que permiten ajustar las intensidades de los diferentes láseres de ImageStreamX® (Luminex, Bélgica) para cada anticuerpo (Tabla 3). El uso de las microesferas se realizó acorde a las recomendaciones del fabricante y utilizando el programa Inspire.

Primario	Secundario	Fluoróforo	Dilución	Referencia	Marca	IsCH
Ratón IgG2a anti-cytokeratin 7/8	No	FITC	1/100	130-060-301	Miltenyi, Germany	2
Conejo monoclonal [K21-F] BRAF (mutatedV600E)	No	FITC	1/200	ab175637	Abcam, UK	2
Ratón monoclonal [CAM5.2] anti-human	No	PE-CF594	1/100	563615	BD, USA	4

cytokeratin (7/8)						
Núcleo	No	7-AAD	1/100	00-6993-50	Invitrogen, USA	5
Conejo polyclonal PD-L1	Cabra anti-conejo IgG	DyLight 405	1/100 1/100	PA5-28115 35551	Thermo Fisher, USA	7
Ratón monoclonal [2D1] anti-human CD45 APC CY7	No	APC-Cy7	1/100	557833	BD, USA	12

Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados en la caracterización fenotípicas de CTCs con ImageStreamX.

- Valoración y control de la titulación, nivel de expresión y localización de los anticuerpos usados:** las líneas celulares de cultivo HT29 y SW480, así como las células hematopoyéticas (PBMC) utilizadas como control negativo para la expresión de los Ac, se fijaron y permeabilizaron utilizando paraformaldehído al 1,7 % y Tritón al 0,2 %. Luego, se realizó el marcaje de anticuerpos para CK, BRAF V600E, PD-L1 y CD45 utilizando los anticuerpos de la anterior (Tabla 3) y 7-AAD (7-Aminoactinomicina D), utilizada para la tinción nuclear, durante 20 minutos a temperatura ambiente.



Figura 10: ImageStreamX®

Marcador	Fluoróforo	Canal
BRAF	FITC	2
CK	PE594	4
Núcleo	7AAD	5
PD-L1	Dylight-405	7
CD45	APC-Cy7	12

Tabla 4. Perfil fenotípico de las líneas celulares utilizadas para la valoración de los anticuerpos utilizados

### B5.2.2 Tasa de rendimiento del proceso para la recuperación de CTCs

La determinación de la tasa de recuperación de CTCs implicaba el desarrollo de controles positivos con las líneas celulares HT29 y SW480. Se realizaron mediciones con diluciones celulares de 20, 100, 200 y 1000 células de cáncer colorrectal fijadas con paraformaldehído y marcadas con anti-CK-FITC, que se añadieron a un número constante de 5000 leucocitos de un donante sano premarcados con anti-CD45-APC-Cy7. Los recuentos de células se llevaron a cabo como se describió anteriormente para los experimentos de control de IsoFluxTM®.

Finalmente, para determinar la eficiencia del protocolo con la combinación de ambas plataformas (IsofluxTM® e ImageStreamX®) se realizaron los siguientes ensayos:

- Para evaluar la eficiencia combinada de las dos plataformas, se agregaron experimentos duplicados con 300 células (SW480 o HT-29) en 5 ml de sangre periférica. Los recuentos de células se realizaron como se describió anteriormente para los experimentos de control IsoFluxTM®. Una vez añadido el volumen correspondiente a 300 células a los 5 ml de sangre total, se continuó con el protocolo establecido que implica como primer paso el tratamiento de la muestra con un tampón de lisis antes del enriquecimiento de CTCs en el IsoFluxTM® y la caracterización de CTCs en el ImageStreamX®.

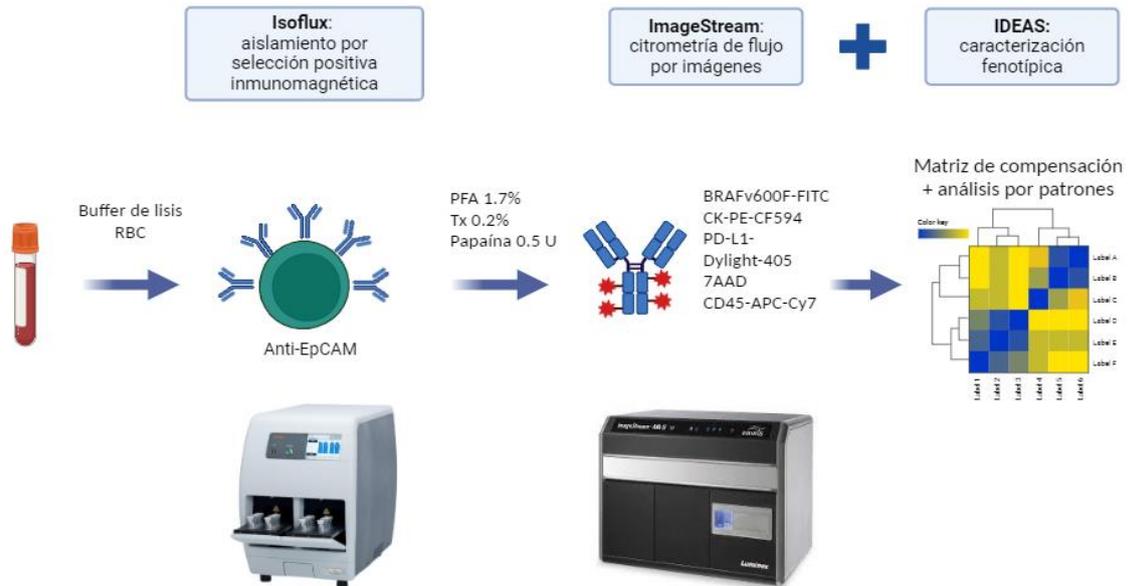


Figura 11: Protocolo de aislamiento, detección y caracterización de CTCs basado en la combinación de Isoflux™ e ImagestreamX® (desarrollado por el grupo Liquid Biopsy & Cancer Interception).

### B5.3 Ensayos con sangre periférica procedente de pacientes con cáncer de colon en estadio I-III

Se obtuvieron muestras de sangre periférica como ha sido anteriormente comentado en el epígrafe anterior y se procesaron en el laboratorio Liquid Biopsy and Cancer Interception (LB&CI) del centro GENyO (Granada) dentro de las 4 horas posteriores a la extracción. Las muestras se lisaron con solución de lisis de eritrocitos 1x (Miltenyi Biotec, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, el sedimento de células mononucleares se lavó con 1x PBS, se centrifugó a 300 G durante 10 minutos con desaceleración de velocidad moderada y se suspendió en 40  $\mu$ L de microesferas conjugadas con EpCAM prelavadas (Fluxion, Biosciences, Inc, Alameda, CA, EE. UU.). Las muestras se incubaron durante 2 horas a 4 °C en un agitador de rodillos para facilitar la unión con las microesferas magnéticas. Posteriormente, después de acondicionar y cebar los cartuchos de IsoFlux™ con un Binding Buffer (Fluxion, Biosciences, Inc, Alameda, CA, EE. UU.), las muestras se cargaron en el cartucho comentado para el aislamiento semiautomático de CTCs. Las CTCs aisladas se recuperaron del cartucho usando 50  $\mu$ L de "Binding Buffer" y se transfirieron a un tubo "Protein LoBind"

(Eppendorf, Alemania). Se realizó el tratamiento con una unidad de papaína (LK003176, Worthington, OH, EE. UU.) por muestra durante 20 minutos a 37 °C antes de la tinción celular para liberar los agregados de las células, lo que facilita su posterior caracterización mediante ImageStreamX®. Las células se fijaron y permeabilizaron utilizando paraformaldehído al 1,7 % y Tritón al 0,2 %. El proceso prosigue con el marcaje de anticuerpos para citoqueratina (CK), BRAFV600E, PD-L1 y CD45 utilizando los anticuerpos de la Tabla 3 y 7-AAD para conseguir la tinción nuclear, durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras marcadas con fluorescencia se analizaron en el citómetro de flujo ImageStreamX®. La plantilla de adquisición se generó utilizando las líneas celulares como controles, y las intensidades del láser fueron las siguientes: 10 mW para láser de 405 nm, 25 mW para láser de 488 nm, 20 mW para láser de 642 nm y 0,5 mW para láser de 785 nm. Las muestras se adquirieron a 60x con un caudal bajo, usando el software Inspire® v 200.1.681.0 (Versión Inspire 0.3.0). Cada archivo se analizó usando el software IDEAS® v 6.2 (Versión IDEAS 6.03.23).

## PROCESAMIENTO DE MUESTRAS (CTCs) EN GENYO

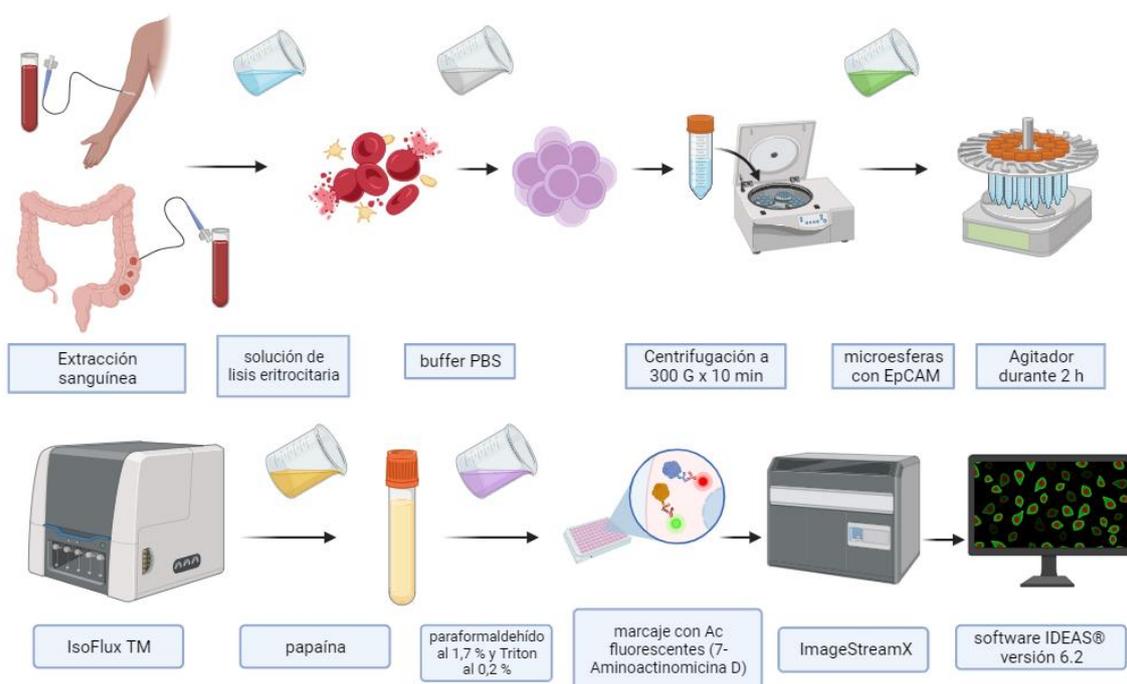


Figura 12: Protocolo de procesamiento de muestras (CTCs) en GENYO

## **B6. Protocolo de aislamiento y análisis de ctDNA**

### **B6.1 Extracción ADN tumoral circulante**

La extracción del ctDNA se realizó a partir de la **plataforma automatizada, Maxwell® RSC (Promega) utilizando el ccfDNA LV plasma kit.**

Este kit está concebido para la extracción de muestras de cfDNA a partir de sangre total extraída en tubos EDTA o tubos de recogida de muestras sanguíneas estabilizadas. En este trabajo todas las muestras fueron recogidas en tubos EDTA-K2. La muestra era procesada dentro de las 4 horas siguientes a su extracción y mantenida a temperatura ambiente.

El procesamiento de la muestra implica los siguientes pasos:

1. La muestra es sometida a dos centrifugaciones:
  - Una primera centrifugación a 1800G durante 10 minutos y se procede a su congelación a -80°C.
  - Una segunda centrifugación tras su descongelación a 16000 G durante 10 minutos. Esta segunda centrifugación permite la eliminación de los detritus que se hayan podido acumular, eliminando el sobrante de la muestra.
2. Una vez centrifugado se añaden 2 ml de plasma a un tubo de 15ml.
3. Se añade el mismo volumen de una solución tampón (Binding Buffer).
4. A continuación, se procede a la extracción del ADN, para ello, se usan las partículas magnéticas del kit Maxwell® (Resin E beads). Antes de usarlas hay que agitar el tubo que las contiene hasta que esté completamente resuspendido su contenido.
5. Se añade al tubo con la muestra y el Binding Buffer, 100 µl de Maxwell® Resin E Beads y se incuba durante 45 minutos a temperatura ambiente, usando el agitador rotativo, ya que permite que las perlas se mantengan en suspensión durante todo el tiempo de incubación y en contacto con la muestra.
6. Transcurrido este tiempo, se centrifugan los tubos durante 2 minutos a 1000G y se colocan los tubos en un soporte magnético para inmovilizar la resina.
7. Se retira el sobrenadante y se continúa con la purificación automática.

8. La purificación automática incluye la preparación del cartucho acorde con las recomendaciones de la casa comercial, tal y como se estipula en el [anexo 3](#).



Figura 13: Maxwell RSC48. Plataforma de extracción automática de ácido nucléico (Automated Nucleic Acid Extraction Platform).

### B6.2 Cuantificación y perfil de integridad del ADN circulante tumoral

La cuantificación y análisis de la integridad de las muestras requirió el uso de diferentes plataformas que incluyeron: El equipo **Qubit®** y el **Bioanalyzer Agilent 1000®**. Para la determinación de la integridad se utilizó la plataforma **TapeStation®**. Se desarrollaron las siguientes fases:

- **Cuantificación por Qubit®:** El fluorómetro Qubit® es un dispositivo diseñado para medir señales de fluorescencia en muestras y opera correlacionando estas señales con concentraciones conocidas de sondas. Este proceso le permite transformar los datos de fluorescencia en una medición cuantificada de la concentración. El dispositivo utiliza esta relación establecida para determinar con precisión la concentración de una muestra. No se necesita hacer una recta patrón, sino que el propio aparato calcula la concentración e integridad utilizando dos estándares y un algoritmo matemático, lo que minimiza el error introducido por el pipeteo. El protocolo implicó los siguientes pasos:
  1. Se calibra el equipo con una solución blanca.
  2. En 2 microlitros de muestra se añade a 195 microlitros de solución Qubit.
  3. Se anota la concentración y la calidad del material.



Figura 14: Sistema de cuantificación flurimétrica Qubit®

- **Cuantificación y análisis de fragmentos mediante la plataforma TapeStation® 4200:**

El estudio de los fragmentos del cfDNA se llevó a cabo mediante el TapeStation System (Agilent) que se basa en una electroforesis automatizada para el control de calidad de muestras de DNA, desarrollado por la casa comercial Agilent, que permite analizar el tamaño, la cantidad y la integridad de las muestras, además de detectar contaminaciones de DNA de alto peso molecular. En este caso, se utilizó el instrumento **4200 TapeStation junto con el kit específico para ANDIc Cell-free DNA ScreenTape**. En primer lugar, se equilibraron los reactivos, guardados entre 2-8°C, a la temperatura ambiente del laboratorio durante aproximadamente 30 minutos, y se homogeneizaron antes de su uso. Una vez listos los reactivos, se preparó en un pocillo de la tira de tubos 2µL de Cell-free DNA Sample Buffer junto con 2µL de Cell-free DNA Ladder, el cual servirá como control del patrón de bandas durante la electroforesis. Posteriormente, se llevó a cabo el mismo procedimiento con las muestras de DNA; de manera que se pipetearon 2µL de Cell-free DNA Sample Buffer y 2µL de muestra por pocillo. Previo a su introducción en el instrumento 4200 TapeStation®, se le administró a la tira de tubos con el Ladder y las muestras un giro en remolino de aproximadamente un minuto.



Figura 15: Sistema automatizado de electroforesis TapeStation®

## PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE ctDNA

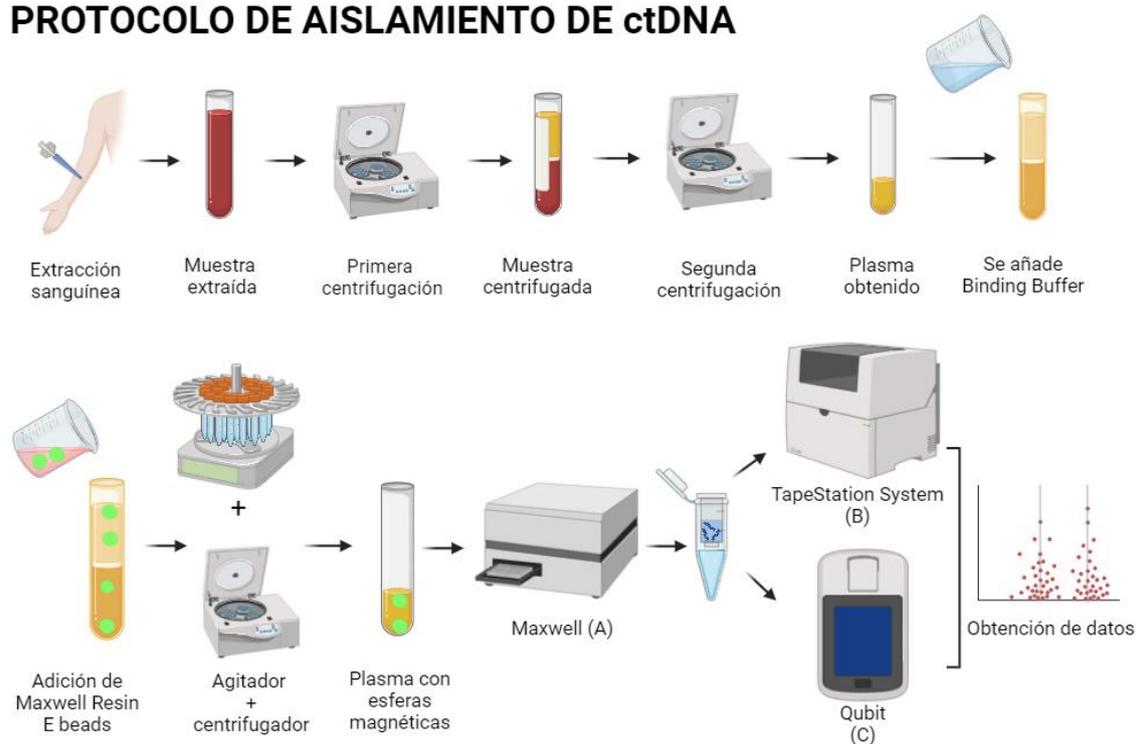


Figura 16: Resumen del protocolo para el aislamiento, cuantificación y análisis de fragmentos del ctDNA. A (Maxwell). B (TapeStation System). C (Qubit)

### **B7. Estudio estadístico**

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de las variables recogidas en el estudio. Para las variables numéricas, se calcularon medidas de tendencia central (media, mediana) y dispersión (desviación estándar, rango intercuartílico). Las variables cualitativas se resumieron utilizando frecuencias absolutas y relativas (porcentajes). Se empleó el test de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de las variables continuas.

### **Comparación entre grupos:**

Para contrastar las diferencias en las variables cuantitativas entre el grupo que mostró positividad para CTCs al final del seguimiento y el que no, se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney, debido a la posible no normalidad de las distribuciones.

Para las variables categóricas, la comparación entre grupos se llevó a cabo con el test exacto de Fisher, ya que es adecuado para tamaños muestrales pequeños y tablas de contingencia con frecuencias bajas.

### **Asociación de variables:**

Se evaluó la asociación de las variables independientes con la positividad de CTCs al final del seguimiento mediante el cálculo de las correspondientes Odds Ratios (OR) crudas. Para cada OR, se obtuvieron intervalos de confianza (IC) del 95% con el fin de evaluar la precisión de las estimaciones.

### **Análisis del ctDNA:**

Para comparar la concentración de ctDNA entre dos grupos, se utilizó el test de Mann-Whitney.

En el caso de las comparaciones de medidas basales con respecto a las del seguimiento en el mismo grupo, se utilizó el test de Wilcoxon para muestras pareadas.

Para comparar la concentración de ctDNA en más de dos grupos, se empleó el test de Kruskal-Wallis, que es la alternativa no paramétrica al ANOVA cuando no se cumple la suposición de normalidad.

Los cálculos se han realizado con el programa estadístico **STATA versión 16**.

## C. RESULTADOS

### PARTE A

#### ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL ESTUDIO FASE II

##### 1. Estudio de las características clínico-patológicas de los pacientes donde se analizaron CTCs y ctDNA (n=28)

En esta primera parte describiremos las características clínico-patológicas de los pacientes donde se pudo obtener y analizar las muestras de CTCs y ctDNA (28 pacientes).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO	TOTAL N=28	FEMENINO N=12 (42.86%)	MASCULINO N=16 (57.14%)
EDAD (años)	67.82 (±11.39)	65.00 (±11.82)	69.94 (±10.96)
RECAÍDA			
- No	25 (89.3%)	10 (83.3%)	15 (93.8%)
- Sí	3 (10.7%)	2 (16.7%)	1 (6.3%)
TIPO RECAÍDA			
- Local	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- Metástasis	3 (11.1%)	2 (17.7%)	1 (6.2%)
- Ausencia	25 (89.3%)	10 (83.3%)	15 (93.8%)
EXITUS			
- No	24 (85.7%)	10 (83.3%)	14 (87.5%)
- Sí	4 (14.3%)	2 (16.7%)	2 (12.5%)
ANTECEDENTES DE PÓLIPOS			
- No	18 (64.3%)	11 (91.7%)	7 (43.8%)
- Sí	10 (35.7%)	1 (8.3%)	9 (56.3%)
ADENOMAS POSTERIORES			
- No	15 (75.0%)	6 (66.7%)	9 (81.8%)
- Sí	5 (25.0%)	3 (33.3%)	2 (18.2%)
- Ausencia de colonoscopia posterior	8	3	5
DISPLASIA DE LOS ADENOMAS			
- Negativo	15 (75.0%)	6 (66.7%)	9 (81.8%)

- Bajo	5 (25.0%)	3 (33.3%)	2 (18.2%)
<b>LOCALIZACIÓN</b>			
- Izquierda	16 (57.1%)	6 (50.0%)	10 (62.5%)
- Derecha	12 (42.9%)	6 (50.0%)	6 (37.5%)
<b>ESTADIO</b>			
- I-IIC	20 (71.4%)	10 (83.3%)	10 (62.5%)
- IIIA-IIIC	8 (28.6%)	2 (16.7%)	6 (37.5%)
<b>QUIMIOTERAPIA POSTCIRUGÍA</b>			
- No	22 (78.6%)	10 (83.3%)	12 (75.0%)
- Sí	6 (21.4%)	2 (16.7%)	4 (25.0%)
<b>AP PIEZA QUIRÚRGICA</b>			
- Bien diferenciado	8 (28.6%)	4 (33.3%)	4 (25.0%)
- Moderadamente diferenciado	18 (64.3%)	8 (66.6%)	10 (62.5%)
- Pobremente diferenciado	2 (7.1%)	0 (0.0%)	2 (12.5%)
<b>TNM</b>			
- T1N0	2 (7.1%)	1 (8.3%)	1 (6.3%)
- T2N0	4 (14.3%)	1 (8.3%)	3 (18.8%)
- T3N0	14 (50.0%)	8 (66.7%)	6 (37.5%)
- T3N1	4 (14.3%)	0 (0.0%)	4 (25.0%)
- T3N2A	4 (14.3%)	2 (16.7%)	2 (12.5%)
<b>TUMOR SINCRÓNICO</b>			
- No	27 (96.4%)	12 (100.0%)	15 (93.8%)
- Sí	1 (3.6%)	0 (0.0%)	1 (6.3%)
<b>TUMOR ESTENÓTICO</b>			
- No	19 (67.9%)	8 (66.7%)	11 (68.8%)
- Sí	9 (32.1%)	4 (33.3%)	5 (31.3%)
<b>AFECTACIÓN LINFÁTICA</b>			
- No	20 (71.4%)	10 (83.3%)	10 (62.5%)
- Sí	8 (28.6%)	2 (16.7%)	6 (37.5%)
<b>BUDDING</b>			
- No	17 (60.7%)	6 (50.0%)	11 (68.7%)
- Sí	10 (35.7%)	6 (50.0%)	4 (25.0%)
- Indeterminado	1 (3.6%)	0 (0.0%)	1 (6.25%)
<b>TABACO</b>			
- No	16 (57.1%)	12 (100.0%)	4 (25.0%)
- Exfumador	9 (32.2%)	0 (0.0%)	9 (56.2%)

- Fumador	3 (10.7%)	0 (0.0%)	3 (18.8%)
<b>CONSUMO CARNE</b>			
- No	3 (10.7%)	2 (16.7%)	1 (6.3%)
- Sí	25 (89.3%)	10 (83.3%)	15 (93.8%)
<b>OBESIDAD</b>			
- No	9 (32.1%)	3 (25.0%)	6 (37.5%)
- Sobrepeso	8 (28.6%)	4 (33.3%)	4 (25.0%)
- Obesidad	11 (39.3%)	5 (41.7%)	6 (37.5%)
<b>DIABETES</b>			
- No	18 (64.3%)	8 (66.7%)	10 (62.5%)
- Insulinodepen	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- No insulinod	10 (35.7%)	4 (33.3%)	6 (37.5%)
<b>EJERCICIO</b>			
- No	12 (42.9%)	6 (50.0%)	6 (37.5%)
- Infrecuente	4 (14.3%)	2 (16.7%)	2 (12.5%)
- Frecuente	12 (42.9%)	4 (33.3%)	8 (50.0%)
- Muy frecuente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>INMUNOSUPRESIÓN</b>			
- No	25 (89.3%)	12 (100.0%)	13 (81.3%)
- Tópico	2 (7.1%)	0 (0.0%)	2 (12.5%)
- Oral	1 (3.6%)	0 (0.0%)	1 (6.3%)
<b>ANTECEDENTES FAMILIARES DE CCR</b>			
- No	23 (82.1%)	11 (91.7%)	12 (75.0%)
- Sí	5 (17.9%)	1 (8.3%)	4 (25.0%)
<b>INESTABILIDAD MICROSATÉLITES</b>			
- Estable	24 (85.7%)	10 (83.3%)	14 (87.5%)
- No Estable	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- Indeterminado	4 (14.3%)	2 (16.7%)	2 (12.5%)

Tabla 5: Características clínicas de los pacientes del estudio donde se analizaron CTCs y ctDNA: Las abreviaturas son: AP: pieza de anatomía patológica; TNM: sistema de clasificación de extensión T: Tumor, N: Node, M: Metastasis; No insulinod: no insulinodependiente. *Se consideró una persona exfumadora cuando no ha consumido tabaco en el último año. Se clasificó como consumo de carne roja de riesgo cuando ingirió más de 500 gramos de carne roja semanalmente. Se ordenó como sobrepeso un IMC entre 25 y 30. Se agrupó como obesidad un IMC (índice de masa corporal) >30. Se dividió la variable ejercicio entre infrecuente (menos de 1 hora de camino diaria durante 3 días a la semana; frecuente (1 hora de camino diaria de 3 a 5 días de la semana) y muy frecuente (mayor de 1 hora de camino diaria durante al menos 5 días de la semana). Se consideró inmunosupresión la toma de fármacos biológicos, inmunosupresores o toma de*

fármacos corticoesteroides. Se incluyó como antecedentes familiares de CCR la presencia de al menos 1 familiar de 1º grado con antecedentes de desarrollo de CCR.

A continuación, desglosaremos los apartados, para facilitar la lectura.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
EDAD (años)	67.82 (±11.39)	65.00 (±11.82)	69.94 (±10.96)

La cohorte a estudio incluyó 28 pacientes, de los cuales 12 (42.86%) tenían sexo femenino y 16 (57.14%) sexo masculino.

La **edad media** de los individuos del estudio fue de **67.82 ± 11.39 años**, siendo el paciente de menor edad de 43 años y el paciente de mayor edad de 84 años. Separando por sexo, las mujeres tenían una edad ligeramente menor 65 ± 11.82 años que los hombres 69.94 ± 10.96 años.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO RECAÍDA	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
- No	25 (89.3%)	10 (83.3%)	15 (93.8%)
- Sí	3 (10.7%)	2 (16.7%)	1 (6.3%)
TIPO RECAÍDA			
- Local	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- Metástasis	3 (11.1%)	2 (17.7%)	1 (6.2%)
- Ausencia	25 (89.3%)	10 (83.3%)	15 (93.8%)
EXITUS			
- No	24 (85.7%)	10 (83.3%)	14 (87.5%)
- Sí	4 (14.3%)	2 (16.7%)	2 (12.5%)

La **mayoría** de los pacientes (89.3%) **no experimentaron recidiva tumoral**. De los pacientes que experimentaron recidiva (10.7%), la frecuencia fue mayor en mujeres (16.7%) que en hombres (6.3%). Todos **los casos de recidiva** se presentaron en forma de **metástasis**. No se registraron casos de recidiva local en la cohorte analizada.

**Cuatro** (14.3%) pacientes **fallecieron** durante el estudio, de los cuales hubo más porcentaje de mujeres fallecidas (16.7%) que de hombres fallecidos (12.5%). Del total

de los 4 exitus durante el estudio, 2 de ellos se debió a progresión tumoral, 1 de ellos a enfermedad por Covid-19 y otro falleció por motivo desconocido.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
<b>ANTECEDENTES DE PÓLIPOS</b>			
- No	18 (64.3%)	11 (91.7%)	7 (43.8%)
- Sí	10 (35.7%)	1 (8.3%)	9 (56.3%)
<b>ADENOMAS POSTERIORES</b>			
- No	15 (75.0%)	6 (66.7%)	9 (81.8%)
- Sí	5 (25.0%)	3 (33.3%)	2 (18.2%)
- Ausencia de colonoscopia posterior	8	3	5
<b>DISPLASIA DE LOS ADENOMAS</b>			
- Bajo	5 (100.0%)	3 (60%)	2 (40%)
- Alto	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

En 10 (35.7%) pacientes se **encontraron pólipos adenomatosos en colonoscopias previas** en la cohorte de estudio, destacando una diferencia marcada entre sexos, encontrándose 1 (8.3%) antecedente de adenoma en mujeres en comparación con 9 (56.3%) antecedentes de adenomas en hombres.

En cuanto a la presencia de **adenomas en colonoscopias posteriores a la cirugía**, se encontró en un total de 5 (25%) pacientes en los que realizó la colonoscopia (en 8 pacientes no se hizo colonoscopia de control), siendo la frecuencia de adenomas mayor en **mujeres**, 3 (33.3%) que en hombres 2 (18.2%).

**Todas** las displasias de los adenomas de las colonoscopias posteriores a la cirugía fueron **displasia de bajo grado**.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS SEGÚN SEXO	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
<b>LOCALIZACIÓN</b>			
- Izquierda	16 (57.1%)	6 (50.0%)	10 (62.5%)
- Derecha	12 (42.9%)	6 (50.0%)	6 (37.5%)

La **mayoría** de los tumores en la cohorte **se localizaron en el lado izquierdo del colon**, representando el 57.1% de los casos en total y siendo menor en el caso de las mujeres (50%) que en el de los hombres (62.5%).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS SEGÚN SEXO	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
<b>TNM</b>			
- T1N0	2 (7.1%)	1 (8.3%)	1 (6.3%)
- T2N0	4 (14.3%)	1 (8.3%)	3 (18.8%)
- T3N0	14 (50.0%)	8 (66.7%)	6 (37.5%)
- T3N1	4 (14.3%)	0 (0.0%)	4 (25.0%)
- T3N2A	4 (14.3%)	2 (16.7%)	2 (12.5%)
<b>ESTADIO</b>			
- I-IIC	20 (71.4%)	10 (83.3%)	10 (62.5%)
- IIIA-IIIC	8 (28.6%)	2 (16.7%)	6 (37.5%)

La distribución según la clasificación TNM de la muestra nos indica que la mayoría de los pacientes se clasificaron en el **grupo T3N0, representando el 50.0%** de los casos en total, donde había más **mujeres** (66.7%) que hombres (37.5%). Le sigue en frecuencia con el mismo porcentaje de pacientes en los tres grupos, el grupo T2N0 [14.3% (mujeres 8.3%, hombres 18.8%)], T3N1 [14.3% (mujeres 0%, hombres 25%)] y T3N2A [14.3% (mujeres 16.7%, hombres 12.5%)]. Por último, el grupo T1N0 presentaba el menor número de pacientes [7.1% (mujeres 8.3%, hombres 6.3%)]. El resto de los subgrupos del TNM no fueron representados en la cohorte estudiada. La **mayoría de los pacientes se encontraban en un estadio entre I y IIC (71.4%)** con respecto a los estadios entre IIIA y IIIC (28.6%). El 83.3% de los casos en mujeres se encontraban en el estadio I-IIC versus el 62.5% de hombres.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
<b>AP PIEZA QUIRÚRGICA</b>			
- Bien diferenciado	8 (28.6%)	4 (33.3%)	4 (25.0%)
- Moderadamente diferenciado	18 (64.3%)	8 (66.6%)	10 (62.5%)
- Pobrementemente diferenciado	2 (7.1%)	0 (0.0%)	2 (12.5%)

El grueso de los casos presentaba **un grado de diferenciación moderadamente diferenciado** en la pieza quirúrgica, representando el 64.3% de los casos en total y **siendo la proporción similar en ambos sexos** (66.6% del sexo femenino versus 62.5% en el sexo masculino).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
QUIMIOTERAPIA POSTCIRUGÍA			
- No	22 (78.6%)	10 (83.3%)	12 (75.0%)
- Sí	6 (21.4%)	2 (16.7%)	4 (25.0%)

El 21.4% del total, **recibieron quimioterapia después de la cirugía**, siendo **menor la proporción de pacientes mujeres** (16.7%) que la recibieron versus la proporción de los pacientes hombres (25%) que la recibieron.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
TUMOR SINCRÓNICO			
- No	27 (96.4%)	12 (100.0%)	15 (93.8%)
- Sí	1 (3.6%)	0 (0.0%)	1 (6.3%)
ESTENÓTICO			
- No	19 (67.9%)	8 (66.7%)	11 (68.8%)
- Sí	9 (32.1%)	4 (33.3%)	5 (31.3%)
AFECCIÓN LINFÁTICA			
- No	20 (71.4%)	10 (83.3%)	10 (62.5%)
- Sí	8 (28.6%)	2 (16.7%)	6 (37.5%)
BUDDING			
- No	17 (60.7%)	6 (50.0%)	11 (68.7%)
- Sí	10 (35.7%)	6 (50.0%)	4 (25.0%)
- Indeterminado	1 (3.6%)	0 (0.0%)	1 (6.25%)

**Solo un paciente** de la cohorte (3.6%) presentó un **tumor sincrónico** siendo este paciente un **hombre** (6.3%). En cuanto a la presentación en forma de tumor estenótico, en 9 **(32.1%) se descubrió un tumor estenótico** al diagnóstico, siendo la afectación en ambos sexos similar, 4 (33.3%) en mujeres versus 5 (31.3%) en hombres.

El 28.6% del total de pacientes **presentaron afectación linfática**, siendo la afectación **menos frecuente en mujeres** (16.7%) que en hombres (37.5%).

El **35.7%** de los individuos de nuestra cohorte **tenían budding tumoral o gemación** en el análisis de la pieza quirúrgica. En el grupo de las **mujeres** fue más frecuente la presencia de budding (50.0%) que en los hombres (25.0%).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
<b>INESTABILIDAD MICROSATÉLITES</b>			
- Estable	24 (85.7%)	10 (83.3%)	14 (87.5%)
- No Estable	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- Indeterminado	4 (14.3%)	2 (16.7%)	2 (12.5%)

**Todos** los casos donde se determinó la inestabilidad de los microsatélites (24)  **fueron** clasificados como "**estable**".

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
<b>ANTECEDENTES FAMILIARES CCR</b>			
- No	23 (82.1%)	11 (91.7%)	12 (75.0%)
- Si	5 (17.9%)	1 (8.3%)	4 (25.0%)

Un **17.9%** de los pacientes tenía **antecedentes familiares de 1º grado de CCR**, siendo la frecuencia menor en mujeres (8.3%) que en **hombres** (25%).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO	TOTAL (n)	FEMENINO	MASCULINO
<b>TABACO</b>			
- No	16 (57.1%)	12 (100.0%)	4 (25.0%)
- Exfumador	9 (32.2%)	0 (0.0%)	9 (56.2%)
- Fumador	3 (10.7%)	0 (0.0%)	3 (18.8%)
<b>CONSUMO CARNE</b>			
- No	3 (10.7%)	2 (16.7%)	1 (6.3%)
- Sí	25 (89.3%)	10 (83.3%)	15 (93.8%)

<b>OBESIDAD</b>			
- No	9 (32.1%)	3 (25.0%)	6 (37.5%)
- Sobrepeso	8 (28.6%)	4 (33.3%)	4 (25.0%)
- Obesidad	11 (39.3%)	5 (41.7%)	6 (37.5%)
<b>DIABETES</b>			
- No	18 (64.3%)	8 (66.7%)	10 (62.5%)
- Insulinodepen	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- No insulinod	10 (35.7%)	4 (33.3%)	6 (37.5%)
<b>EJERCICIO</b>			
- No	12 (42.9%)	6 (50.0%)	6 (37.5%)
- Infrecuente	4 (14.3%)	2 (16.7%)	2 (12.5%)
- Frecuente	12 (42.9%)	4 (33.3%)	8 (50.0%)
- Muy frecuente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>INMUNOSUPRESIÓN</b>			
- No	25 (89.3%)	12 (100.0%)	13 (81.3%)
- Tópico	2 (7.1%)	0 (0.0%)	2 (12.5%)
- Oral	1 (3.6%)	0 (0.0%)	1 (6.3%)

En relación a los factores de riesgo modificables relacionados con el CCR:

Un total del 10.7% y 32.1% de la muestra fueron fumadores y exfumadores respectivamente. De los cuales, **ninguna mujer había fumado** nunca versus el 18.8% y 56.3% de los hombres que habían sido fumadores o exfumadores.

El grueso de la muestra, tanto mujeres como hombres, **realizaban un consumo de riesgo de carne roja** (89.3%) siendo discretamente **mayor** en el caso de los **hombres** (93.8%) frente al de las mujeres (83.3%).

El 67.9% de la cohorte presentó sobrepeso u **obesidad** (sobrepeso 28.6%, obesidad 39.3%), siendo la proporción mayor en el **sexo femenino** [75% (sobrepeso 33.3%, obesidad 41.7%)] que en el sexo masculino [62.5% (sobrepeso 25%, obesidad 37.5%)].

El **35.7%** de los individuos del estudio **tenían diabetes**, siendo diabetes **no insulinodependiente**. El porcentaje de diabetes era similar entre mujeres (33.3%) y hombres (37.5%).

La **mayor parte** de los pacientes de la cohorte **realizaban ejercicio físico** [57.4% (infrecuente 14.3%, frecuente 42.9%)]. La frecuencia de ejercicio varía entre los grupos si tenemos en cuenta el sexo. Las mujeres hacen menos ejercicio [50% (infrecuente 16.7%, frecuente 33.3%)] que los hombres [62.5% (infrecuente 12.5%, frecuente 50%)].

Ningún paciente realizó ejercicio muy frecuente (más de 1 hora de caminata durante más de 5 días a la semana).

El 10.7% de la muestra estaban bajo inmunosupresión (fármaco tópico 7.1%, fármaco oral 3.6%). Ninguna mujer estaba bajo tratamiento inmunosupresor versus el 18.7% (fármaco tópico 12.5%, fármaco oral 6.3%) de los hombres que sí lo estaban.

Las diferencias encontradas en los resultados de este estudio no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

El análisis multivariante de las características clínicas de los pacientes no obtuvo resultados relevantes.

## 2. Estudio de las características clínico-patológicas de los pacientes donde se analizaron exclusivamente ctDNA (n=3)

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE SEGÚN SEXO	TOTAL N=3	FEMENINO N=1 (33.3%)	MASCULINO N=2 (66.6%)
EDAD (años)	67.6 ( $\pm$ 11.4)	79	62
RECAÍDA			
- No	3 (100.0%)	1 (33.3%)	2 (66.6%)
- Sí	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
TIPO RECAÍDA			
- Local	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- Metástasis	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- Ausencia	3 (100.0%)	1 (33.3%)	2 (66.6%)
EXITUS			
- No	3 (100.0%)	1 (33.3%)	2 (66.6%)
- Sí	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ANTECEDENTES DE PÓLIPOS			
- No	2 (66.6%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)
- Sí	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (33.3%)
ADENOMAS POSTERIORES			
- No	2 (66.6%)	1 (100.0%)	1 (50.0%)
- Sí	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)

<b>DISPLASIA DE LOS ADENOMAS</b>			
- Negativo	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (50.0%)
- Baja	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)
<b>LOCALIZACIÓN</b>			
- Izquierda	2 (66.6%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
- Derecha	1 (33.3%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)
<b>ESTADIO</b>			
- I-IIC	3 (100.0%)	1 (100.0%)	2 (100.0%)
- IIIA-IIIC	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>QUIMIOTERAPIA POSTCIRUGÍA</b>			
- No	3 (100.0%)	1 (100.0%)	2 (100.0%)
- Sí	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>AP PIEZA QUIRÚRGICA</b>			
- Bien diferenciado	2 (66.6%)	1 (100.0%)	1 (50.0%)
- Moderadamente diferenciado	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)
- Pobremente diferenciado	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>TNM</b>			
- T1N0	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)
- T2N0	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- T3N0	2 (66.6%)	1 (100.0%)	1 (50.0%)
- T3N1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- T3N2A	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>TUMOR SINCRÓNICO</b>			
- No	3 (100.0%)	1 (100.0%)	2 (100.0%)
- Sí	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>TUMOR ESTENÓTICO</b>			
- No	3 (100.0%)	1 (100.0%)	2 (100.0%)
- Sí	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>AFECTACIÓN LINFÁTICA</b>			
- No	3 (100.0%)	1 (100.0%)	2 (100.0%)
- Sí	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>BUDDING</b>			
- No	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)
- Sí	2 (66.6%)	1 (100.0%)	1 (50.0%)
- Indeterminado			

<b>TABACO</b>			
- No	1 (33.3%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)
- Exfumador	2 (66.7%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
- Fumador	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>CONSUMO CARNE</b>			
- No	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- Sí	2 (66.6%)	1 (100.0%)	2 (100.0%)
<b>OBESIDAD</b>			
- No	1 (33.3%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)
- Sobrepeso	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)
- Obesidad	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)
<b>DIABETES</b>			
- No	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)
- Insulinodepen	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- No insulinod	2 (66.6%)	1 (100.0%)	1 (50.0%)
<b>EJERCICIO</b>			
- No	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)
- Infrecuente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- Frecuente	2 (66.6%)	1 (100.0%)	1 (50.0%)
- Muy frecuente			
<b>INMUNOSUPRESIÓN</b>			
- No	3 (100.0%)	1 (100.0%)	2 (100.0%)
- Tópico	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- Oral	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>ANTECEDENTES FAMILIARES DE CCR</b>			
- No	3 (100.0%)	1 (100.0%)	2 (100.0%)
- Sí	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<b>INESTABILIDAD MICROSATÉLITES</b>			
- Estable	3 (100.0%)	1 (100.0%)	2 (100.0%)
- No Estable	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
- Indeterminado	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

Tabla 6: Características clínicas de los pacientes del estudio donde se analizaron sólo ctDNA: Las abreviaturas son: AP: pieza de anatomía patológica; TNM: sistema de clasificación de extensión T: Tumor, N: Node, M: Metastasis; No insulinod: no insulinodependiente. *Se consideró una persona exfumadora cuando no ha consumido tabaco en el último año. Se clasificó como consumo de carne roja de riesgo cuando ingirió más de 500 gramos de carne roja semanalmente. Se ordenó como sobrepeso un IMC entre 25 y 30. Se agrupó como obesidad un IMC (índice de masa corporal)>30. Se dividió la variable ejercicio entre infrecuente (menos de 1 hora de camino diaria durante 3 días a la semana; frecuente (1 hora de camino diaria de 3 a 5 días de la semana)*

*y muy frecuente (mayor de 1 hora de camino diaria durante al menos 5 días de la semana). Se consideró inmunosupresión la toma de fármacos biológicos, inmunosupresores o toma de fármacos corticoesteroides. Se incluyó como antecedentes familiares de CCR la presencia de al menos 1 familiar de 1º grado con antecedentes de desarrollo de CCR.*

Partiendo de la base de que la muestra es pequeña (n=3), el **análisis descriptivo es similar** con respecto a la parte anterior donde se analizaron las características clínicas-patológicas de los pacientes donde se estudiaron las CTCs y ctDNA.

## PARTE B

### ESTUDIO DE LAS CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTCs)

#### B.1 Establecimiento del protocolo para aislamiento y caracterización de CTCs mediante la combinación de plataformas Isoflux™ e ImagestreamX® en el estudio Fase I (Ensayo piloto)

Este estudio de prueba de concepto fue aprobado por el Comité Ético (código: CPI-2017-11-SAS-4B) del Hospital Universitario San Cecilio e incluyó a **16 pacientes con cáncer de colon en estadio temprano y 5 donantes sanos** que firmaron formularios de consentimiento informado. Se extrajeron muestras de sangre periférica (5 ml) antes ( $n = 16$ ) y un mes después de la cirugía ( $n = 9$ ) y se procesaron en el laboratorio Liquid Biopsy and Cancer Interception (LB&CI) del centro GENyO dentro de las 4 horas posteriores a la extracción. Su objetivo fue poner a punto la tecnología y los protocolos que se iban a usar posteriormente en el estudio propuesto o fase II.

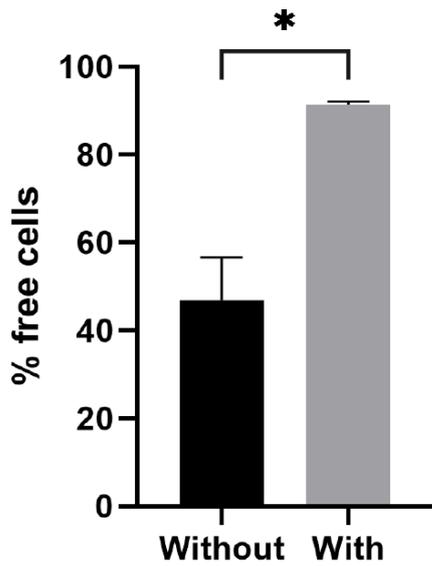
#### B1.1 Estudio y caracterización de CTCs

Las CTCs fueron identificadas mediante su expresión positiva de citoqueratina (CK) en todos los pacientes, y la ausencia de esta en todos los controles sanos, con una mediana de recuentos de CTCs de 37 células (Intervalo de Confianza [IC] 13,0–85,5). Entre los 16 pacientes con cáncer colorrectal (CC), al inicio del estudio (antes de la cirugía), el 31 % (5/16) presentaba  $\leq 20$  CTCs, el 44 % (7/16) tenía entre 21 y 100 CTCs, y el 25 % (4/16) tenía más de 100 CTCs (Figura 17A).

Además, se evaluó el área celular, encontrándose que las CTCs eran significativamente ( $p < 0,0001$ ) más grandes que las células CK negativas, independientemente de si estaban unidas a perlas magnéticas ( $129,3 \pm 36,6 \mu\text{m}^2$  y  $94,7 \pm 11,4 \mu\text{m}^2$ , respectivamente) o no ( $121,1 \pm 28,4 \mu\text{m}^2$  y  $76,5 \pm 28,1 \mu\text{m}^2$ , respectivamente) (Figura 17B).

La expresión de **CD45 en células CK negativas confirmó que estas eran leucocitos** (Figura 17B). Sin embargo, también se identificaron altos niveles de expresión de CD45 en células CK positivas en todos los pacientes. Específicamente, la expresión media de CD45 en CTCs fue del 88,4 % (rango 57,1-100) (Figura 18C).

A



B

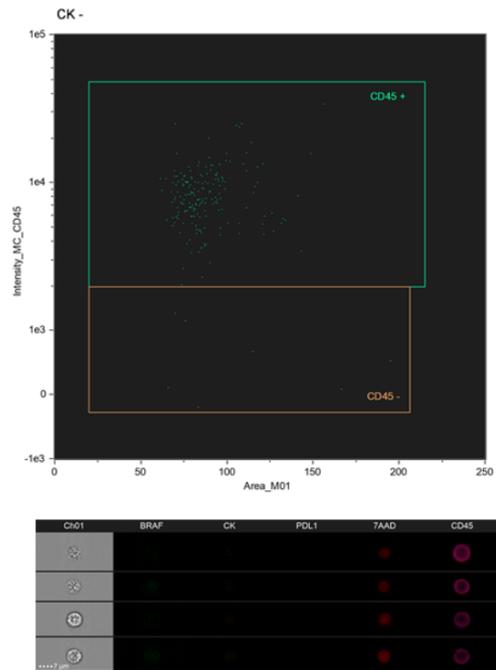
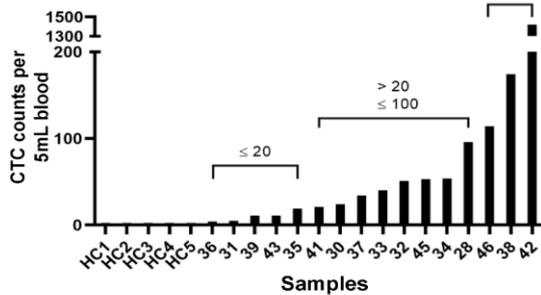
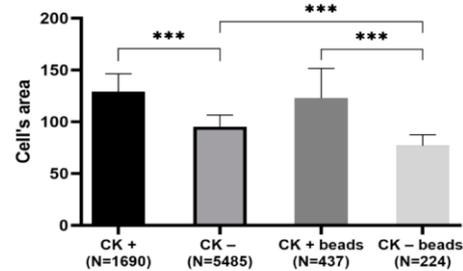


Figura 17 A y B: Optimización de protocolos. (A) Gráfico de barras que muestra el porcentaje de células libres de perlas positivas para citoqueratina sin el uso de papaína (negro) o con la adición de papaína (gris) para el desprendimiento de las células de las perlas. (B) Diagrama de dispersión que muestra los leucocitos identificados por la tinción de CD45+ en una población negativa para citoqueratina (CK).

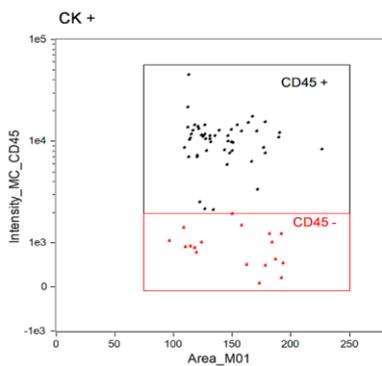
A



B



C



D

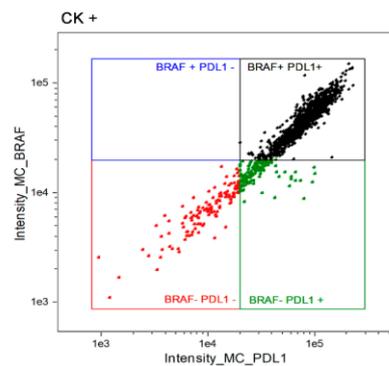


Figura 18 A,B,C,D: Recuento y caracterización de células tumorales circulantes (CTCs) basadas en la expresión de citoqueratina (CK). (A) Número de CTCs en 5 ml de sangre periférica (eje y) por paciente y controles sanos (HC), ordenados por recuentos crecientes de células (eje x). (B) Comparación del tamaño medio (en  $\mu\text{m}$ ) de las células en función de la expresión de CK en células individuales (CK+/CK-) o CTCs unidas a perlas (CK+ perlas/CK- perlas). El número de células utilizadas para calcular el tamaño medio se muestra entre paréntesis. (C) Ejemplo de diagrama de dispersión de la población CK+ de un paciente según la expresión de CD45. (D) Caracterización de CTCs basada en la expresión de BRAFV600E y PD-L1. \*\*\* El valor de p es <0,001 para la prueba ANOVA seguida de los análisis post hoc de Tukey.

Se identificó **heterogeneidad fenotípica** tanto intraindividual como interindividual en la expresión de BRAFV600E y PD-L1 dentro de la población de células CK positivas. Como resultado, se distinguieron cuatro subpoblaciones de células tumorales circulantes (CTCs) con diferentes frecuencias entre los pacientes (Figura 18D y Tabla 7).

Nº Paciente	CK + CTCs (n)	Clusters CTC (n)	BRAFV600 + PD-L1+ (%)	BRAFV600 - PD-L1+ (%)	BRAFV600 + PD-L1- (%)	BRAFV600 - PD-L1- (%)	Localización Nuclear de PD-L1
HC1	0	0	0	0	0	0	N/A
HC2	0	0	0	0	0	0	N/A
HC3	0	0	0	0	0	0	N/A
HC4	0	0	0	0	0	0	N/A
HC5	0	0	0	0	0	0	N/A
28	96	0	42.7	20.8	5.2	31.3	NO
30	51	0	5.9	0	62.8	31.4	NO
31	5	0	0	0	20	80	NO
32	40	0	2.5	2.5	25	70	NO
33	54	1	3.7	11.1	0	85.2	SI
34	34	0	29.4	11.8	26.5	32.4	SI
35	19	1	15.8	5.3	15.8	63.2	NO
36	4	0	0	25	0	75	NO
37	24	0	8.3	8.3	0	83.3	SI
38	174	7	73	0	0	27	SI
39	11	0	63.6	0	9.1	27.3	SI
41	21	0	9.5	19.1	0	71.4	NO
42	1421	92	72.1	11.8	0	16.1	SI
43	11	1	72.7	9.1	9.1	9.1	SI
45	53	0	86.8	0	11.3	1.9	SI
46	114	0	36.8	8.8	6.1	48.3	SI

Tabla 7: Resumen de pacientes con CCR temprano analizados para recuentos de CTC y subpoblaciones de CTC. N indica el número de células tumorales circulantes (CTC) o grupos de CTC por 5 ml de sangre periférica. Las abreviaturas son: Y, sí; N, no; N/A, no aplicable; y HC, control sano.

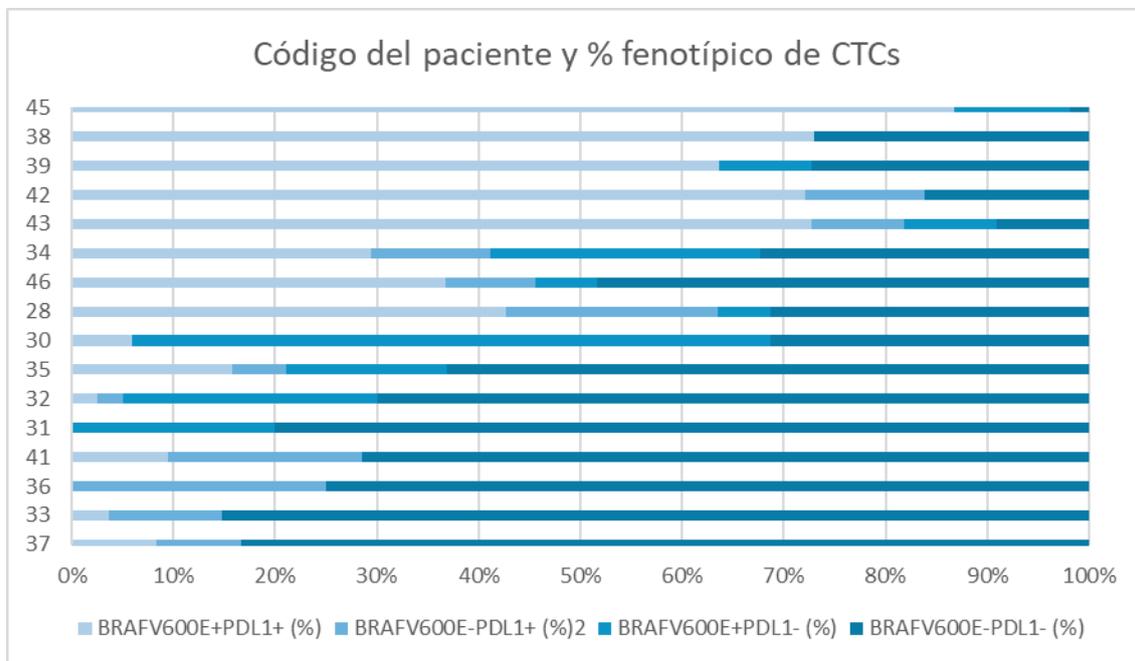


Figura 19: Relación entre pacientes y el porcentaje fenotípico de las poblaciones de CTCs. A la izquierda se muestra el número de código del paciente, mientras que en la parte inferior se presenta el porcentaje de la población de CTCs según su fenotipo.

Se detectó que la expresión de BRAFV600E, medida como intensidad de fluorescencia, estaba altamente correlacionada con la expresión de CK únicamente en la población BRAF+/PD-L1- ( $p=0,035$ ), mientras que la expresión de PD-L1 era independiente de CK o BRAFV600E en las cuatro subpoblaciones. No se encontró una correlación significativa ( $p=0,079$ ) entre las poblaciones BRAFV600E+/PD-L1- y BRAFV600E-/PD-L1+, lo que sugiere que la expresión de estos dos marcadores en CTCs es independiente. Sin embargo, se observó una correlación negativa significativa ( $p < 0,0001$ ) entre las poblaciones doblemente positivas (BRAFV600E+/PD-L1+) y doblemente negativas (BRAFV600E-/PD-L1-), lo que sugiere que estas subpoblaciones podrían servir como herramientas de clasificación.

De hecho, la subpoblación de CTC más frecuente fue la doble negativa (100%), seguida de la doble positiva (88%). Se encontró mayor variabilidad en las subpoblaciones con positividad única, las cuales se hallaron en el 69 % y el 63 % de los pacientes (para PD-

L1+ y BRAFV600E+, respectivamente). A partir de estos hallazgos, se pudieron establecer dos grupos principales según la doble positividad (BRAFV600E+/PD-L1+) y la doble negatividad (BRAFV600E-/PD-L1-) (Figura 20).

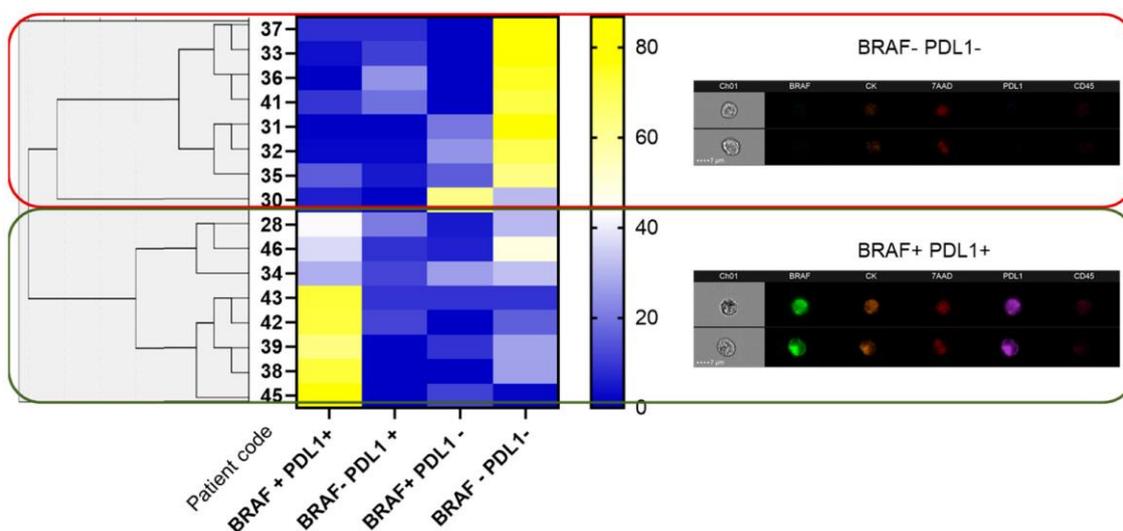


Figura 20: Caracterización de subpoblaciones de CTCs en pacientes con CC basada en la expresión de BRAFV600E y PD-L1. La sección izquierda de la figura presenta una asociación jerárquica entre los distintos grupos. La sección central muestra un mapa de calor que representa los porcentajes de expresión de BRAFV600E y/o PD-L1. La sección derecha exhibe un ejemplo de dos CTCs pertenecientes a las subpoblaciones principales, una doblemente negativa (BRAFV600E-/PD-L1-) y otra doblemente positiva (BRAFV600E+/PD-L1+).

También se reconoció una población CK-/CD45+ que expresaba PD-L1 en el 62,5 % (10/16) de los pacientes, mientras que solo se detectó positividad para BRAF V600E en la población CK-/CD45+ en el 18,75 % (3/16). Además, se analizó la localización de PD-L1 mediante el "análisis del asistente de co-localización" (Figura 21), dado que se había sugerido previamente que la tinción nuclear de este marcador se asocia con peores resultados. En este análisis, se observó la co-localización nuclear de PD-L1 en 8 de 16 personas (Tabla 7).

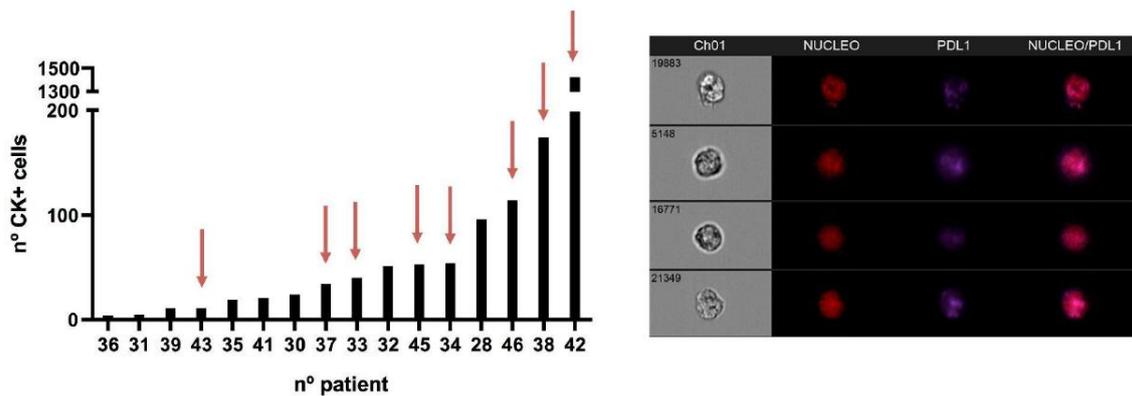


Figura 21: Localización nuclear de la expresión de PD-L1 en CTCs. La parte izquierda presenta un gráfico de barras con un número creciente de células tumorales circulantes con citoqueratina (CK). Los pacientes con expresión nuclear de PD-L1 se indican con una flecha roja. La parte derecha muestra un ejemplo de tinción co-localizada de PD-L1 y núcleo.

Finalmente, se evaluaron las muestras previas y posteriores a la cirugía (1 mes) en nueve pacientes para demostrar que nuestro protocolo puede detectar cambios en el recuento de CTCs, así como la evolución de las subpoblaciones de CTCs durante el seguimiento. La mediana del número de CTCs aumentó a 117 células [IC 24,5–359,0] en los seguimientos. Las comparaciones entre los recuentos de CTCs basales y de seguimiento mostraron que el 55,6 % (5/9) de los pacientes tuvieron un aumento en los CTCs CK+ después de la cirugía locorregional, mientras que el número de CTCs disminuyó solo en cuatro pacientes (Figura 22A). Además, la distribución entre las subpoblaciones de CTCs cambió en todos los pacientes durante el seguimiento (Figura 22B).

Se observaron tres tendencias principales: **ganancia de PD-L1+ en la población BRAF+/PD-L1-**, **ganancia de ambos marcadores en la población BRAF-/PD-L1-** o **pérdida de ambos marcadores**. Las CTCs de los pacientes 30 y 32 mostraron una evolución similar durante el seguimiento, con pérdida de poblaciones BRAF+/PD-L1- y ganancia de poblaciones BRAF+/PD-L1+, mientras que las CTCs de los pacientes 36 y 41 ganaron poblaciones BRAF+/PD-L1+ y perdieron poblaciones BRAF-/PD-L1-. Finalmente, las CTCs de los pacientes 42, 43, 45 y 28 ganaron poblaciones BRAF-/PD-L1- y perdieron la población BRAF+/PD-L1+.

No se pudo analizar correctamente la evolución de la subpoblación de CTCs a lo largo del tiempo para el paciente 37, ya que se aplicó quimioterapia antes del muestreo

previsto de seguimiento. Por lo tanto, solo se detectaron seis CTCs un mes después de la cirugía y no se observaron cambios entre las poblaciones. Curiosamente, este paciente fue el único con recurrencia y falleció de metástasis hepáticas y pulmonares cinco meses después de la cirugía locorregional.

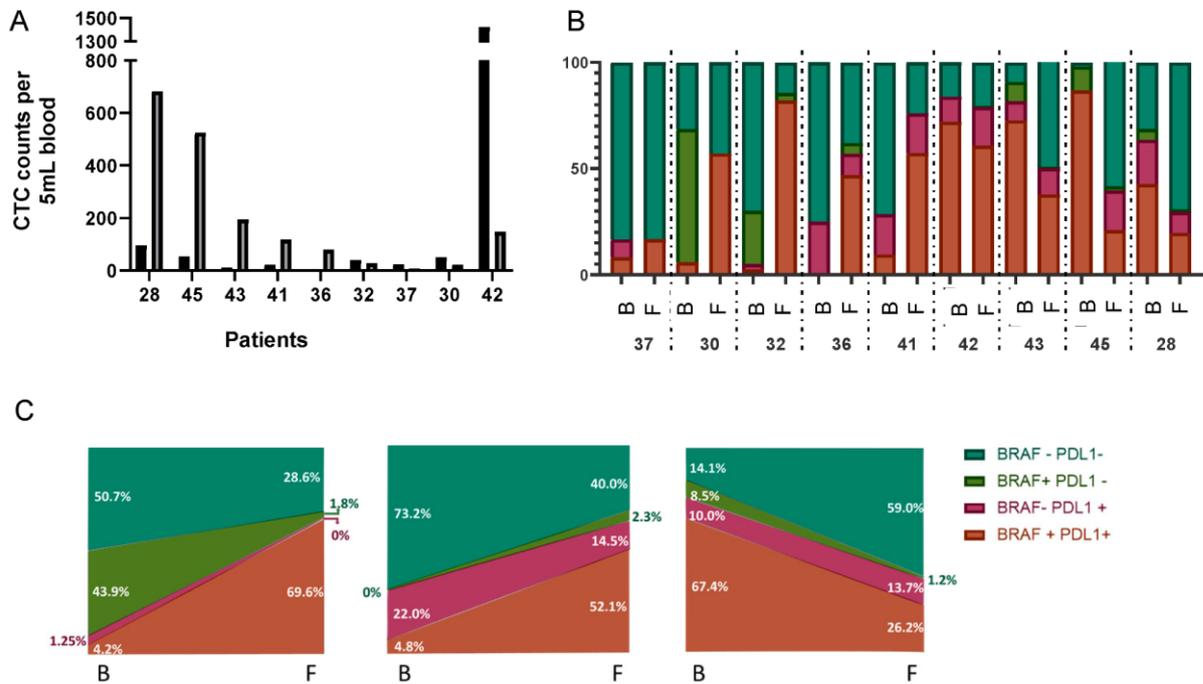


Figura 22 A,B,C: Evaluación de los recuentos de células tumorales circulantes (CTC) y la evolución de subpoblaciones durante el seguimiento de los pacientes. (A) Gráfico de barras que representa los números de CTCs en 5 ml de sangre periférica al inicio (negro) y un mes después de la cirugía locorregional (gris) para 9 pacientes. (B) Evolución de las cuatro subpoblaciones de CTCs según la expresión de BRAFV600E y/o PD-L1. Para cada paciente, la B indica la línea de base y la F indica el seguimiento. (C) Modelo de los principales procesos de evolución de las subpoblaciones de CTCs. Los colores son: naranja para BRAFV600E+/PD-L1+; rosa para BRAFV600E-/PD-L1+; verde para BRAFV600E+/PD-L1-; y cian para BRAFV600E-/PD-L1-.

## **B.2 Impacto del análisis de CTCs sobre el resultado clínico del paciente. Estudio analítico de CTCs en muestra previa y postcirugía. Estudio prospectivo o Fase II**

### **B.2.1 Presencia de Células Tumorales Circulantes y su asociación con las variables clínico-patológicas antes de la cirugía**

De los 28 pacientes incluidos en el análisis 14 de ellos (50%) fueron positivos para la presencia de células tumorales circulantes antes de la intervención quirúrgica. De estos 14 pacientes positivos 5 (41,7%) eran mujeres y 9 (56,3%) eran hombres. **El rango de CTCs variaba entre 1 y 18, con una media de 5,64 CTCs/5 ml de sangre y una mediana de 3,5 CTCs/5 ml.**

En el análisis de CTCs antes de la cirugía (Tabla 8a), la **presencia de CTCs** mostró un **relación estadísticamente significativa con la edad**, así, la media de edad al diagnóstico era de 71.86 ( $\pm 9.71$ ) para los que tenían ausencia de CTCs mientras que detectamos una media de edad de 63.79 ( $\pm 11.83$ ) para los que tenían presencia de CTCs ( **$p=0.05$** ). En relación al sexo, no encontramos diferencias significativas.

Los antecedentes de presencia de adenomas en colonoscopias previas reflejaron una tendencia a presentar CTCs en el análisis previo a la cirugía, de tal forma que, de los 10 pacientes positivos para pólipos adenomatosos, 6 de ellos presentaban CTCs, no obstante, esta relación no fue estadísticamente significativa ( $p=0.65$ ). Esta tendencia se reflejaba también en la presencia de gemación o budding tumoral es decir la **presencia de células tumorales aisladas o en pequeños grupos situadas en el frente infiltrante del tumor**, donde encontramos que el 55,6% por ciento de los pacientes con budding positivo presentaban presencia de CTCs, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.69$ ). Dicha relación también se observó en los pacientes con AP del tejido descrita como moderadamente y pobremente diferenciada, sin observar tampoco significación estadística.

La práctica de ejercicio físico también fue evaluada en relación con la presencia de CTCs antes de la cirugía, el resultado del análisis mostró datos que identificaban que aquellos pacientes que realizaban ejercicio más de 3 días a la semana tenían una tendencia similar a presentar CTCs que aquellos que no lo practicaban, sin embargo, aquellos pacientes que realizaban ejercicio moderado y no más de 3 días a la semana presentaba una menor tendencia a la presencia de CTCs ( $p=0.08$ ).

## B2.2 Presencia y Persistencia de Células Tumorales Circulantes después de la intervención quirúrgica y su asociación con las variables clínico-patológicas

Con el fin de investigar el **impacto de la cirugía en la persistencia o desaparición de CTCs** y su asociación con variables clínico-patológicas, se realizaron análisis bivariantes. 7 pacientes no pudieron ser evaluados debido a dos factores principales: escasa cantidad de muestra y pérdida de la extracción por negativa del paciente. El análisis sobre la dinámica de las CTCs se limitó a 21 de los 28 pacientes inicialmente incluidos.

Los resultados para estos 21 pacientes indicaron que en **seis (28.57%) persistía la presencia de CTCs** en la toma de muestra después de la intervención quirúrgica. Además, dos pacientes (9.52%) cambiaron de un resultado negativo antes de la cirugía a un resultado positivo después de la misma. Por otro lado, ocho de los 21 pacientes (38.10%) permanecieron negativos antes y después de la cirugía, mientras que cinco (23.81%) que tenían CTCs antes de la operación se negativizaron posteriormente (ver Tabla 8a). Al analizar el resultado final, ocho pacientes (38.10%) resultaron positivos tras la intervención, comparado con 13 (61.90%) que fueron negativos después de la cirugía (ver Tabla 8b).

Presencia CTCs antes y después de cirugía	Frecuencia	Porcentaje (%)	Acumulado
Ausencia/Ausencia	8	38.1	38.1
Presencia/Ausencia	5	23.81	61.9
Ausencia/Presencia	2	9.52	71.43
Presencia/Presencia	6	28.57	100
Total	21	100	100

Tabla 8a: Distribución de la presencia de CTCs antes y después de la cirugía

CTCs postcirugía	Frecuencia	Porcentaje (%)	Acumulado
Ausencia	13	61.9	61.9
Presencia	8	38.1	100
Total	21	100	100

Tabla 8b: Distribución de la presencia/ausencia de CTCs después de la cirugía

El análisis bivariante reveló que la mediana de edad al diagnóstico era de 75 años para aquellos que negativizaron CTCs frente a 61.5 años para los que positivizaron, sugiriendo que **una edad más temprana al diagnóstico se asocia con una mayor probabilidad de diseminación tumoral, es decir, con la presencia de CTCs**. El riesgo ajustado fue de 0.93 (IC 95%, 0.86-1.01) para los pacientes más jóvenes en comparación con los mayores, aunque este resultado no alcanzó significación estadística ( $p=0.063$ ), mostrando solo indicios de significación.

En relación con el género, el 44.44% de las mujeres positivizaron frente al 33.33% de los hombres, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.673$ ). La regresión logística indicó que **ser mujer incrementa el riesgo en 1.6 veces de presentar CTCs comparado con ser hombre**.

Finalmente, el análisis de otras variables clínicas, como el patrón estenosante, presencia de adenomas en colonoscopia posterior a cirugía, invasión linfovascular, budding tumoral, localización del tumor, estadio tumoral, realización de ejercicio, obesidad, tabaco y antecedentes familiares de CCR no mostraron diferencias estadísticamente significativas en relación con los cambios dinámicos de las CTCs antes y después de la cirugía (ver Tabla 9).

Variable clínica	Subtipos	P estadística
Patrón estenosante	Si	0.53
	No	0.59
Presencia de adenomas tras cirugía	Si	0.64
	No	0.37
Invasión linfovascular	Si	0.59
	No	0.23
Budding tumoral	Ausencia	0.21
	Bajo	0.30
	Intermedio	-
	Alto	-
Localización de tumor	C. Izquierdo	0.59
	C. Derecho	0.89

Ejercicio	No	0.22
	< 3 días/semana	0.48
	>3 días/semana	0.59
Obesidad	Normopeso	1
	Sobrepeso	1
	Obesidad	0.24
Tabaco	No	0.56
	Exfumador	0.96
	Fumador activo	-
Antecedentes familiares de CCR	No	0.56
	Si	0.47

Tabla 9: Cambios dinámicos de CTCs y asociación estadística

### B2.3 Análisis de la presencia de Células tumorales Circulantes y el resultado clínico

Se abordó también el impacto de la presencia de CTCs sobre la recaída de la enfermedad analizada comparándose la presencia previa o postcirugía.

**Análisis de la presencia de CTCs antes de la cirugía:** De los 28 pacientes reclutados, **3 de ellos (10.71%) sufrieron una recaída constatada**; el 67% de ellos presentaron CTCs. El resto de los pacientes (25) no recayeron al momento del cierre del estudio, y sólo 12 (48%) de ellos presentaron CTCs. Se comparó el número de CTCs detectadas en los pacientes que recayeron versus los que no recayeron.

**Análisis de la persistencia de CTCs después de la cirugía:** De los 21 pacientes analizados, solo **8 presentaron CTCs al mes de la intervención quirúrgica.**

Dos de los 21 pacientes recayeron al cierre del estudio, y solo 1 de los 2 (50%) presentaba CTCs. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia de CTCs y la recaída.

## B2.4 Análisis del perfil fenotípico de Células tumorales Circulantes

La heterogeneidad de las subpoblaciones celulares de CTCs detectadas antes y después de la intervención quirúrgica se evaluó mediante la determinación de la expresión de PD-L1, BRAF-V600 y CD45.

**Caracterización de CTCs previa a la intervención quirúrgica:** De los 14 pacientes positivos para la presencia de CTCs antes de la cirugía, el 85,7% tenía más de 1 CTC/5 ml de sangre. Diez de los 14 pacientes (71,5%) presentaron CTCs con células positivas para la expresión simultánea de PD-L1 y BRAF-V600 (Tabla 11).

Número de CTCs	Nº de pacientes y % del total analizado
0	14 (50.0%) F=7 (58.3%) M=7 (43.8%)
1	2 (7.1%) F=0 (0.0%) M=2 (12.5%)
2	4 (14.3%) F=1 (8.3%) M=3 (18.8%)
3	1 (3.6%) F=1 (8.3%) M=0 (0.0%)
	1 (3.6%)

4	F=1 (8.3%) M= 0 (0.0%)
5	2 (7.1%) F=0 (0.0%) M=2 (12.5%)
8	1 (3.6%) F=0 (0.0%) M=1 (6.3%)
13	2 (7.1%) F=1 (8.3%) M=1 (6.3%)
18	1 (3.6%) F=1 (8.3%) M=0 (0.0%)
Analizados: 28 (F=12 + M=16)	
Positivos: 14 (F=5 + M=9) Negativos: 14 (F=7 +M=7)	

Tabla 10: Número de CTCs y % por paciente analizado en pacientes previo a la cirugía, distinguiendo entre sexos.

En cuanto al porcentaje de CTCs positivas para ambos biomarcadores en la población, se observó un rango de 11.11% al 100% de esta subpoblación, dependiendo del paciente analizado. El porcentaje de pacientes con CTCs negativas para ambos

marcadores (BRAF-V600/PD-L1) fue del 32.14%. El porcentaje de CTCs positivas y negativas para ambos marcadores en cada paciente se detalla en la tabla 11.

% de células en el paciente con CTCs con marcador positivo		% de células en el paciente CTCs con marcador negativo	
Doble positivo BRAF-V600/PD-L1		Doble negativo BRAF-V-600/PD-L1	
0%	4 (28.6%) F= 0 (0.0%) M= 4 (44.4%)	0%	5 (35.7%) F= 2 (40.0%) M= 3 (33.3%)
11.11%	1 (7.1%) F=1 (1.1%) M=0 (0.0%)	20%	1 (7.1%) F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)
25%	1 (7.1%) F=1 (1.1%) M=0 (0.0%)	25%	1 (7.1%) F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)
50%	2 (14.3%) F=1 (20.0%) M=1 (11.1%)	40%	1 (7.1%) F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)
60%	1 (7.1%) F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)	50%	4 (28.6%) F=3 (60.0%) M=1 (11.1%)
75%	1 (7.1%)	53.85%	1 (7.1%)

	F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)		F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)
92.31%	1 (7.1%) F=1 (20.0%) M=0 (0.0%)	100%	1 (7.1%) F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)
100%	3 (21.4%) F=1 (20.0%) M=2 (22.2%)		
Analizados	28 (F=12 + M=16)	Analizados	28 (F=12 + M=16)
Positivos	10 (F=5 + M=5)	Positivos	9 (F=3 + M=6)
Negativos	18 (F=7 + M=11)	Negativos	19 (F=9 + M=10)

Tabla 11. Porcentaje de poblaciones de CTCs en los pacientes con marcadores doblemente positivos y negativos (BRAF-V600/PD-L1) en pacientes antes de la cirugía. "F" = mujer/ "M" = hombre. *Nota: En la casilla del 0% se recogen los pacientes que presentando CTCs positivas no tienen subpoblaciones positivas del marcador/es reseñado/s.*

Con relación al género y la coexpresión de ambos marcadores, **todas las mujeres presentaron positividad para PD-L1 y BRAF-V600**, mientras que, en la población masculina, 4 de los pacientes no presentaron fenotipos doble positivos para la expresión de PDL-1 y BRAF-V600, lo que corresponde al 44,4% de los hombres examinados.

De los 14 pacientes positivos para CTCs, 6 (43%) fueron positivos para la expresión exclusiva de **BRAFv600**. El rango de positividad de CTCs BRAFv600+ fue del 7,7% al 100% de todas las CTCs presentes en cada individuo. Las Tablas 12 y 13 muestran el porcentaje de positividad de cada subpoblación de CTCs para los marcadores analizados, así como el recuento de su agrupación en clústeres.

En relación al sexo, no hubo diferencias significativas en la mayor presencia de CTCs con fenotipo BRAF+ entre sexos: 3 de los 6 pacientes con CTCs BRAF+ fueron hombres (50%) y 3 fueron mujeres (50%), si bien el porcentaje de CTCs BRAF+ fue mayor que en mujeres.

**En cuanto a PD-L1**, su expresión estaba restringida a su localización nuclear. 5 de los 14 pacientes positivos presentaron CTCs PD-L1+ (36%). De estos pacientes, 3 correspondían a la población femenina y 2 a la masculina. No había diferencias significativas en el porcentaje de CTCs PD-L1+ entre sexos, siendo el rango de positividad entre el 20% y el 40% del total de CTCs detectadas.

% de células CTCs con marcador positivo	BRAF-V600 exclusivo	Número de células con PD-L1 en núcleo	Número y % de pacientes
0%	8 (57.1%) F=2 (40.0%) M=6 (67.7%)	0 F=2 (40.0%) M=3 (60.0%)	5 (50%)
7.69%	1 (7.1%) F=1 (7.1%) M=0 (0.0%)	1 F=2 (40.0%) M=0 (0.0%)	2 (20%)
25%	1 (7.1%) F=1 (7.1%) M=0 (0.0%)	2 F=0 (0.0%) M=1 (20.0%)	1 (10%)
38.89%	1 (7.1%) F=1 (7.1%) M=0 (0.0%)	3 F=0 (0.0%) M=1 (20.0%)	1 (10%)

46.15%	1 (7.1%) F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)	6 F=1 (20.0%) M=0 (0.0%)	1 (10%)
80%	1 (7.1%) F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)		
100%	1 (7.1%) F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)		
Analizados	28 (F=12 + M=16)	Analizados	28 (F=12 + M=16)
Positivos	6 (F=3 + M=3)	Positivos	5 (F=3 + M=2)
Negativos	22 (F=9 + M=13)	Negativos	23 (F=9 + M=14)

Tabla 12. Porcentaje de CTCs con marcador BRAFV-600 y número de células con marcador PD-L1 en el núcleo en pacientes antes de la cirugía. "F" = mujer/ "M" = hombre. *Nota: En la casilla del 0% se recogen los pacientes que presentando CTCs positivas no tienen subpoblaciones positivas del marcador/es reseñado/s.*

**La expresión de CD45** también fue determinada en las CTCs. Curiosamente, **11 de los 14 pacientes mostraban CTCs positivas para CD45**. El porcentaje de CTCs CD45+ era igual en ambos sexos, sin diferencias significativas.

**El número de clústeres**, es decir, agrupaciones de CTCs, también se evaluó. Cuatro de los 14 pacientes presentaban agrupaciones de CTCs, de los cuales 3 eran hombres y 1 era mujer. El rango de CTCs por clúster fue de 2 a 5 células.

Número de células CD45+	Número y % de pacientes	Número de CTCs en clústers	Número y % de pacientes
0	2 (15.4%) F=0 (0.0%) M=2 (25.0%)	0	10 (71.4%) F=4 (80.0%) M=6 (66.7%)
1	3 (23.1%) F=2 (40.0%) M=1 (12.5%)	1	1 (7.1%) F=0 (0.0%) M=1 (11.1%)
2	3 (23.1%) F=1 (20.0%) M=2 (25.0%)	2	2 (14.3%) F=0 (0.0%) M=2 (22.2%)
3	1 (7.7%) F=1 (20.0%) M=0 (0.0%)	5	1 (7.1%) F=1 (20.0%) M=0 (0.0%)
5	1 (7.7%) F=0 (0.0%) M=1 (12.5%)		
6	1 (7.7%) F=0 (0.0%) M=1 (12.5%)		
13	2 (15.4%)		

	F=1 (20.0%) M=1 (12.5%)		
Analizados	28 (F=12 + M=16)	Analizados	28 (F=12 + M=16)
Positivos	11 (F=5 + M=6)	Positivos	4 (F=1 + M=3)
Negativos	17 (F=7+ M=10)	Negativos	24 (F=11 + M=13)

Tabla 13: Número de células CD45 y número de CTCs en clústeres en pacientes antes de la cirugía. “F” = mujer/ ”M” = hombre. *Nota: En la casilla de 0 se recogen los pacientes que presentando CTCs positivas no tienen subpoblaciones positivas del marcador/es reseñado/s.*

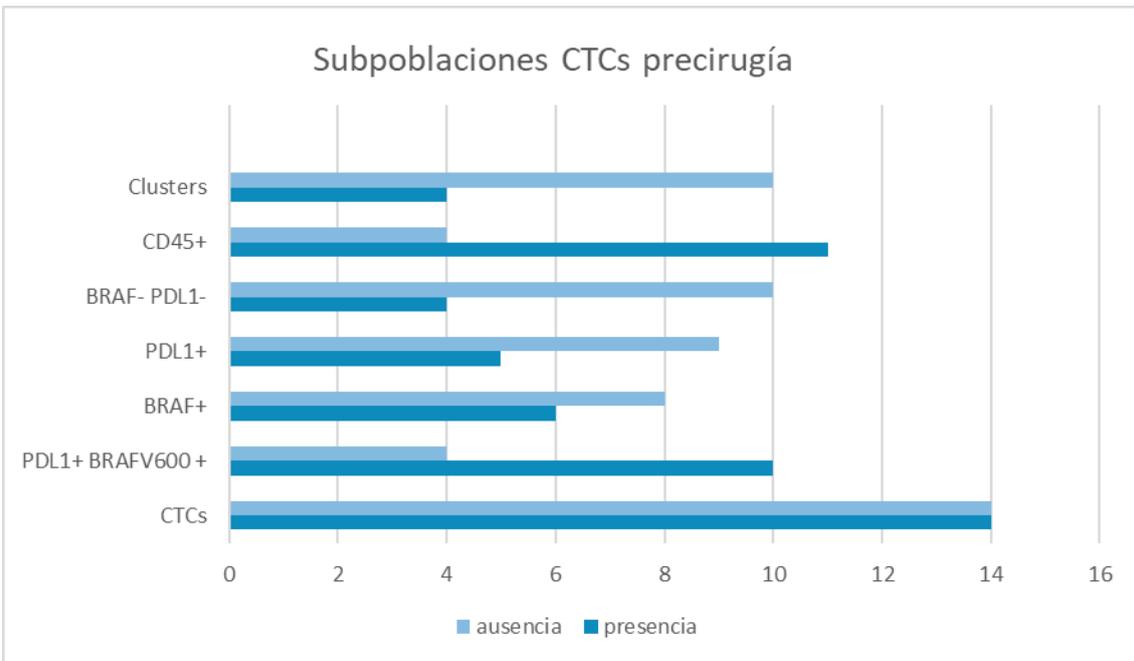


Figura 23: Número de pacientes precirugía con ausencia o presencia de las distintas poblaciones de CTCs.

**Caracterización de CTC post-intervención quirúrgica:** En el análisis tras la intervención quirúrgica, **7 pacientes no pudieron ser evaluados** debido a dos factores principales: escasa cantidad de muestra y pérdida de la extracción por negativa del paciente. De los **21 pacientes analizados**, se detectaron CTCs en 8 pacientes, de los

cuales 4 (50%) fueron hombres y 4 (50%) mujeres. El rango de células oscilaba entre 1 y 12 CTCs/5ml (Tabla 14).

Número de CTCs	Nº de pacientes y % del total analizado
0	13 (61.9%) F=5 (55.6%) M=8 (66.7%)
1	1 (4.8%) F=0 (0.0%) M=1 (8.3%)
3	1 (4.8%) F=0 (0.0%) M=1 (8.3%)
4	2 (9.5%) F=1 (11.1%) M=1 (8.3%)
5	1 (4.8%) F=0 (0.0%) M=1 (8.3%)
6	1 (4.8%) F=1 (4.8%) M=0 (0.0%)

8	1 (4.8%) F=1 (4.8%) M=0 (0.0%)
12	1 (4.8%) F=1 (4.8%) M=0 (0.0%)
Analizados	21 (F=9 + M=12)
Positivos	8 (F=4 + M=4)
Negativos	13 (F=5 + M=8)

Tabla 14: Número de CTCs y % por paciente analizado en pacientes después de la cirugía, distinguiendo entre sexos.

De estos 8 pacientes CTC+, 6 de ellos (75%) eran positivos para la doble expresión de PDL-1 y BRAFV600, sin diferencias significativas en la expresión de estos marcadores entre hombres y mujeres. El rango de CTCs PDL1+/BRAFV600+ era de 17% al 100% de las CTCs, dependiendo del paciente (Tabla 15).

La presencia de doble negativos para ambos marcadores sobre las CTCs también fue detectada en algunos pacientes, de tal forma que 4 pacientes de los positivos para CTCs presentaron subpoblaciones negativas, sin positividad para ninguno de estos marcadores y representando el 19.05% de los pacientes analizados.

<b>% de células en el paciente con CTCs con marcador positivo</b>	<b>Doble positivo BRAF-V600/PD-L1</b>	<b>% de células en el paciente CTCs con marcador negativo</b>	<b>Doble negativo BRAF-V-600/PD-L1</b>
0%	2 (25.0%) F=1 (25.0%) M=1 (25.0%)	0%	4 (50.0%) F=2 (50.0%) M=2 (50.0%)
16.67%	1 (12.5%) F=1 (25.0%) M=0 (0.0%)	33.33%	1 (12.5%) F=0 (0.0%) M=1 (25.0%)
25%	1 (12.5%) F=1 (25.0%) M=0 (0.0%)	40%	1 (12.5%) F=0 (0.0%) M=1 (25.0%)
33.33%	1 (12.5%) F=1 (25.0%) M=0 (0.0%)	75%	2 (25.0%) F=2 (50.0%) M=0 (0.0%)
60%	1 (12.5%) F=0 (0.0%) M=1 (25.0%)		
66.67%	1 (12.5%) F=0 (0.0%) M=1 (25.0%)		

100%	1 (12.5%) F=0 (0.0%) M=1 (25.0%)		
Analizados	21 (F=9 + M=12)	Analizados	21 (F=9 + M=12)
Positivos	6 (F=3 + M=3)	Positivos	4 (F=2 + M=2)
Negativos	15 (F=6 + M=9)	Negativos	17 (F=7 + M=10)

Tabla 15. Porcentaje de poblaciones de CTCs en los pacientes con marcadores doblemente positivos y negativos (BRAF-V600/PD-L1) en pacientes después de la cirugía. "F" = mujer/ "M" = hombre. *Nota: En la casilla del 0% se recogen los pacientes que presentando CTCs positivas no tienen subpoblaciones positivas del marcador/es reseñado/s.*

En cuanto a la presencia de CTCs BRAFV600+, 2 de los pacientes (25%) presentaron expresión aislada de este marcador, siendo ambos mujeres. Entre el 25% y el 33% de las CTCs analizadas en estos pacientes presentaron positividad para este marcador de forma exclusiva.

La expresión de PD-L1 fue detectada en 4 de los 8 pacientes positivos para la presencia de CTCs, con un rango de positividad de 8% al 100% del total de CTCs detectadas en cada paciente. Tres de los pacientes CTCs PD-L1+ fueron mujeres frente a un solo hombre con esta subpoblación de CTCs. **El PD-L1 detectado en estos pacientes fue localizado en el citoplasma; sin embargo, uno de los pacientes presentó una localización nuclear del PD-L1, siendo un paciente masculino.**

% de células CTCs con marcador positivo		% de células CTCs con marcador positivo	
BRAF-V600 exclusivo		PD-L1	
0%	6 (75.0%) F=2 (50.0%) M= 4 (100.0%)	0%	4 (50.0%) F=1 (25.0%) M=3 (75.0%)
25%	1 (12.5%) F=1 (25%) M=0 (0.0%)	8.33%	1 (12.5%) F=1 (25.0%) M=0 (0.0%)
33.33%	1 (12.5%) F=1 (25%) M=0 (0.0%)	33.33%	1 (12.5%) F=1 (25.0%) M=0 (0.0%)
		75%	1 (12.5%) F=1 (25.0%) M=0 (0.0%)
		100%	1 (12.5%) F=0 (0.0%) M=1 (25.0%)
Analizados	21 (F=9 + M=12)	Analizados	21 (F=9 + M=12)
Positivas	2 (F=2 + M=0)	Positivas	4 (F=3 + M=1)
Negativas	19 (F=7+ M=12)	Negativas	17 (F=6 + M=11)

Tabla 16. Porcentaje de CTCs con marcador BRAFV-600 y marcador PD-L1 en los pacientes después de la cirugía. “F” = mujer/ ”M” = hombre. *Nota: En la casilla del 0% se recogen los pacientes que presentando CTCs positivas no tienen subpoblaciones positivas del marcador/es reseñado/s.*

En relación al CD45, **4 de los pacientes presentaron CTCs con expresión de CD45**, con un rango de positividad de 1 CTC a 12 CTCs. No había diferencias significativas entre hombres y mujeres en cuanto a la presencia de esta subpoblación celular.

En cuanto a la presencia de clústeres de CTCs, **5 de los 8 (62%) pacientes presentaron agrupaciones de CTCs** con un rango de 2 a 6 CTCs por clúster. En este caso, 3 de los pacientes con clústeres celulares eran mujeres frente a 2 hombres.

Número de células CD45+	Número y % de pacientes	Número de CTCs en clústers	Número y % de pacientes
0	4 (50.0%) F=2 (50.0%) M=2 (50.0%)	0	2 (28.6%) F=1 (25.0%) M=1 (33.3%)
1	1 (12.5%) F=0 (0.0%) M=1 (25.0%)	1	2 (28.6%) F=1 (25.0%) M=1 (33.3%)
2	2 (25.0%) F=1 (25.0%) M=1 (25.0%)	2	2 (28.6%) F=1 (25.0%) M=1 (33.3%)
12	1 (12.5) F=1 (25.0%) M=0 (25.0%)	6	1 (14.3%) F=1 (25.0%) M=0 (0.0%)

Analizados	21 (F=9 + M=12)	Analizados	21 (F=9 + M=12)
Positivos	4 (F=2 + M=2)	Positivos	5 (F=3 + M=2)
Negativos	17 (F=7 + M=10)	Negativos	16 (F=6 + M=8)

Tabla 17: Número de células CD45 y número de CTCs en clústeres en pacientes después de la cirugía. "F" = mujer/ "M" = hombre. *Nota: En la casilla de 0 se recogen los pacientes que presentando CTCs positivas no tienen subpoblaciones positivas del marcador/es reseñado/s.*

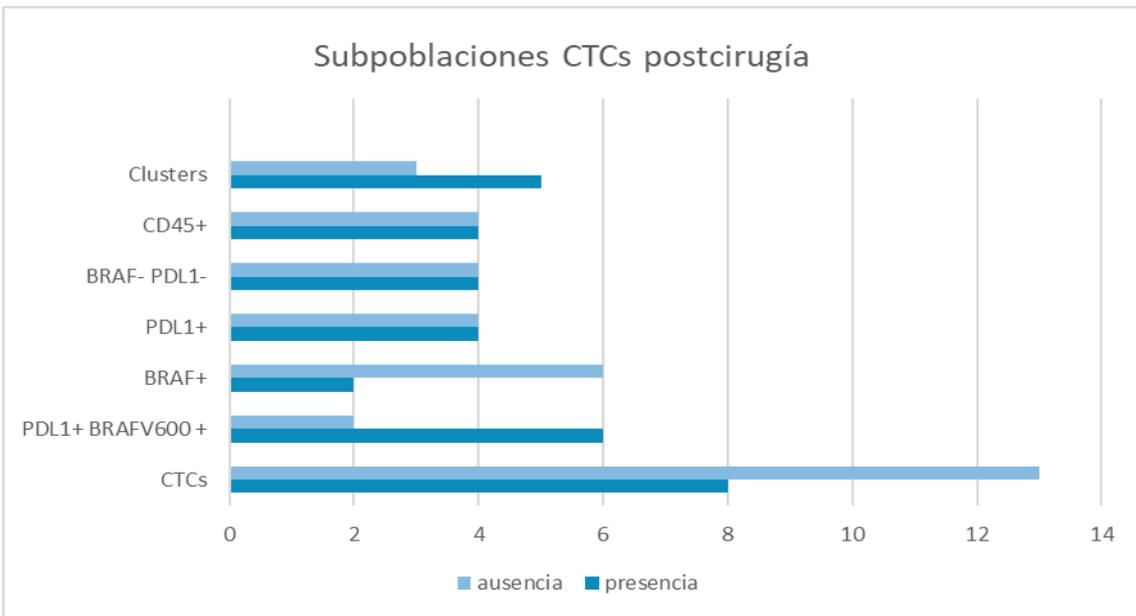


Figura 24: Número de pacientes postcirugía con ausencia o presencia de las distintas poblaciones de CTCs

## PARTE C

### IMPACTO CLÍNICO DEL ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN Y PERFILES DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN CIRCULANTE

En este estudio, se analizó la concentración y el perfil fragmentómico del cfDNA **en 31 pacientes** con cáncer de colon, examinando su relación con el tipo de individuo (sano vs. paciente), el grado de progresión de la enfermedad y la influencia del tratamiento de quimioterapia sobre ambas características del ADN.

A continuación, se detallan los resultados del análisis mencionado.

#### C1. Análisis de la concentración de DNA libre circulante

##### C1.1 CfDNA y presencia de enfermedad

En cuanto a la concentración de cfDNA, los análisis revelaron que esta fue **significativamente más alta en pacientes con cáncer en comparación con los controles sanos**, tanto en las muestras basales (PB) ( $p=0.0286$ ) como en las de seguimiento a 1 mes (PS) ( $p=0.013$ ). Estos resultados sugieren que la concentración de cfDNA podría ser un marcador útil para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de colon (Figura 25).

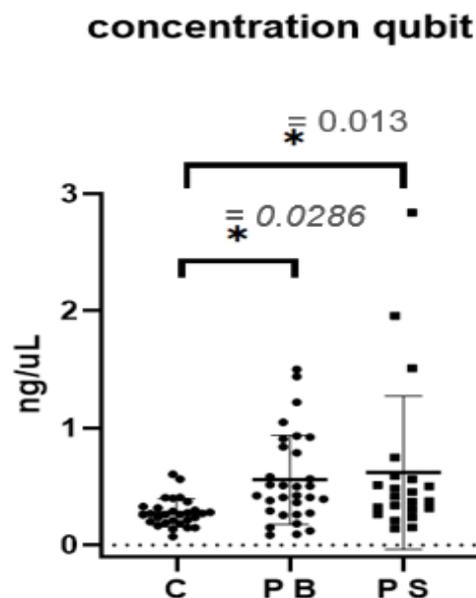


Figura 25: Concentración de cfDNA entre controles y pacientes

## C1.2 CfDNA y estadio clínico

Por otro lado, se relacionó la concentración de cfDNA con grado (estadio) de la enfermedad. Al contrario que en la relación anterior, aquí no se encontraron diferencias significativas entre los estadios I, y III (Figura 26A). Excepto en el caso en el que se analizaba la relación entre cfDNA en sanos y en pacientes con **estadio II, donde si se encontró una relación significativa** ( $p=0.0002$ ), diferencia que no fue detectada entre controles con el resto de los estadios (Figura 26B).

cfDNA concentration vs stage

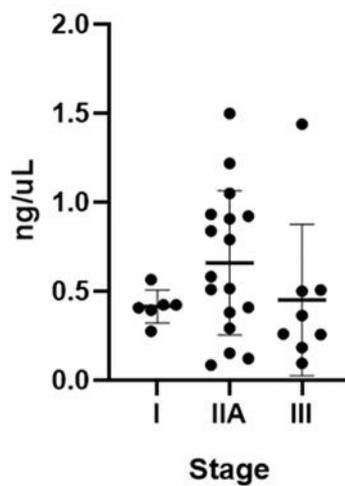


Figura 26 A: concentración de cfDNA por estadios

concentration (basal) vs stage

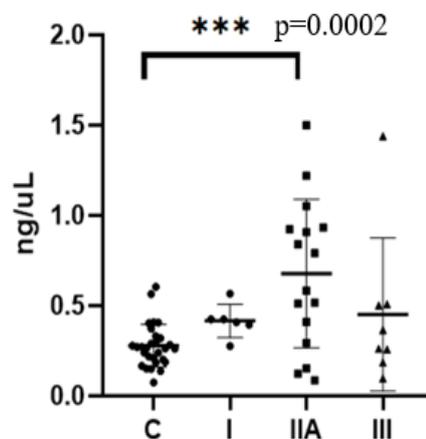


Figura 26 B: concentración de cfDNA por estadios vs controles

### C1.3 CfDNA y variables clínico-patológicas

La concentración de cfDNA se analizó en función de las variables clínico-patológicas (las mismas que hemos referido en el apartado C. Resultados. Parte A. Estudio de las características clínico-patológicas de los pacientes donde se analizaron CTCs y ctDNA ( $n=28$ ), sin encontrarse ninguna correlación positiva entre la [cfDNA] y alguna de las variables clínicas incluidas en el estudio.

### C1.4 CfDNA y tratamiento quimioterápico

El análisis de la concentración de cfDNA y el tratamiento con quimioterapia mostró que la [cfDNA] durante el seguimiento fue significativamente mayor comparada con la detectada antes de la administración de la quimioterapia adyuvante (basal) ( $p=0.0623$ ) (Figura 27). Lo que sugería que el tratamiento inducía la muerte de las células tumorales y su vertido a la circulación sanguínea. Sólo se pudo analizar a 5 de los 6 pacientes que recibieron quimioterapia debido a que en uno de ellos la muestra para el estudio de cfDNA no fue de calidad suficiente para poder realizar el análisis.

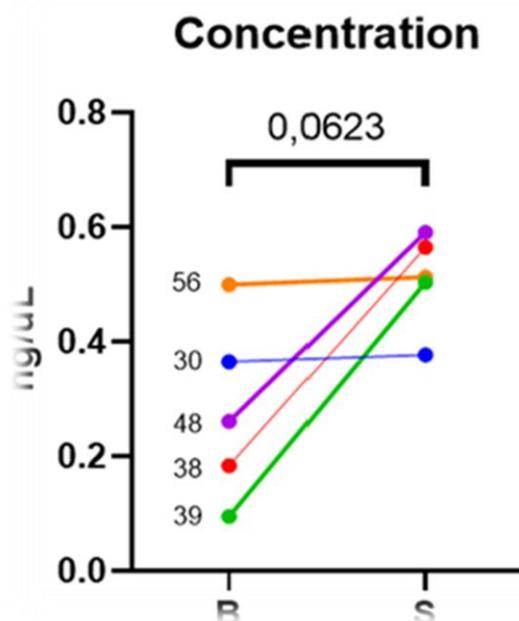


Figura 27: Concentración de cfDNA entre los pacientes que recibieron quimioterapia

### C2. Análisis del perfil fragmentómico

En relación al análisis de perfil de fragmentos, este reveló diferencias tanto en la longitud como en la concentración de estos fragmentos de cfDNA entre pacientes y controles.

## C2.1 Análisis de fragmentos del CfDNA y la presencia de enfermedad

Con respecto a la longitud de los fragmentos de **cfDNA**, **los pacientes muestran un perfil de fragmentos más cortos en comparación con los controles**, tanto en la muestra basal ( $p=0.0278$ ) como en la muestra obtenida durante el seguimiento ( $p=0.0017$ ) (Figura 28 A), mostrando que este perfil de fragmentos cortos se relaciona con la posible presencia de enfermedad tumoral.

En cuanto al tipo de fragmentos detectados, los **fragmentos de entre 100-200 pb se concentraban en la cohorte de pacientes con cáncer** frente a la de controles que superaban los 200 pb, tanto a basal ( $p= 0.0404$ ) como durante el seguimiento ( $p= 0.0452$ ) (Figura 28B)

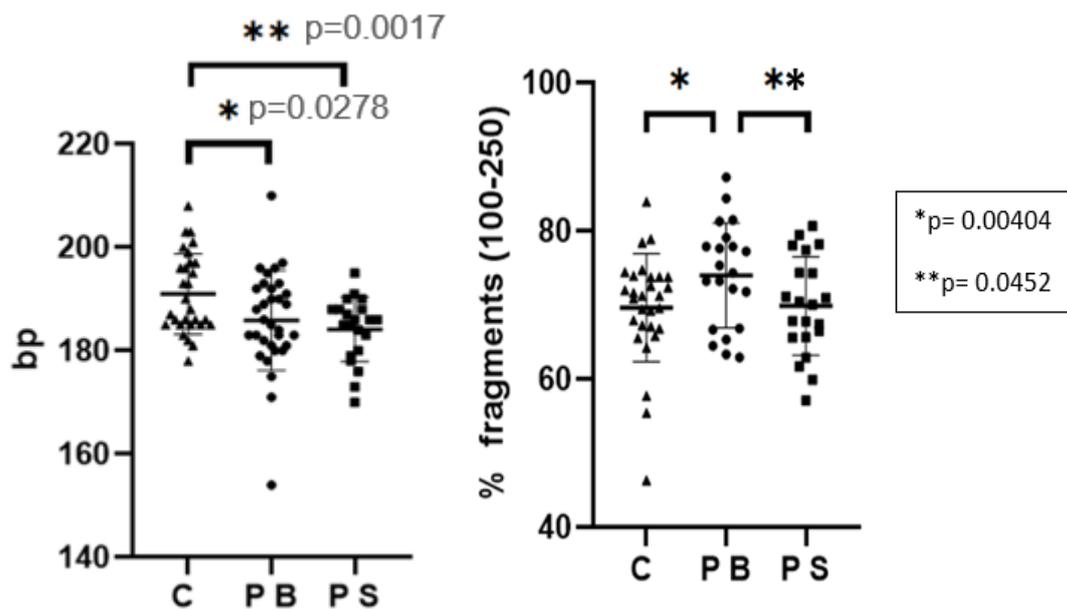


Figura 28A y B: longitud de los fragmentos de ctDNA en pares de bases (pb) de las muestras de controles vs basal y postcirugía

## C2.2 Análisis de fragmentos del CfDNA y estadio

En este caso, el análisis de la longitud de los fragmentos de ctDNA mostraba ausencia de diferencias significativas ( $p>0.05$ ) con los diferentes estadios.

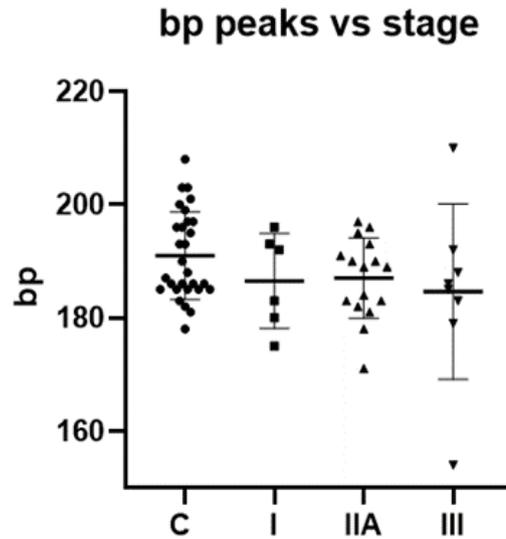


Figura 29: longitud de los fragmentos de ctDNA en pares de bases de las muestras de controles versus pacientes según su estadio.

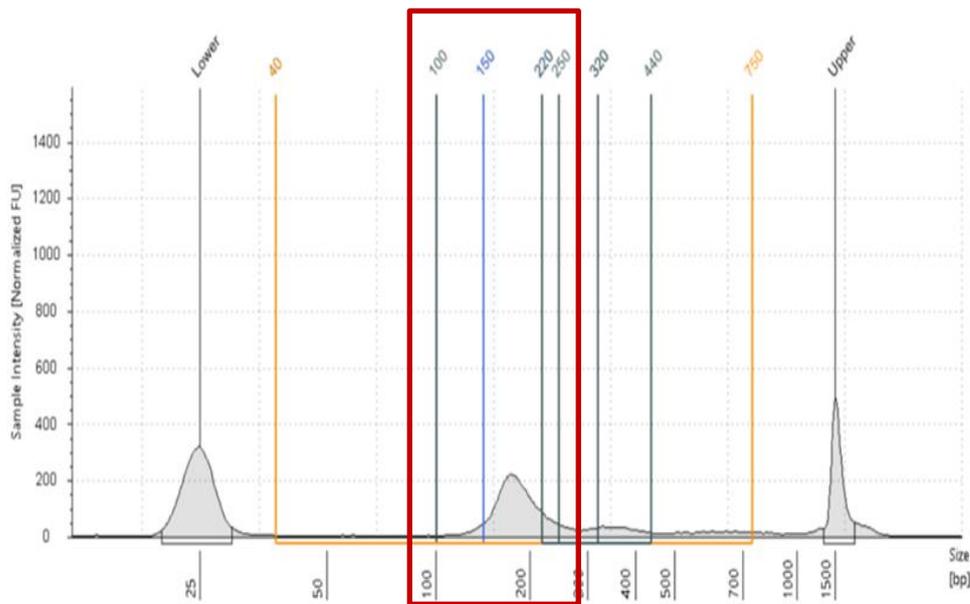


Figura 30: Perfil de fragmentos de cfDNA. La figura identifica el rango de pares de bases que corresponde al cfDNA (100-250pb)

### C2.3 Análisis de fragmentos del cfDNA y las variables clínico-patológicas

La correlación entre las diferentes variables clínicas y la concentración de fragmentos cortos fue analizada y **no se encontraron diferencias significativas**. A excepción del

“sexo”, donde al igual que con la concentración si se apreció una diferencia significativa, siendo la **frecuencia de estos fragmentos cortos mayor en mujeres** que en hombres ( $p=0.0281$ ) (Figura 31). En cuanto al resto de características clínicas analizadas, como son la localización del tumor, el patrón estenosante, la invasión linfovascular, la edad, el CEA; no se encuentran correlaciones significativas con la concentración o proporción de fragmentos cortos de cfDNA.

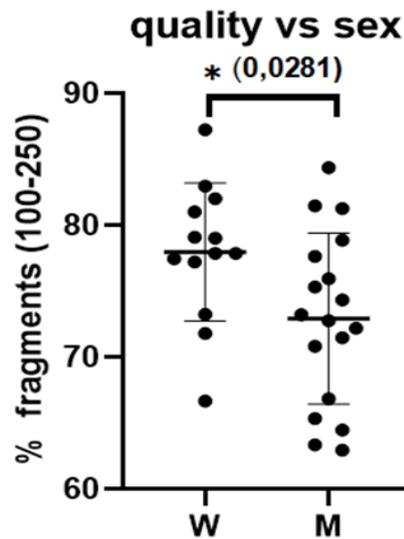


Figura 31: comparación entre la longitud de cfDNA entre pacientes mujeres y hombres

## PARTE D

### IMPACTO DE LA PRESENCIA DE CTCs SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y PATRONES DE FRAGMENTACIÓN DE ctDNA

#### D1. Relación entre CTCs y ctDNA en el estudio realizado

El estudio también exploró la potencial relación entre la concentración de cfDNA y el número de CTCs, en aquellos pacientes con ambas determinaciones. El análisis mostró que en una población de 21 pacientes con análisis simultáneo de CTCs y ctDNA:

- **Concentración y Proporción de Fragmentos Cortos de ctDNA:** No se encuentra correlación significativa con el número de CTCs ni en muestras basales ni en seguimiento.
- **Subpoblaciones de CTCs:** No hay diferencias significativas en la concentración de cfDNA entre distintos grupos de subpoblaciones de CTCs basadas en los biomarcadores PD-L1 y BRAF+.
- **Clústeres de CTCs:** **La concentración de cfDNA es significativamente más elevada en muestras basales de pacientes con clústeres de CTCs, pero no en las de seguimiento.**
- **Expresión de CD45 en CTCs:** Los pacientes con CTCs que no expresan CD45 tienen una menor concentración de cfDNA en las muestras basales, lo cual podría indicar un mal pronóstico.

## D. DISCUSIÓN

### 1. Introducción

La tesis aborda un problema crítico en el manejo del cáncer de colon: la recidiva temprana y la metástasis, utilizando biopsias líquidas para la detección de células tumorales circulantes (CTCs) y ADN tumoral circulante (ctDNA). Este enfoque podría revolucionar el seguimiento de los pacientes con cáncer de colon en estadios precoces, proporcionando herramientas más sensibles y menos invasivas para la detección de recurrencias.

En la actualidad existe la necesidad de nuevas herramientas no invasivas para mejorar el diagnóstico temprano y estratificación del riesgo de cáncer de colon. Es conocido que la presencia de CTCs en estadios avanzados de la enfermedad es un marcador de alto riesgo de metástasis (161) y que la presencia de éstas tras la resección quirúrgica, y en especial en forma de clústeres, es un marcador pronóstico independiente de recurrencia y metástasis en pacientes con CCR (162)(163).

En cuanto al ctDNA y el CCR, la información bibliográfica y el estudio de este es de menor cuantía y calidad con respecto a las CTCs. No obstante, se conoce que los niveles de ctDNA son más altos en pacientes con CCR que en individuos sanos, influenciados por factores como el estadio de la enfermedad, con niveles detectables en el 46% de los pacientes en estadio I, el 73% en los estadios II-III y el 90% en el CCR metastásico (164). La presencia de fragmentos de ctDNA tras la cirugía podría estar relacionado con un mayor riesgo de metástasis y recidiva tumoral. También hay estudios que valoran la presencia de ctDNA en pacientes intervenidos de CCR en estadio II y lo relacionan con la necesidad de aplicar quimioterapia adyuvante posterior en paciente con presencias de ctDNA postcirugía (165).

### 2. Eficacia y Limitaciones de las Biopsias Líquidas

Un aspecto clave de esta investigación es la validación de los protocolos utilizados para la detección y caracterización de CTCs y ctDNA. Los resultados obtenidos previamente indican que estos métodos **tienen un gran potencial como biomarcadores en la**

**evaluación del riesgo de recaída y metástasis en pacientes con cáncer de colon.**  
(166) (167).

Sin embargo, a pesar de los avances significativos, existen limitaciones inherentes a estas técnicas, como la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de las diferentes plataformas utilizadas, especialmente en el caso de las CTCs (IsofluxTM® versus Cellsearch® o microscopia frente a ImageStreamX®) o con el aislamiento de ctDNA (Maxwell® versus métodos manuales usando columnas). Esta variabilidad puede influir en la consistencia de los resultados, lo que plantea la necesidad de estandarizar las técnicas y mejorar la reproducibilidad (168).

### **3. Valor Pronóstico de las CTCs y ctDNA**

La **presencia y la cantidad de CTCs y ctDNA en las muestras de sangre se correlacionan con el riesgo de recidiva**, según los análisis realizados en esta tesis. La detección de CTCs antes y después de la cirugía ofrece información crucial sobre el pronóstico del paciente, sugiriendo que una mayor cantidad de CTCs está asociada con un peor desenlace clínico, si bien un elevado número de CTCs no tiene por qué estar relacionado con la recidiva tumoral o metástasis, ya que se conoce que intervienen numerosos agentes que impiden la proliferación celular de estas. Abdalla et al, en CCR detectaron CTCs en un 25 % de los pacientes en estadio I, un 33.3% en estadio II, un 26.3% en estadio III y un 63.6% en estadio IV en una muestra de 68 pacientes, si bien sólo en el 50 % de ellos se confirmó la presencia de metástasis durante el seguimiento (169). Esto podría estar relacionado con el concepto de “dormancia” de las CTCs, que consiste en que estas pasan a un estado de reposo o no proliferación, siendo menos susceptibles a la acción de quimioterápicos y pudiendo reactivarse en un futuro, dando lugar a la metástasis tardía.

Los resultados obtenidos son similares a estudios previos, si bien, las características de nuestro estudio (criterios de exclusión) y la innovación de él nos impiden realizar comparaciones exactas con otros estudios similares.

Por una parte, **nuestra tasa de detección de CTCs fue del 50 % con una mediana de 3.5 CTCs/5ml** de los pacientes analizados **previo a la cirugía**, mientras que la tasa de detección de CTCs de los pacientes analizados **tras la cirugía fue del 28.57 % con**

**una mediana de 4.5 CTCs/5ml.** Estos resultados son esperables tras haberse reseado teóricamente la causa productora de CTCs, si bien el aumento de la mediana de la muestra postcirugía se debe al valor extremo encontrado en uno de ellos (12 CTCs/5 ml). En el estudio de Xu et al., no se incluyó recuento de CTCs previo a la cirugía, pero en cambio tras la cirugía se detectaron CTCs en un 14.3%, 30.2% y 41.3% en estadios I,II,III respectivamente, con una mediana de 6 CTCs/5ml (162). Además, Xu reseña en su estudio que el 19.1% de los pacientes tenía CTCs agrupadas en clústeres, tuvieron una peor supervivencia libre de progresión en comparación con aquellos que solo tenían CTCs sin clústeres ( $p = 0.011$ ). En nuestro estudio, en la muestra previa a la intervención se detecta en 28.57 % de los pacientes la presencia de clústeres, mientras que en un 62.5% de estos con CTCs positivas tras la intervención quirúrgica, datos que podrían estar explicados por la mayor sensibilidad de nuestra técnica de detección. Por otra parte, Rothé et al., observaron CTCs en el 6% de pacientes en estadio I,II,III previo a intervención quirúrgica y del 10% tras la cirugía (170), si bien en este caso incluían a pacientes que en el estadio III se había aplicado quimioterapia neoadyuvante. Van Dalum et al., aislaron un 24% de pacientes con CTCs previo a la cirugía con el sistema CellSearch® (171). Dizdar et al., detectaron con el sistema CellCollector® CTCs en un 41.3% de los pacientes previo a la cirugía, mientras que en los mismos pacientes con el sistema CellSearch® lo detectó en un 31.3% de los pacientes (172).

En cuanto a la **caracterización fenotípica de las CTCs, en las muestras prequirúrgicas**, destacó la presencia de una **subpoblación doble positiva para los marcadores BRAF-V600 y PD-L1**, la cual se observó en el 71.5% de los pacientes con CTCs. Este porcentaje aumentó ligeramente tras la cirugía, alcanzando al 75% de los pacientes con CTCs positivas tras la intervención quirúrgica, pudiéndose explicarse por la resistencia de las subpoblaciones más agresivas (doblemente positivas a BRAF-V600 y PD-L1) a la cirugía realizada. En contraste, la subpoblación doble negativa para BRAF-V600 y PD-L1 fue detectada en el 32.14% de los pacientes prequirúrgicos, disminuyendo al 19.05% tras la intervención quirúrgica, siendo esto concordante con la teoría de que la intervención quirúrgica eliminaría a las subpoblaciones menos agresivas.

La expresión de **BRAF-V600 se detectó en un 43% de los pacientes con CTCs** antes de la cirugía, con una distribución equitativa entre hombres y mujeres. Estos resultados muestran una mayor proporción de CTCs BRAF-V600 que en otros estudios. Ueda et al., detectó la mutación BRAFV600 en el 10.3% de los pacientes estadio I-III mediante

PCR digital en gotas (173). Esperablemente, tras la intervención, esta frecuencia disminuyó al 25% de los pacientes con CTCs, y todas las muestras positivas correspondieron exclusivamente a mujeres. Este resultado es coherente con lo esperado, ya que la cirugía debería reducir la carga tumoral. No obstante, el predominio de esta mutación en mujeres postquirúrgicas sugiere la posibilidad de que la persistencia de estas subpoblaciones podría estar influenciada por factores genéticos u hormonales (174), aunque esta hipótesis debe interpretarse con cautela debido al tamaño limitado de la muestra.

La expresión de **PD-L1 en las muestras prequirúrgicas presentó una localización exclusivamente nuclear, observándose en el 36% de los pacientes con CTCs. Esta proporción aumentó tras la cirugía y se observó un cambio en la localización de la expresión, siendo predominantemente citoplasmática en todos los pacientes excepto uno de sexo masculino, quien mantuvo una localización nuclear.** Este cambio en la distribución subcelular de PD-L1 podría estar relacionado con un mecanismo de adaptación celular que facilite la recidiva o metástasis posterior, al ser necesario la expresión de PD-L1 citoplasmático para la transición epitelio-mesénquima (175), si bien no se ha confirmado durante nuestro seguimiento previsto de 2 años en los pacientes que lo presentaron.

En lo relacionado al marcador **CD45, el 78.6% de los pacientes con CTCs presentaba subpoblaciones positivas en las muestras prequirúrgicas, sin diferencias entre sexos. Tras la cirugía, este porcentaje disminuyó al 50%**, con una mayor prevalencia en mujeres. La expresión de CD45 en las CTCs puede señalar mecanismos complejos de evasión inmunitaria aún no completamente aclarados. No obstante, Yang et al., observaron un mayor porcentaje de CTCs CD 45+ en pacientes con mayor incidencia de metástasis sugiriendo que las CTCs CD 45 + provocan un entorno inmunosupresor ya que forman interacciones entre las CTCs y los linfocitos T inhibiendo la sinapsis TCR-pMHC y por tanto una respuesta inmunitaria suprimida (176). La reducción del porcentaje de subpoblaciones CD45 positivas en las muestras postquirúrgicas podría estar relacionada con la reducción esperable de la carga tumoral.

Asimismo, **el análisis de ctDNA** proporciona información adicional sobre la carga tumoral y la dinámica de la enfermedad, especialmente en lo que respecta a la fragmentación del ADN y la concentración de ctDNA en el plasma. Estos datos confirman que el ctDNA puede ser un marcador útil no solo para la detección de

recidivas sino también para monitorizar la eficacia del tratamiento y la aparición de resistencias farmacológicas durante el proceso.

En relación con la **concentración de ctDNA**, en nuestro trabajo se apreció una cantidad significativamente **mayor en pacientes con CC que en controles** sanos tanto en las muestras basales como en el seguimiento a un mes, concordando con lo publicado previamente (177) (178). Tie et al., destacaron el posible uso del ctDNA para detectar enfermedad mínima residual en pacientes sometidos a cirugía (estadios II y III) (149), siendo este el factor predictor independiente más fuerte de supervivencia libre de recaída, incluso mayor a cualquier factor de riesgo clínico-patológico individual o cualquier combinación de ellos para predecir recurrencia. Henriksen et al. en pacientes en estadio III tras la intervención quirúrgica monitorizaron los niveles de ctDNA, observando que, en pacientes con niveles elevados, el riesgo de recurrencia era de 7 veces mayor a los que no lo presentaban y permitía adelantarse en 6 meses a la recurrencia observada en técnicas de imagen (TC abdomino-pélvico) (179).

En nuestro trabajo, llama la atención la **mayor concentración de ctDNA en pacientes en estadio II**. Estos hallazgos no han sido igual de relevantes (no se encontraron diferencias significativas) en el resto de los estadios. Esto podría estar explicado debido al mayor número de pacientes en estadio II en nuestro trabajo, siendo el poder estadístico mucho mayor que en el resto de los estadios.

La mayor concentración de cfDNA observada en los pacientes que han recibido quimioterapia podría ser explicado por la mayor tasa de necrosis tisular en estos pacientes debido al uso de estos fármacos, así como la mayor carga tumoral que estos pacientes suelen presentar con respecto a los pacientes de estadios menores (180).

Con respecto al análisis del perfil fragmentómico, los **pacientes con CC presentaron fragmentos de cfDNA de menor tamaño que los controles (100-200pb) tanto en la muestra basal como en el seguimiento**, siendo el de los controles de mayor tamaño (> 200 pb). Estos resultados concuerdan con el conocimiento previo, siendo los fragmentos de ctDNA menores generalmente a los 150-200 pb (181) (182). Esto puede estar relacionado a que el cfDNA proviene generalmente de procesos apoptóticos controlados dando lugar a fragmentos mayores y más similares, al contrario que el cfDNA de origen tumoral (183). Esto se podría deber a que el ctDNA se produce generalmente en procesos necróticos, produciéndose fragmentos más cortos y menos uniformes. También el tejido tumoral y el microambiente que lo sustenta libera el ADN

de forma más abrupta y descontrolada, lo que facilita la degradación del ADN por nucleasas (DNASE1 y DNASE1L3) y otras enzimas degradativas al estar el ctDNA más hipometilado que el cfDNA (184).

Por último, la relación entre el análisis de los fragmentos del cfDNA y las variables clínico-patológicas sólo fue relevante en relación al sexo, siendo **la frecuencia de fragmentos cortos mayor en mujeres** que en hombres, no obstante, la baja representación en nuestra muestra limita la posibilidad de extraer conclusiones definitivas al respecto.

#### 4. Comparación entre CTCs y ctDNA

Uno de los hallazgos más significativos de esta tesis es la **concordancia observada entre los resultados de CTCs y ctDNA en muestras pre y postquirúrgicas**. Esta correlación refuerza la hipótesis de que la combinación de ambos biomarcadores puede ofrecer una imagen más exhaustiva del estado del cáncer en cada paciente. No obstante, también se evidenciaron diferencias en la sensibilidad de cada método, lo que sugiere que podrían ser complementarios en lugar de intercambiables en la práctica clínica. Germano et al., compararon la detección de ctDNA con CTCs en pacientes con CCR metastásico detectando la presencia de ctDNA en la totalidad de los pacientes estudiados, mientras que las CTCs solo se observaron en un tercio de ellos, evidenciando la distinta sensibilidad comentada anteriormente (185).

Este enfoque combinado ha sido investigado en otros tumores sólidos. El estudio de Xie et al. demostró que las CTCs y el ctDNA tienen aplicaciones complementarias en pacientes con cáncer de pulmón: las CTCs se utilizaron para identificar mutaciones somáticas y ofrecer un perfil genético en tiempo real, mientras que el ctDNA fue más eficaz en la monitorización dinámica de la respuesta al tratamiento y la carga tumoral residual (186). Del mismo modo, en los estudios de Kong et al. sobre cáncer de pulmón y mama, el ctDNA reflejaba predominantemente el clon dominante del tumor, mientras que las CTCs proporcionaban información crucial sobre subclones raros y agresivos (187).

Por su parte, Zhang et al. observaron en cáncer de mama que los pacientes en estadio IV con más de cinco agrupaciones de CTCs presentaban una menor supervivencia libre

de progresión. Además, se encontraron mutaciones en ctDNA en los genes PIK3CA y ESR1, asociadas a metástasis y peor pronóstico en términos de supervivencia, lo que subraya la importancia de estos biomarcadores en la evaluación clínica del cáncer avanzado (188).

## 5. Impacto Clínico y Futuras Aplicaciones

Los resultados de esta tesis subrayan la importancia de implementar estrategias de seguimiento más precisas en pacientes con cáncer de colon. El uso de biopsias líquidas podría reducir la dependencia de procedimientos invasivos como las colonoscopias repetidas y las pruebas de imagen radiológicas, disminuyendo así los riesgos asociados y el costo para los sistemas de salud. Además, estas técnicas podrían permitir intervenciones más tempranas y personalizadas, mejorando potencialmente los resultados para los pacientes.

No obstante, para una implementación más amplia, será fundamental realizar estudios adicionales con un mayor número de pacientes y en diferentes contextos clínicos para validar los hallazgos y establecer protocolos de uso clínico estándar.

**El análisis del número y de las subpoblaciones de CTCs** proporciona una **visión detallada de la capacidad de diseminación tumoral y la heterogeneidad celular**, en tiempo real, identificando las subpoblaciones más prevalentes y resistentes en diferentes momentos clínicos. Esto facilita la selección de terapias dirigidas más efectivas. En particular, la capacidad de las CTCs para reflejar dinámicamente la evolución clonal del tumor las convierte en un biomarcador valioso para la personalización del tratamiento oncológico.

Por otro lado, el ctDNA ha demostrado ser una herramienta eficaz para la monitorización del tratamiento, proporcionando una evaluación no invasiva y en tiempo real de la carga tumoral residual. El **análisis del perfil fragmentómico del ctDNA** ofrece información crucial para la **detección de la enfermedad mínima residual y el monitoreo de la heterogeneidad tumoral**, así como la identificación de mutaciones asociadas a resistencias terapéuticas (como KRAS, NRAS, BRAF). En el caso del cáncer colorrectal en estadio II, donde la indicación de quimioterapia adyuvante sigue siendo controversial, la monitorización de los niveles de ctDNA después de la intervención quirúrgica podría

ayudar a identificar a los pacientes que más se beneficiarían de un tratamiento adyuvante. La presencia de ctDNA detectable tras la cirugía podría indicar enfermedad residual mínima, lo que justificaría el uso de quimioterapia para prevenir recaídas, mejorando así la toma de decisiones clínicas en el manejo del cáncer colorrectal (149).

## 6. Fortalezas del estudio

Entre las fortalezas de este trabajo se destacan varios aspectos innovadores y metodológicos que han contribuido significativamente a la calidad de los resultados obtenidos:

- **Protocolo Semiautomatizado:** La implementación de un protocolo semiautomatizado que **combina las tecnologías IsoFlux™ e ImageStreamX®** es otro punto fuerte de este trabajo. Esta combinación, especialmente el uso de ImageStreamX®, evita el recuento manual con microscopio, reduciendo así el posible error humano y aumentando la precisión de los resultados. Este enfoque ha sido bien recibido en la comunidad científica, como lo demuestra el número de citas que ha recibido nuestro artículo, validando así esta tesis doctoral.
- **Combinación de CTCs y ctDNA:** La integración del estudio de estos biomarcadores en una única muestra permite aprovechar sinérgicamente las ventajas de ambos enfoques. Además, la evaluación de estos marcadores en dos momentos clave de la enfermedad (en el estado basal y un mes después de la cirugía) ha permitido profundizar en la dinámica de estos biomarcadores tras un procedimiento considerado curativo, como es la cirugía.
- **Estadios precoces:** La realización del estudio en estadios precoces aporta originalidad al trabajo. La mayoría de los estudios de CTCs y ctDNA hasta la fecha se basan en estadios avanzados (estadio IV o metastásicos), dirigidos fundamentalmente a monitorización de la enfermedad tras el tratamiento oncológico. Este enfoque hacia estadios precoces nos permite ahondar en la idea de “**cancer interception**” y poner punto de partida hacia el seguimiento de los pacientes de alto riesgo de recidiva o metástasis.

## 7. Limitaciones del estudio

El estudio presenta varias limitaciones que deben ser consideradas:

1. **Tamaño de la Muestra:** La principal limitación es el reducido tamaño de la muestra, lo cual puede afectar a la generalización de los resultados. Este problema se debió en gran parte a la **pandemia del virus SARS-COV-2**, que obligó a suspender el proyecto durante aproximadamente un año (10 meses) del cronograma previsto de recolección de muestras (24 meses). Esto impidió la obtención de sangre periférica un mes después de la cirugía, ya que se suspendieron las consultas presenciales y se reemplazaron por consultas telefónicas en nuestro hospital. Esta dificultad inesperada, junto con las actualizaciones y refinamientos del protocolo innovador, provocó la pérdida de 31 pacientes.
2. **Impacto del Tamaño de la Cohorte:** El tamaño reducido de la cohorte puede haber sido determinante para no obtener resultados estadísticamente significativos, especialmente en el caso de las CTCs.
3. **Dificultad en el análisis y procesamiento de la muestra:** Como se ha mencionado previamente, la complejidad en el procesamiento de las muestras, junto con la utilización de tecnologías innovadoras para el aislamiento y caracterización de las muestras, ha llevado a una reducción en el número de pacientes incluidos y ha dificultado la comparabilidad con otros estudios.

## E. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La investigación presentada proporciona una base sólida para considerar las biopsias líquidas como herramientas útiles en el manejo del cáncer de colon, especialmente en estadios precoces. Se recomienda la continuación de estudios multicéntricos que incluyan muestras más grandes y diversos subgrupos de pacientes para confirmar la utilidad clínica de estas técnicas. Además, es crucial desarrollar estándares internacionales para la evaluación y uso de CTCs y ctDNA, lo que facilitará su integración en la práctica clínica rutinaria. La Sociedad Internacional de Biopsia Líquida (ISLB) está apostando por este reto, integrando a distintos profesionales internacionales y elaborando guías que faciliten esta labor (189). Otro punto fundamental en referencia a la evolución del Cáncer Colorrectal en las siguientes décadas es mejorar el camino hacia la detección precoz de este basándose en métodos no invasivos que permitan conocer en tiempo real las características morfológicas y fenotípicas cambiantes del tumor, su heterogeneidad y su microambiente circundante, así como sus mecanismos de escape inmunológico y resistencia farmacológica. Esto permitirá controlar y erradicar las distintas subpoblaciones de células tumorales antes de que puedan proliferar hacia una recidiva local o enfermedad metastásica. Al hacerlo, no solo se mitigará el impacto humano de la enfermedad, sino que también se reducirá la carga financiera sobre el **Sistema de Salud Público Español. Un sistema universal, accesible, que ha sido y sigue siendo el pilar fundamental de nuestra sociedad moderna, y que debe mantenerse fuerte e inquebrantable para asegurar nuestro progreso como una comunidad avanzada y equitativa, que iguale los derechos de todos sus integrantes, al menos, en lo que a la salud se refiere.**

## **F. FINANCIACIÓN**

Estos resultados fueron obtenidos con el apoyo financiero obtenido de la realización de la propuesta “687785 Project Acronyms LIQBIOPSENS” dentro de los fondos de financiación Horizonte 2022 de la Unión Europea para la investigación e innovación.

## G. REFERENCIAS

1. Putz RV, Pabst R, Sobotta. Atlas de Anatomía Humana. Tomo 2. Tronco, vísceras y miembro inferior. 22ª ed. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2006. 408 p.
2. Wheater's functional histology: a text and colour atlas. 6ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier; pp. 251-286.
3. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin. 2021;71:7.
4. Sociedad Española de Patología Digestiva. Libro blanco sobre el cribado poblacional de cáncer colorrectal en España. Sociedad Española de Patología Digestiva; 2024. Disponible en: <https://www.sepd.es>
5. Islami F, Ward EM, Sung H, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, Part 1: National Cancer Statistics. J Natl Cancer Inst. 2021.
6. Stoffel EM, Murphy CC. Epidemiology and Mechanisms of the Increasing Incidence of Colon and Rectal Cancers in Young Adults. Gastroenterology. 2020;158:341.
7. Tawadros PS, Paquette IM, Hanly AM, et al. Adenocarcinoma of the rectum in patients under age 40 is increasing: impact of signet-ring cell histology. Dis Colon Rectum. 2015;58:474.
8. US Preventive Services Task Force, Davidson KW, Barry MJ, et al. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. JAMA. 2021;325:1965.
9. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010;60:277.
10. Schoenfeld P, Cash B, Flood A, et al. Colonoscopic screening of average-risk women for colorectal neoplasia. N Engl J Med. 2005;352:2061.
11. Park JM, Choi MG, Kim SW, et al. Increased incidence of colorectal malignancies in renal transplant recipients: a case control study. Am J Transplant. 2010;10:2043.
12. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. Am J Epidemiol. 2015;181:832.
13. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, et al. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. J Natl Cancer Inst. 1999;91:620.
14. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. JAMA. 2005;293:172.

15. Norat T, Bingham S, Ferrari P, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:906.
16. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, et al. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA.* 2008;300:2765.
17. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol.* 2011;22:1958.
18. Lagergren J, Ye W, Ekblom A. Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis? *Gastroenterology.* 2001;121:542.
19. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med.* 1990;323:1228.
20. Rutter MD. Surveillance programmes for neoplasia in colitis. *J Gastroenterol.* 2011;46 Suppl 1:1.
21. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med.* 1992;326:658.
22. UpToDate. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors [Internet]. [Último acceso el 03/03/2024]. Disponible en: <https://ptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors?>
23. Taylor DP, Stoddard GJ, Burt RW, et al. How well does family history predict who will get colorectal cancer? Implications for cancer screening and counseling. *Genet Med.* 2011;13:385.
24. Van Leerdam ME, Roos VH, van Hooft JE, et al. Endoscopic management of Lynch syndrome and of familial risk of colorectal cancer: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy.* 2019;51(11):1082-1093. doi: 10.1055/a-1016-4977.
25. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, et al. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2017;3:464.
26. Jenkins MA, Dowty JG, Ait Ouakrim D, et al. Short-term risk of colorectal cancer in individuals with lynch syndrome: a meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2015;33:326.
27. Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, et al. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1365.
28. Cristofaro MG, Giudice A, Amantea M, et al. Gardner's syndrome: a clinical and genetic study of a family. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;115.

29. Groen EJ, Roos A, Muntinghe FL, et al. Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis. *Ann Surg Oncol*. 2008;15:2439.
30. Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:3039.
31. UpToDate. Clinical presentation, diagnosis, and staging of colorectal cancer [Internet]. [Último acceso el 02/02/2021]. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-diagnosis-and-staging-of-colorectal-cancer?>
32. Thompson MR, O'Leary DP, Flashman K, et al. Clinical assessment to determine the risk of bowel cancer using Symptoms, Age, Mass and Iron deficiency anaemia (SAMI). *Br J Surg*. 2017;104:1393.
33. Bressler B, Paszat LF, Chen Z, et al. Rates of new or missed colorectal cancers after colonoscopy and their risk factors: a population-based analysis. *Gastroenterology*. 2007;132:96.
34. Baxter NN, Sutradhar R, Forbes SS, et al. Analysis of administrative data finds endoscopist quality measures associated with postcolonoscopy colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2011;140:65.
35. Macari M, Berman P, Dicker M, et al. Usefulness of CT colonography in patients with incomplete colonoscopy. *AJR Am J Roentgenol*. 1999;173:561.
36. Atkin W, Dadswell E, Wooldrage K, et al. Computed tomographic colonography versus colonoscopy for investigation of patients with symptoms suggestive of colorectal cancer (SIGGAR): a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2013;381:1194.
37. Biscaldi E, Barra F, Leone Roberti Maggiore U, Ferrero S. Other imaging techniques: Double-contrast barium enema, endoscopic ultrasonography, multidetector CT enema, and computed tomography colonoscopy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2021;71:64-77. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2020.05.011.
38. Rex DK, Rahmani EY, Haseman JH, et al. Relative sensitivity of colonoscopy and barium enema for detection of colorectal cancer in clinical practice. *Gastroenterology*. 1997;112:17.
39. Konishi T, Shimada Y, Hsu M, et al. Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome. *JAMA Oncol*. 2018;4:309.
40. Liu Z, Zhang Y, Niu Y, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. *PLoS One*. 2014;9.
41. Brenner H, Tao S, Haug U. Low-dose aspirin use and performance of immunochemical fecal occult blood tests. *JAMA*. 2010;304:2513.

42. Robertson DJ, Lee JK, Boland CR, et al. Recommendations on fecal immunochemical testing to screen for colorectal neoplasia: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Gastrointest Endosc.* 2017;85:2.
43. Lin JS, Piper MA, Perdue LA, et al. Screening for Colorectal Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA.* 2016;315:2576.
44. Pignone M, Campbell MK, Carr C, Phillips C. Meta-analysis of dietary restriction during fecal occult blood testing. *Eff Clin Pract.* 2001;4:150.
45. Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, et al. Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Ann Intern Med.* 2008;149:441.
46. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med.* 2014;370:1287.
47. Rabeneck L, Paszat LF, Hilsden RJ, et al. Bleeding and perforation after outpatient colonoscopy and their risk factors in usual clinical practice. *Gastroenterology.* 2008;135:1899.
48. Brenner H, Stock C, Hoffmeister M. Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *BMJ.* 2014;348
49. Brenner H, Haug U, Arndt V, et al. Low risk of colorectal cancer and advanced adenomas more than 10 years after negative colonoscopy. *Gastroenterology.* 2010;138:870.
50. Elmunzer BJ, Hayward RA, Schoenfeld PS, et al. Effect of flexible sigmoidoscopy-based screening on incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med.* 2012;9.
51. Rex DK, Adler SN, Aisenberg J, et al. Accuracy of capsule colonoscopy in detecting colorectal polyps in a screening population. *Gastroenterology.* 2015;148:948.
52. Kim DH, Pickhardt PJ, Taylor AJ, et al. CT colonography versus colonoscopy for the detection of advanced neoplasia. *N Engl J Med.* 2007;357:1403.
53. Junta de Andalucía. Conserjería de Salud y Familias. Información sobre el Programa de Cribado de Cáncer de Colon [Internet]. [Último acceso el 14/02/2023]. Disponible en:  
<https://www.juntadeandalucia.es/organismos/saludyfamilias/areas/planificacion/plan-integral/paginas/cribado-cancer-colon.html>
54. Jessup JM, Goldberg RM, Aware EA, et al. Colon and Rectum. In: Amin MB, editor. *AJCC Cancer Staging Manual.* 8th ed. Chicago: AJCC; 2017. p. 251. Corrected at 4th printing, 2018.

55. Horton KM, Abrams RA, Fishman EK. Spiral CT of colon cancer: imaging features and role in management. *Radiographics*. 2000;20:419.
56. Thoeni RF. Colorectal cancer. Radiologic staging. *Radiol Clin North Am*. 1997;35:457.
57. Kirke R, Rajesh A, Verma R, Bankart MJ. Rectal cancer: incidence of pulmonary metastases on thoracic CT and correlation with T staging. *J Comput Assist Tomogr*. 2007;31:569.
58. Nordholm-Carstensen A, Wille-Jørgensen PA, Jørgensen LN, Harling H. Indeterminate pulmonary nodules at colorectal cancer staging: a systematic review of predictive parameters for malignancy. *Ann Surg Oncol*. 2013;20:4022.
59. Niekel MC, Bipat S, Stoker J. Diagnostic imaging of colorectal liver metastases with CT, MR imaging, FDG PET, and/or FDG PET/CT: a meta-analysis of prospective studies including patients who have not previously undergone treatment. *Radiology*. 2010;257:674.
60. Whiteford MH, Whiteford HM, Yee LF, et al. Usefulness of FDG-PET scan in the assessment of suspected metastatic or recurrent adenocarcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum*. 2000;43:759.
61. Serrano PE, Gu CS, Moulton CA, et al. Effect of PET-CT on disease recurrence and management in patients with potentially resectable colorectal cancer liver metastases. Long-term results of a randomized controlled trial. *J Surg Oncol*. 2020;121:1001.
62. Albéniz E, Pellisé M, Gimeno García AZ, et al. Clinical guidelines for endoscopic mucosal resection of non-pedunculated colorectal lesions. *Gastroenterol Hepatol*. 2018;41(3):175-90. doi: 10.1016/j.gastrohep.2017.08.013.
63. Proceso Asistencial Integrado del Cáncer Colorrectal. 3º Edición, 2018. Consejería de Salud. Junta de Andalucía [Internet]. Disponible en: [https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/PAI\\_Cancer\\_colorrectal\\_v6.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/PAI_Cancer_colorrectal_v6.pdf)
64. Meiri E, Garrett-Mayer E, Halabi S, et al. Pembrolizumab (P) in patients (Pts) with colorectal cancer (CRC) with high tumor mutational burden (HTMB): Results from the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry (TAPUR) Study. [abstract] *J Clin Oncol*. 2020;38(4\_suppl):133-133.
65. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010. p. 143.
66. Panarelli NC, Schreiner AM, Brandt SM, et al. Histologic features and cytologic techniques that aid pathologic stage assessment of colonic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:1252.

67. Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, et al. Value of tumor size as a prognostic variable in colorectal cancer: a critical reappraisal. *Am J Clin Oncol*. 2011;34:43.
68. Amin MB, editor. Principles of Cancer Staging. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Chicago: AJCC; 2017. p. 29.
69. Wittekind C, Compton C, Quirke P, et al. A uniform residual tumor (R) classification: integration of the R classification and the circumferential margin status. *Cancer*. 2009;115:3483.
70. Rahbari NN, Bork U, Motschall E, et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2012;30:60.
71. Nagtegaal ID, Knijn N, Hugen N, et al. Tumor Deposits in Colorectal Cancer: Improving the Value of Modern Staging-A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Oncol*. 2017;35:1119.
72. Delattre JF, Cohen R, Henriques J, et al. Prognostic Value of Tumor Deposits for Disease-Free Survival in Patients With Stage III Colon Cancer: A Post Hoc Analysis of the IDEA France Phase III Trial (PRODIGE-GERCOR). *J Clin Oncol*. 2020;38:1702.
73. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer*. 2012;118:628.
74. Peng J, Sheng W, Huang D, et al. Perineural invasion in pT3N0 rectal cancer: the incidence and its prognostic effect. *Cancer*. 2011;117:1415.
75. Blenkinsopp WK, Stewart-Brown S, Blesovsky L, et al. Histopathology reporting in large bowel cancer. *J Clin Pathol*. 1981;34:509.
76. Oh BY, Park YA, Huh JW, et al. Prognostic Impact of Tumor-Budding Grade in Stages 1-3 Colon Cancer: A Retrospective Cohort Study. *Ann Surg Oncol*. 2018;25:204.
77. Mohd Suan MA, Tan WL, Soelar SA, et al. Intestinal obstruction: predictor of poor prognosis in colorectal carcinoma? *Epidemiol Health*. 2015;37.
78. Chen HS, Sheen-Chen SM. Obstruction and perforation in colorectal adenocarcinoma: an analysis of prognosis and current trends. *Surgery*. 2000;127:370.
79. Kim CG, Ahn JB, Jung M, et al. Preoperative Serum Carcinoembryonic Antigen Level as a Prognostic Factor for Recurrence and Survival After Curative Resection Followed by Adjuvant Chemotherapy in Stage III Colon Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2017;24:227.
80. Taieb J, Shi Q, Pederson L, et al. Prognosis of microsatellite instability and/or mismatch repair deficiency stage III colon cancer patients after disease recurrence

following adjuvant treatment: results of an ACCENT pooled analysis of seven studies. *Ann Oncol.* 2019;30:1466.

81. Liu GC, Liu RY, Yan JP, et al. The Heterogeneity Between Lynch-Associated and Sporadic MMR Deficiency in Colorectal Cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110:975.

82. Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, et al. Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clin Cancer Res.* 2017;23:4753.

83. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol.* 2010;28:466.

84. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol.* 2016;27:1746.

85. Taieb J, Le Malicot K, Shi Q, et al. Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109.

86. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Colorectal Cancer. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program [Internet]. Consultado el 22/03/2022 a las 13:52 horas. Disponible en: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>

87. Red Española de Registros de Cáncer. Supervivencia de cáncer en España 2002-2013 [Internet]. Consultado el 22/03/2022 a las 11:09 horas. Disponible en: <https://redecancer.org/storage/documents/3878edcf-11e6-43c8-93dd-157a5ada4fb2.pdf>

88. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61:759-67. PMID: 2188735.

89. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487:330-7. PMID: 22810696.

90. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2020;158(2):291-302. doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.059.

91. Parejas Díaz JA. Análisis de las vías de carcinogénesis del cáncer colorrectal sincrónico no hereditario [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid; 2017. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/44716/1/T39294.pdf>

92. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 2007;13(28):3784-91. doi: 10.3748/wjg.v13.i28.3784.

93. Kitisin K, Mishra L. Molecular biology of colorectal cancer: new targets. *Semin Oncol.* 2006;33(6 Suppl 11). doi: 10.1053/j.seminoncol.2006.10.003.

94. Barbier M, Attoub S, Calvez R, et al. Tumour biology. Weakening link to colorectal cancer? *Nature*. 2001;413(6858):796. doi: 10.1038/35101660.
95. Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2002;20(18 Suppl):1S-13S.
96. Élez Fernández ME. Nuevas terapias en cáncer colorrectal metastásico refractario: papel de los fármacos que interfieren en la vía de MET e integrinas [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona; 2015. Disponible en: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/308313/meef1de1.pdf>
97. Prior IA, Leviw PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2012;72(10):2457-67.
98. Forbes SA, Bhamra G, Bamford S. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet*. 2008; Chapter 1010-1.
99. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2008.
100. Sulpice E, Ding S, Muscatelli-Groux B, et al. Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. *Biol Cell*. 2009;101(9):525-39.
101. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2013;3(6):658-73.
102. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 2009;30:377-86. PMID: 19136477.
103. Bellam N, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat Res*. 2010;155:85-103.
104. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58:5248-57.
105. Umar A, Risinger JI, Hawk ET, et al. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:153-8.
106. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372:2509-20. PMID: 26028255.
107. Burgess NG, Tuticci NJ, Pellise M, et al. Sessile serrated adenomas/polyps with cytologic dysplasia: a triple threat for interval cancer. *Gastrointest Endosc*. 2014;80:307-10. PMID: 24890425.

108. Fang M, Ou J, Hutchinson L, et al. The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG Island Methylator phenotype. *Mol Cell*. 2014;55:904-15. PMID: 25219500.
109. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21:1350-6.
110. Serrano MJ, Garrido-Navas MC, Diaz Mochon JJ, et al. Precision Prevention and Cancer Interception: The New Challenges of Liquid Biopsy. *Cancer Discov*. 2020;10(11):1635-44. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-0466. PMID: 33037026.
111. Álvarez-Alegret R, Rojo Todo F, Garrido P et al. Biopsia líquida en oncología: Consenso de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) [Liquid biopsy in oncology: A consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology]. *Rev Esp Patol*. 2020;53(4):234–45. doi:10.1016/j.patol.2019.12.001.
112. Armakolas A, Kotsari M, Koskinas J. Liquid Biopsies, Novel Approaches and Future Directions. *Cancers*. 2023;15(5):1579. doi:10.3390/cancers15051579.
113. Malla M, Loree JM, Kasi PM, Parikh AR. Using Circulating Tumor DNA in Colorectal Cancer: Current and Evolving Practices. *J Clin Oncol*. 2022;40(24):2846–57. doi:10.1200/JCO.21.02615.
114. Raza A, Khan AQ, Inchakalody VP, et al. Dynamic liquid biopsy components as predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41(1):99. doi: 10.1186/s13046-022-02318-0. PMID: 35292091.
115. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov*. 2021;11(4):858-73. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1311. PMID: 33811121.
116. Ding Z, Wang N, Ji N, et al. Proteomics technologies for cancer liquid biopsies. *Mol Cancer*. 2022;21(1):53. doi: 10.1186/s12943-022-01526-8. PMID: 35168611.
117. Malayaperumal S, Sriramulu S, Jothimani G, et al. A Review of AEG-1 Oncogene Regulating MicroRNA Expression in Colon Cancer Progression. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2021;21(1):27-34. doi: 10.2174/1871530320666200618104116. PMID: 32552658.
118. Antunes-Ferreira M, Koppers-Lalic D, Würdinger T. Circulating platelets as liquid biopsy sources for cancer detection. *Mol Oncol*. 2021;15(6):1727-43. doi: 10.1002/1878-0261.12859. PMID: 33219615.
119. Puche Sanz I. Identificación y caracterización de células tumorales circulantes (CTCs) como herramienta pronóstica y predictiva en pacientes con cáncer de próstata [Tesis doctoral]. Universidad de Granada; 2017. Disponible en: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/48977/28872459.pdf>.

120. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8152-62.
121. Smith HA, Kang Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J Mol Med (Berl).* 2013;91:411-29.
122. Lemma S, Perrone AM, De Iaco P, Gasparre G, Kurelac I. Current methodologies to detect circulating tumor cells: a focus on ovarian cancer. *Am J Cancer Res.* 2021;11(9):4111-26. PMID: 34659879.
123. Toh JWT, Lim SH, MacKenzie S, de Souza P, Bokey L, Chapuis P, et al. Association between Microsatellite Instability Status and Peri-Operative Release of Circulating Tumour Cells in Colorectal Cancer. *Cells.* 2020;9:425.
124. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142(3-4):241-3. PMID: 18875018.
125. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One.* 2011;6(9). doi: 10.1371/journal.pone.0023418.
126. Tóth K, Patai ÁV, Kalmár A, Barták BK, Nagy ZB, Galamb O, et al. Circadian Rhythm of Methylated Septin 9, Cell-Free DNA Amount and Tumor Markers in Colorectal Cancer Patients. *Pathol Oncol Res.* 2017;23(3):699-706. doi: 10.1007/s12253-016-0174-2.
127. Yu SC, Lee SW, Jiang P, Leung TY, Chan KC, Chiu RW, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin Chem.* 2013;59(8):1228-37. doi: 10.1373/clinchem.2013.203679.
128. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989;46(5):318-22. doi: 10.1159/000226740.
129. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell.* 2016;164(1-2):57-68. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.050.
130. Gao Q, Zeng Q, Wang Z, Li C, Xu Y, Cui P, et al. Circulating cell-free DNA for cancer early detection. *Innovation (Camb).* 2022;3(4):100259. doi: 10.1016/j.xinn.2022.100259.
131. Thierry AR. Circulating DNA fragmentomics and cancer screening. *Cell Genom.* 2023;3(1):100242. doi: 10.1016/j.xgen.2022.100242.
132. Lehle S, Emons J, Hack CC, Heindl F, Hein A, Preuß C, et al. Evaluation of automated techniques for extraction of circulating cell-free DNA for implementation in standardized high-throughput workflows. *Sci Rep.* 2023;13(1):373. doi: 10.1038/s41598-022-27216-5.

133. Van Dessel LF, Vitale SR, Helmijr JCA, Wilting SM, van der Vlugt-Daane M, Oomen-de Hoop E, et al. High-throughput isolation of circulating tumor DNA: a comparison of automated platforms. *Mol Oncol*. 2019;13(2):392-402. doi: 10.1002/1878-0261.12415.
134. Streubel A, et al. Comparison of different semi-automated cfDNA extraction methods in combination with UMI-based targeted sequencing. *Oncotarget*. 2019;10:5690-702. doi: 10.18632/oncotarget.27183.
135. Huebner H, et al. Comparison of methods for isolation and quantification of circulating cell-free DNA from patients with endometriosis. *Reprod Biomed Online*. 2021;43:788-98. doi: 10.1016/j.rbmo.2021.08.004.
136. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 2017;9.
137. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multianalyte blood test. *Science*. 2018;359:926-30.
138. Lennon AM, Buchanan AH, Kinde I, Warren A, Honushefsky A, Cohain AT, et al. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention. *Science*. 2020;369.
139. Luo H, Zhao Q, Wei W, Zheng L, Yi S, Li G, et al. Circulating tumor DNA methylation profiles enable early diagnosis, prognosis prediction, and screening for colorectal cancer. *Sci Transl Med*. 2020;12.
140. Zhou H, Zhu L, Song J, Wang G, Li P, Li W, et al. Liquid biopsy at the frontier of detection, prognosis and progression monitoring in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2022;21(1):86. doi: 10.1186/s12943-022-01556-2.
141. Tsai WS, Watson D, Chang Y, Hsieh B, Shao HJ, Wu J, et al. Circulating tumor cell count from a blood sample for colorectal cancer (CRC) prevention: A 627-patient prospective study. *J Clin Oncol*. 2019;37:485.
142. Bork U, Rahbari NN, Schölch S, Reissfelder C, Kahlert C, Büchler MW, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *Br J Cancer*. 2015;112:1306-13.
143. Hinz S, Röder C, Tepel J, Hendricks A, Schafmayer C, Becker T, et al. Cytokeratin 20 positive circulating tumor cells are a marker for response after neoadjuvant chemoradiation but not for prognosis in patients with rectal cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:953.
144. Wu F, Zhu J, Mao Y, Li X, Hu B, Zhang D. Associations between the epithelial-mesenchymal transition phenotypes of circulating tumor cells and the Clinicopathological features of patients with colorectal cancer. *Dis Markers*. 2017;2017:9474532.

145. Zhong Y, Ma T, Qiao T, Hu H, Li Z, Luo K, et al. Role of phenotypes of circulating tumor cells in the diagnosis and treatment of colorectal Cancer. *Cancer Manag Res.* 2021;13:7077-85.
146. Raimondi L, Raimondi FM, Di Benedetto L, Cimino G, Spinelli GP. PD-L1 Expression on Circulating Tumour Cells May Be Predictive of Response to Regorafenib in Patients Diagnosed with Chemorefractory Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21:6907.
147. Satelli A, Batth IS, Brownlee Z, Rojas C, Meng QH, Kopetz S, et al. Potential role of nuclear PD-L1 expression in cell-surface vimentin positive circulating tumor cells as a prognostic marker in cancer patients. *Sci Rep.* 2016;6:28910.
148. Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, Sharma S, Salari R, Sethi H, et al. Analysis of plasma cell-free DNA by Ultradeep sequencing in patients with stages I to III colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5:1124-31.
149. Tie J, Cohen JD, Wang Y, Christie M, Simons K, Lee M, et al. Circulating tumor DNA analyses as markers of recurrence risk and benefit of adjuvant therapy for stage III Colon Cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5:1710-7.
150. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut.* 2014;63:317-25.
151. Kim TW, Peeters M, Thomas A, Gibbs P, Hool K, Zhang J, et al. Impact of emergent circulating tumor DNA RAS mutation in Panitumumab treated Chemoresistant metastatic colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24:5602-9.
152. Udagawa S, Ooki A, Shinozaki E, Fukuda K, Yamaguchi K, Osumi H. Circulating Tumor DNA: The Dawn of a New Era in the Optimization of Chemotherapeutic Strategies for Metastatic Colo-Rectal Cancer Focusing on RAS Mutation. *Cancers (Basel).* 2023;15(5):1473. doi: 10.3390/cancers15051473. PMID: 36900264.
153. Wang J, Yan F, Zhao Q, Zhan F, Wang R, Wang L, et al. Circulating exosomal miR-125a-3p as a novel biomarker for early-stage colon cancer. *Sci Rep.* 2017;7:4150.
154. Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, Takahashi Y, Kurashige J, Sawada G, et al. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2015;113:275-81.
155. Zhao YJ, Song X, Niu L, Tang Y, Song X, Xie L. Circulating Exosomal miR-150-5p and miR-99b-5p as diagnostic biomarkers for colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2019;9:1129.
156. Wang Q, Huang Z, Ni S, Xiao X, Xu Q, Wang L, et al. Plasma miR-601 and miR-760 are novel biomarkers for the early detection of colorectal cancer. *PLoS One.* 2012;7.

157. Peng ZY, Gu RH, Yan B. Downregulation of exosome-encapsulated miR-548c-5p is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Cell Biochem.* 2018;120:1457-63.
158. Ning T, Li J, He Y, Zhang H, Wang X, Deng T, et al. Exosomal miR-208b related with oxaliplatin resistance promotes Treg expansion in colorectal cancer. *Mol Ther.* 2021;29:2723-36.
159. Yang L, Jiang Q, Li DZ, Zhou X, Yu DS, Zhong J. TIMP1 mRNA in tumor-educated platelets is a diagnostic biomarker for colorectal cancer. *Aging (Albany NY).* 2019;11:8998-9012.
160. Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature.* 2019;570(7761):385-89.
161. Arrazubi V, Mata E, Antelo ML, Tarifa A, Herrera J, Zazpe C, et al. Circulating tumor cells in patients undergoing resection of colorectal cancer liver metastases: Clinical utility for long-term outcome: A prospective trial. *Ann Surg Oncol.* 2019;26:2805-11.
162. Xu Y, Zhang Q, Xu Z, Xie Q, Ding W, Liu H, Deng H. Association of circulating tumor cell-white blood cell clusters with survival outcomes in patients with colorectal cancer after curative intent surgery. *BMC Gastroenterol.* 2022;22(1):503.
163. Chu HY, Yang CY. Highly correlated recurrence prognosis in patients with metastatic colorectal cancer by synergistic consideration of circulating tumor cells/microemboli and tumor markers CEA/CA19-9. *Cells.* 2021;10(5):1149.
164. Nakamura Y, Taniguchi H, Ikeda M, Bando H, Kato K, Morizane C, et al. Clinical utility of circulating tumor DNA sequencing in advanced gastrointestinal cancer: SCRUM-Japan GI-SCREEN and GOZILA studies. *Nat Med.* 2020;26:1859-64.
165. Tie J, Cohen JD, Lahouel K, Lo SN, Wang Y, Kosmider S, et al. Circulating tumor DNA analysis guiding adjuvant therapy in stage II colon cancer. *N Engl J Med.* 2022;386(24):2261-72.
166. Parikh AR, Van Seventer EE, Siravegna G, Hartwig AV, Jaimovich A, He Y, et al. Minimal Residual Disease Detection using a Plasma-only Circulating Tumor DNA Assay in Patients with Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2021;27(20):5586–94. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0410>
167. Tsai KY, Huang PS, Chu PY, Nguyen TNA, Hung HY, Hsieh CH, et al. Current Applications and Future Directions of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer Recurrence. *Cancers.* 2024;16(13):2316. <https://doi.org/10.3390/cancers16132316>
168. Su B, et al. CTCs in colorectal cancer: Methods of detection and clinical significance. *J Mol Med.* 2020;98(6):789-802.

169. Abdalla TSA, Meiners J, Riethdorf S, König A, Melling N, Gorges T, et al. Prognostic value of preoperative circulating tumor cells counts in patients with UICC stage I-IV colorectal cancer. *PLoS One*. 2021;16(6)
170. Rothé F, Maetens M, Rouas G, Paesmans M, Van den Eynde M, Van Laethem JL, et al. CTCs as a prognostic and predictive biomarker for stage II/III colon cancer: A companion study to the PePiTA trial. *BMC Cancer*. 2019;19(1):304.
171. Van Dalum G, et al. Circulating tumor cells in non-metastatic colorectal cancer: A CellSearch study. *Int J Cancer*. 2015;136(3):530-39.
172. Dizdar L, Fluegen G, van Dalum G, Honisch E, Neves RP, Niederacher D, et al. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer patients using the GILUPI CellCollector: Results from a prospective, single-center study. *Mol Oncol*. 2019;13(7):1548-58.
173. Ueda K, Yamada T, Ohta R, Matsuda A, Sonoda H, Kuriyama S, et al. BRAF V600E mutations in right-side colon cancer: Heterogeneity detected by liquid biopsy. *Eur J Surg Oncol*. 2022;48(6):1375–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2022.01.016>
174. Javed S, Benoist S, Devos P, Truant S, Guimbaud R, Lievre A, et al. Prognostic factors of BRAF V600E colorectal cancer with liver metastases: A retrospective multicentric study. *World J Surg Oncol*. 2022;20(1):131.
175. Zhang Y, Zeng L, Wang M, Yang Z, Zhang H, Gao L, et al. RIG-I promotes immune evasion of colon cancer by modulating PD-L1 ubiquitination. *J Immunother Cancer*. 2023;11(9).
176. Yang C, Wang X, To KKW, et al. Circulating tumor cells shielded with extracellular vesicle-derived CD45 evade T cell attack to enable metastasis. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9:84. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01789-1>
177. Gausman V, Dornblaser D, Anand S, Hayes RB, O'Connell K, Du M, et al. Risk factors associated with early-onset colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(12):2752-9.e2.
178. Chakrabarti S, Xie H, Urrutia R, Mahipal A. The promise of circulating tumor DNA (ctDNA) in the management of early-stage colon cancer: A critical review. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):2808.
179. Henriksen TV, Tarazona N, Frydendahl A, Reinert T, Gimeno-Valiente F, Sharma S, et al. Circulating tumor DNA in stage III colorectal cancer, beyond minimal residual disease detection, toward assessment of adjuvant therapy efficacy and clinical behavior of recurrences. *Clin Cancer Res*. 2022;28(3):507-17.
180. Hasenleithner SO, Speicher MR. A clinician's handbook for using ctDNA throughout the patient journey. *Mol Cancer*. 2022;21(1):81.

181. Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, Moore EK, Morris JB, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med*. 2018;10(466).
182. Cao Y, Wang N, Wu X, Tang W, Bao H, Si C, et al. Multi-dimensional fragmentomics enables early and accurate detection of colorectal cancer. *Cancer Res*. 2024. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-3486>.
183. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(3):347-76.
184. Zhu D, Wang H, Wu W, Geng S, Zhong G, Li Y, et al. Circulating cell-free DNA fragmentation is a stepwise and conserved process linked to apoptosis. *BMC Biol*. 2023;21(1):253.
185. Germano G, Mauri G, Siravegna G, Dive C, Pierce J, Di Nicolantonio F, et al. Parallel Evaluation of Circulating Tumor DNA and Circulating Tumor Cells in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2018;17(1):80–3. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.10.017>
186. Xie J, Hu B, Gong Y, He S, Lin J, Huang Q, et al. A comparative study on ctDNA and tumor DNA mutations in lung cancer and benign cases with a high number of CTCs and CTECs. *J Transl Med*. 2023;21(1):873.
187. Kong SL, Liu X, Tan SJ, Tai JA, Phua LY, Poh HM, et al. Complementary sequential circulating tumor cell (CTC) and cell-free tumor DNA (ctDNA) profiling reveals metastatic heterogeneity and genomic changes in lung cancer and breast cancer. *Front Oncol*. 2021;11:698551. doi: 10.3389/fonc.2021.698551.
188. Zhang Q, Cai Z, Gerratana L, Davis AA, D'Amico P, Chawla A, et al. Early evaluation of risk stratification and clinical outcomes for patients with advanced breast cancer through combined monitoring of baseline circulating tumor cells and DNA. *Clin Cancer Res*. 2024;30(16):3470-80. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-24-0535.
189. Connors D, Allen J, Alvarez JD, Boyle J, Cristofanilli M, Hiller C, et al. International liquid biopsy standardization alliance white paper. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;156:103112. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.103112.

## H. Anexos

### Anexo 1. Estadificación TNM AJCC UICC 8ª edición.

TUMOR PRIMARIO (T)	
TX	Tumor primario no evaluable
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ, carcinoma intramucoso (ocupa la lámina propia sin extensión a la muscular de la mucosa)
T1	Tumor invade la submucosa (afecta a la muscular de la mucosa, pero no a la muscular propia)
T2	Tumor invade la muscular propia
T3	Tumor invade a través de la muscular propia hacia los tejidos pericólicas
T4	El tumor invade el peritoneo visceral o invade un órgano o estructura adyacente
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 pueden ser evaluados
N1	De uno a tres ganglios linfáticos regionales son positivos (tumor en los ganglios linfáticos que miden $\geq 0,2$ mm), o hay cualquier cantidad de depósitos tumorales y todos los ganglios linfáticos identificables son negativos
N1a	1 ganglio linfático es positivo
N1b	2 o 3 ganglios son positivos
N1c	No hay ganglios linfáticos positivos, pero hay depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o en los tejidos pericólicos o perirrectales/mesorrectales que no dependen del peritoneo
N2	4 o más ganglios afectados
N2a	De 4 a 6 ganglios afectados
N2b	7 o más ganglios afectados
METÁSTASIS A DISTANCIA (M)	

<b>M0</b>	No hay afectación metastásica a distancia por prueba de imagen; no hay evidencia de tumor a distancia en distintos órganos (Esta categoría no es evaluada por patólogos)
<b>M1</b>	Metástasis que afecta a uno o más órganos distantes o metástasis peritoneales son detectadas
<b>M1a</b>	Metástasis en un tejido u órgano sin afectación del peritoneo
<b>M1b</b>	Metástasis en 2 o más órganos sin afectación peritoneal
<b>M1c</b>	Metástasis en el peritoneo exclusivamente o afectación también de otros órganos

Tabla 18: Anexo 1. Estadificación TNM AJCC UICC 8<sup>o</sup> edición.

### Anexo 2. Grupos pronósticos y estadio clínico.

<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Grupo estadio</b>
<b>Tis</b>	N0	M0	0
<b>T1, T2</b>	N0	M0	I
<b>T3</b>	N0	M0	IIA
<b>T4a</b>	N0	M0	IIB
<b>T4b</b>	N0	M0	IIC
<b>T1-T2</b>	N1/N1c	M0	IIIA
<b>T1</b>	N2a	M0	IIIA
<b>T3-T4a</b>	N1/N1c	M0	IIIB
<b>T2-T3</b>	N2a	M0	IIIB
<b>T1-T2</b>	N2b	M0	IIIB
<b>T4a</b>	N2a	M0	IIIC
<b>T3-T4a</b>	N2b	M0	IIIC
<b>T4b</b>	N1-N2	M0	IIIC
<b>Cualquier T</b>	Cualquier N	M1a	IVA
<b>Cualquier T</b>	Cualquier N	M1b	IVB
<b>Cualquier T</b>	Cualquier N	M1c	IVC

Tabla 19: Anexo 2. Grupos pronósticos y estadio clínico.

### Anexo 3: Hoja de datos analizador de cfDNA: Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

Tomado del manual de uso del producto

**Table 2. DNA Yield and Purity from Whole Blood Specimens with Differing WBC Counts.** DNA extraction from eight replicates was tested for each condition listed to assess DNA quantity, quality and amplifiability. DNA was extracted from 300µl of whole blood with white blood cell (WBC) counts ranging from  $4 \times 10^6$ – $10 \times 10^6$  WBC/ml and eluted in 50µl. Absorbance of purified DNA was measured at 230nm, 260nm, 280nm and 340nm. DNA concentration was determined using absorbance at 260nm after subtracting absorbance of the blank and correcting for instrument noise (absorbance at 340nm). All absorbance calculations described in this performance evaluation were performed this way. DNA concentration was multiplied by eluted DNA volume to determine yield, and  $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{260}/A_{230}$  ratios were calculated to assess DNA quality. The Maxwell® CSC Blood DNA Kit yielded acceptable quantities of DNA ( $\geq 3.00$ pg/WBC) for all whole blood samples tested, regardless of white blood cell count. Average yields of purified DNA were  $\geq 4.18$ pg/WBC, with  $A_{260}/A_{280}$  ratios  $\geq 1.89$  and  $A_{260}/A_{230}$  ratios  $\geq 1.68$ .

Donor	Average Total DNA Yield (µg) (n = 8)	White Blood Cell Count (WBC/ml)	Average DNA		
			Yield Per White Blood Cell (pg)	Average $A_{260}/A_{280}$ Ratio	Average $A_{260}/A_{230}$ Ratio
1	6.0	$4.5 \times 10^6$	4.45	1.90	1.68
2	8.6	$6.9 \times 10^6$	4.18	1.89	1.91
3	12.4	$9.4 \times 10^6$	4.45	1.91	2.01

**Table 3. DNA Yield and Purity from Whole Blood Collected with Different Anticoagulants.** Quantity and quality were assessed for purified DNA eluates prepared from whole blood collected in commonly used blood collection tubes containing EDTA, sodium citrate or heparin as the anticoagulant. The blood samples were refrigerated or frozen and equilibrated to room temperature prior to DNA extraction. DNA was purified from eight 300µl replicates for each anticoagulant and eluted in 50µl. DNA concentration, DNA yield and  $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{260}/A_{230}$  ratios were calculated and are shown in the table below. Consistent yields and purity ratios were observed for DNA extracted from all samples using the Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

Blood Collection Tube Type	Average DNA Total Yield (µg) (n = 8)	Average DNA		
		Concentration (ng/µl)	Average $A_{260}/A_{280}$ Ratio	Average $A_{260}/A_{230}$ Ratio
EDTA	10.97	281.28	1.91	1.94
Sodium Citrate	11.29	283.57	1.93	2.02
Heparin	11.99	307.48	1.94	2.08

**Table 4. Amplifiability of DNA Extracted from Whole Blood.** Amplifiability was assessed by qPCR for DNA extracted from whole blood using the Maxwell® CSC Blood DNA Kit and the Maxwell® CSC Instrument. Each purified DNA sample was amplified using a 71bp CAPZA3 target sequence. C<sub>q</sub> values that were less than the lowest concentration on the qPCR standard curve were observed for all of the sample types and were within the linear range of the assay.

Whole Blood Volume	Sample	C <sub>q</sub> (Cycles)
50µl	1	27.17
	2	26.86
	3	26.95
	4	26.92
	5	27.23
	6	27.12
	7	27.21
	8	26.98
300µl	1	26.90
	2	26.78
	3	26.84
	4	26.87
	5	26.66
	6	26.66
	7	26.84
	8	26.75

## Anexo 4: Consentimiento informado del estudio

### CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE. CONSENTIMIENTO POR ESCRITO AL PACIENTE

#### “Intercepción de metástasis en cáncer de colon: Evaluación del riesgo de recidiva mediante biopsias líquidas (CTCs y ctDNA) en estadios precoces”

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

**Naturaleza:** Proyecto que pretende encontrar un marcador tumoral que determine la progresión de la enfermedad y así poder identificar pacientes con riesgo de desarrollo de enfermedad metastásica de una forma no invasiva y precoz, así como el desarrollo de la enfermedad a lo largo del seguimiento en pacientes con cáncer de colon a partir de la extracción de 15 ml de sangre antes y un mes después de la cirugía con intención curativa.

Proyecto basado en Medicina de Precisión mediante la caracterización fenotípica y molecular de Células Tumorales Circulantes (CTC), ctDNA y una muestra de tejido procedentes de pacientes con cáncer de colon con el principal objetivo de definir perfiles moleculares y fenotípicos de progresión de la enfermedad de forma precoz así como definir su correlación con características clínico-patológicas de los pacientes a partir de 15 ml de sangre.

Su participación consiste en la donación de muestras de sangre, que se extraerán en tres momentos del estudio: 15 ml para la primera muestra pre-cirugía, y 15 mL un mes después de la cirugía.

Así mismo, siempre que sea posible y procedente de la intervención quirúrgica se obtendrá una muestra de tejido.

#### **Importancia del estudio:**

La identificación de características tumorales de células y de otros componentes o moléculas asociadas a la enfermedad y que están presentes en la sangre de los pacientes permitirá una mayor capacidad para conocer el estado real de la enfermedad y por tanto de ser capaces de identificar pacientes con riesgo de desarrollo de enfermedad metastásica, permitiendo un seguimiento más individualizado.

#### **Implicaciones para el donante/paciente:**

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos de carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.
- Los excedentes de muestra serán eliminados.

#### **Riesgos de la investigación para el donante/paciente:**

La obtención de sangre periférica es en principio un procedimiento exento de riesgo, y sus posibles complicaciones son las mismas que las de cualquier extracción de sangre habitual. Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal asociado al proyecto en el teléfono: 654596676 o en el correo electrónico: [juanjose.diaz@genyo.es](mailto:juanjose.diaz@genyo.es)

Se autoriza el acceso a la información clínica, así como la conservación de muestras biológicas para estudios futuros. Los datos serán, en todo caso, anonimizados y se registrarán en la base de datos.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

“Intercepción de metástasis en cáncer de colon: Evaluación del riesgo de recidiva mediante biopsias líquidas (CTCs y ctDNA) en estadios precoces”

Yo (Nombre y

Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio: “Intercepción de metástasis en cáncer de colon: Evaluación del riesgo de recidiva mediante biopsias líquidas (CTCs y ctDNA) en estadios precoces”
- He recibido suficiente información sobre el estudio “Intercepción de metástasis en cáncer de colon: Evaluación del riesgo de recidiva mediante biopsias líquidas (CTCs y ctDNA) en estadios precoces”
- He hablado con el profesional sanitario informador: .....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si

No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos
- Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado “Intercepción de metástasis en cáncer de colon: Evaluación del riesgo de recidiva mediante biopsias líquidas (CTCs y ctDNA) en estadios precoces”

Firma del paciente  
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional  
sanitario informador

Nombre y apellidos:.....

Fecha: .....

Nombre y apellidos: .....

Fecha: .....