

# UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

## IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES PARA CÁNCER COLORRECTAL METASTÁSICO: ANÁLISIS GENÓMICO Y METABÓLOMICO

Memoria presentada por

**Dña. Encarnación González Flores**

para optar al grado de Doctora por la Universidad de  
Granada

Granada, 19 de Julio 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Encarnación González Flores  
ISBN: 978-84-1117-002-4  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/70406>





*A mis pacientes:*

*“Por y para ellos”*

# **A** *gradecimientos*

**Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:**

A mis co-directores, Jose Carlos Prados y Consolación Melguizo por su infinita paciencia, por su apoyo y confianza en que algún día lo lograríamos. Gracias por vuestras enseñanzas en mi formación como investigadora y por los proyectos que ya compartimos.

A Octavio Caba por su ayuda desde el inicio en este trabajo de investigación, a Manuela Expósito por su inmejorable asesoramiento estadístico y a Eli Maza por su desinteresada colaboración en la parte clínica de este proyecto.

A Pedro Sánchez Rovira, mi maestro oncológico, al que le debo gran parte de lo que hoy soy, por confiar siempre en mí, ... Gracias.

A Raquel, mi compañera y amiga, porque comparte conmigo la ilusión por la investigación, por los enfermos y sobre todo por la vida. A mis “oncólogas de oro”, gracias por hacer que mi trabajo diario sea algo maravilloso y a todos mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Virgen de las Nieves por ayudarme a realizar esta gran labor que es el trabajo en equipo.

A mi marido Gonzalo, mi gran apoyo en los buenos y los malos momentos. Gracias por saber comprenderme, apoyarme y animarme a conseguir mis metas. Sin ti esto no habría sido posible, porque parte del tiempo invertido era también el tuyo. Y gracias por darme lo mejor de este mundo, mis hijos: Gonzalo y Ana, a ellos les dedico todo mi esfuerzo y espero que aprendan el entusiasmo que quiero contagiarles.

A mi madre , que desde arriba estará orgullosa de mi y a mi hermana Ana , mi segunda madre, por estar siempre ahí apoyándome y reconociendo mi esfuerzo .

A todos ellos, muchas gracias.

*“El único modo de hacer un gran trabajo  
es amar lo que haces”*

*Steve Jobs*

*“Todo parece imposible hasta que se logra”*

*Nelson Mandela*



# **I**ndice



1	<b>ABREVIATURAS</b>
8	<b>RESUMEN</b>
15	<b>SUMMARY</b>
22	<b>1. INTRODUCCIÓN</b>
24	1.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL CÁNCER EN ESPAÑA
24	1.1.1 Incidencia
26	1.1.2 Mortalidad
27	1.1.3 Supervivencia
28	1.2 CÁNCER COLORRECTAL
28	1.2.1 Epidemiología y factores de riesgo
31	1.2.2 Carcinogénesis
34	1.2.3 Clínica del cáncer colorrectal
34	1.2.4 Diagnóstico del cáncer colorrectal
41	1.2.5 Estadificación
43	1.2.6 Factores pronósticos y predictivos
43	1.2.6.1 Factores clínicos, analíticos y patológicos
44	1.2.6.2 Factores moleculares pronósticos y predictivos de respuesta
50	1.2.7 Tratamiento del cáncer colorrectal
50	1.2.7.1 Tratamiento del cáncer de colon localizado
51	1.2.7.1.1 Tratamiento adyuvante en pacientes estadio III
52	1.2.7.1.2 Tratamiento adyuvante del cáncer de colon estadio II
53	1.2.7.1.3 Individualización del tratamiento adyuvante en cáncer de colon
58	1.2.7.2 Tratamiento del cáncer de recto localizado
59	1.2.7.2.1 Quimiorradioterapia neoadyuvante
59	1.2.7.2.2 Radioterapia de ciclo corto

60	1.2.7.2.3	Quimioterapia de consolidación tras tratamiento neoadyuvante
61	1.2.7.2.4	Quimioterapia de inducción previo a tratamiento quimiorradioterápico
61	1.2.7.2.5	Quimioterapia neoadyuvante sin quimiorradioterapia
61	1.2.7.2.6	Estrategia conservadora: watch & wait
62	1.2.7.2.7	Papel de quimioterapia adyuvante en cáncer de recto
62	1.2.7.3	Tratamiento del cáncer colorrectal metastásico
64	1.2.7.3.1	Objetivos del tratamiento
65	1.2.7.3.2	Esquemas de tratamiento en enfermedad metastásica
71	1.2.7.3.3	Nuevos fármacos
74	1.2.7.3.4	Inmunoterapia en cáncer colorrectal avanzado
77	1.3	METABOLÓMICA
77	1.3.1	Definición
79	1.3.2	Análisis metabolómico. Tecnología
82	1.3.3	Metabolómica y cáncer
82	1.4	ANÁLISIS GENÓMICO
82	1.4.1	Definición
84	1.4.2	Análisis genómico y cáncer
85	1.4.3	Análisis genómico. Tecnología
88	1.5	BIOMARCADORES EN CÁNCER
88	1.5.1	Definición y generalidades
88	1.5.2	Biomarcadores en cáncer de colon
88	1.5.2.1	Biomarcadores basados en ARN
88	1.5.2.1.1	ARN mensajero como marcador de CCR
90	1.5.2.1.2	Micro ARN y CCR

93	1.5.2.1.3 LncRNA y CCR
94	1.5.2.2 ADN como biomarcador de CCR. Marcadores epigenéticos
97	1.5.2.3 Metabolitos como marcadores de CCR
98	1.5.2.4 Biomarcadores basados en proteínas circulantes
99	1.5.2.5 Células tumorales circulantes y exosomas
103	<b>2. OBJETIVOS</b>
107	<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>
109	3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO
109	3.1.1 Pacientes y toma de muestra
109	3.1.2 Criterios de inclusión y exclusión
110	3.1.3 Variables clínicas
114	3.1.4 Seguimiento de los pacientes
115	3.1.5 Aspectos éticos
115	3.2 ESTUDIOS GÉNICOS
115	3.2.1 Obtención de muestras de sangre
115	3.2.2 Aislamiento de ARN de muestras de sangre
116	3.2.3 Síntesis de ADNc y PCR digital
117	3.2.4 Análisis estadístico
117	3.3 ESTUDIOS DE METABOLÓMICA
117	3.3.1 Obtención y procesamiento de la muestra
118	3.3.2 Extracción de metabolitos
118	3.3.3 Análisis de metabolitos mediante LC-HRMS
119	3.3.4 Generación de conjuntos de datos y pretratamiento
120	3.3.5 Pretratamiento de datos, validación analítica y detección de valores atípicos
120	3.3.6 Identificación de biomarcadores

120 3.3.7 Valoración de biomarcadores

121 3.3.8 Análisis estadístico. Evaluación de metabolitos

## 123 **4. RESULTADOS**

125 4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO

126 4.2 CORRELACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y PARÁMETROS  
CLÍNICOS

128 4.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL ESTUDIO GENÓMICO

128 4.3.1 Estudio de la expresión diferencial de genes en pacientes con  
CCR metastásico

129 4.3.2 Estudio comparativo de la expresión de genes en sangre y suero  
de pacientes con CCR metastásico

129 4.3.3 Estudio de correlación de los biomarcadores séricos y  
angiogénesis

132 4.3.4 Estudio de correlación de los biomarcadores séricos en  
combinación

134 4.3.5 Correlación de los biomarcadores séricos y la respuesta al  
tratamiento

135 4.3.6 Correlación de los biomarcadores séricos con la supervivencia  
global y supervivencia libre de enfermedad

135 4.4 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL ESTUDIO METABOLÓMICO

135 4.4.1 Resultados de los análisis de los pacientes CCR mediante  
LC-HRMS

136 4.4.2 Resultados del análisis quimiométrico

138 4.4.3 Resultados del identificación de biomarcadores potenciales

139 4.4.4 Evaluación de los biomarcadores potenciales

## 143 **5. DISCUSIÓN**



164 | **6. CONCLUSIONES**

169 | **7. BIBLIOGRAFÍA**



# **A** *breviaturas*



## **A**

AcN: acetonitrilo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN circulante

ARMS: sistema de mutación refractario a la amplificación

ARNm: RNA mensajero

AUC: Area bajo la curva

## **B**

## **C**

CC: Cáncer de colon

CCR: Cáncer colorrectal

CCRm: Cáncer colorrectal metastásico

CerS. ceramida sintasa

CEA: Antígeno carcinoembrionario

CEACAM: molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno 6

CKB: creatina quinasa B

Cox-2: Ciclooxygenasa-2

CR: Cáncer de recto

CRLA: cáncer de recto localmente avanzado

CTCs: Células tumorales circulantes

ctDNA: DNA tumoral circulante

## **D**

DPD: dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD)

dPCR: PCR digital

## **E**

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

## **F**

FDR: tasa de falso descubrimiento

FISH: hibridación fluorescente in situ

FOLFIRI: Irinotecan+5Fu+ Leucovorín

FOLFOX: Oxaliplatino+ 5Fu+ Leucovorín

FOLFOX+B: Oxaliplatino+ 5Fu+ Leucovorín+ Bevacizumab

FOLFOXIR: Oxaliplatino+Irinotecan+5Fu+ Leucovorín

5FU: 5-fluorouracilo

## **G**

GC-MS: Cromatografía de gases/ masas

GC:cromatografía de gases

GDPD: glicerofosfocolina fosfodiesterasas

GEO: Gene Expression Omnibus

GMPc: guanosina monofosfato cíclic

GPC: glicerofosfocolina

GUCY2C: guanilil ciclasa C

## **H**

HC: controles sanos

HMGA2: en inglés: “high mobility group A2”

HPLC-MS: cromatografía de líquidos de alto rendimiento con espectrómetro de masas

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HR-MAS: Espectroscopía de alta resolución por ángulo mágico

HRMS espectrometría de masas de alta resolución

HTA: Hipertensión arterial

## **I**

IC: Inestabilidad cromosómica

IDA: adquisición de información dependiente

IHQ: Inmunohistoquímica

ILR: intervalo libre de recurrencia

IMS: Inestabilidad microsátélites

IS: inmunoscore

ITGAE: Integrina alpha E

## **J**

JAG1: Jagged-1

## **K**

KNN: Análisis por Vecinos Cercanos

## **L**

LC-HRMS: cromatografía líquida de fase inversa acoplada a espectrometría de masas de alta resolución

LC-MS: cromatografía líquida con espectrometría de masas

LC: cromatografía líquida

LDA: Análisis Lineal Discriminante

LncRNA: ARNs no codificantes largos

LV: Leucovorín

## **M**

m: meses

MACC1: proteína asociada a metástasis

MAGL: serina hidrolasa monoacilglicerol lipasa

miRNA: MicroRNA  
MMP7: metaloproteínasa de matriz-7 (MMP7)  
MS: Espectroscopía de masas  
MSI-H: alta inestabilidad de microsatélites  
MSS: inmunofenotipo estable

## **N**

NA: neoadyuvante  
NGS: Secuenciación de nueva generación

## **O**

OS: solventes orgánicos

## **P**

PCA: análisis de componentes principales  
PCA: Análisis de Componentes Principales  
PGF: factor de crecimiento placentario  
PLS-DA: Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales  
PLS-DA: Los cuadrados mínimos parciales Análisis discriminante  
pRC: respuesta completa patológica  
PTGS2: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (PTGS2)

## **Q**

Q-PCR: PCR a tiempo real o cuantitativa  
QC: control de calidad  
QT: quimioterapia

## **R**

RNA: Acido Ribonucleico  
RO: Respuestas objetivas  
ROC: curva de característica operativa del receptor  
RR: radioterapia  
RSD: desviación estándar relativa  
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

## **S**

S100A4: proteína de unión a calcio  
SAH S-adenosil-1-homocisteína (SAH),  
  
SALL4: factor de transcripción codificado por un miembro de la familia de genes tipo Spalt  
SCC: carcinoma de células escamosas  
SCRT: Radioterapia de ciclo corto

SG: supervivencia global  
SLE: supervivencia libre de enfermedad  
SLP: supervivencia libre de progresión  
SLR: supervivencia libre de recaída  
sTRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF soluble en suero

## **T**

TCA: ácido tricarbóxico  
TIC: cromatogramas de iones totales  
TME: Escisión mesorrectal  
tRT: tiempo de retención  
TS: timidilato-sintasa  
TSPAN8: proteína de membrana de tetraspanina 8  
TSPAN8: Tetraspanina 8

## **U**

UPLC: cromatografía líquida de ultra-alta resolución

## **V**

VEGF-D: factor de crecimiento endotelial vascular-D  
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular  
VIP: puntuación de proyección  
VOC-s: compuestos orgánicos volátiles  
VPN: valores predictivos negativos  
VPP: valores predictivos positivos

## **X**

XELOX: oxaliplatino+ capecitabina  
XELOX+B: Oxaliplatino+Capecitabina+Bevacizumab



# *R*esumen



El cáncer colorrectal (CCR) debe ser considerado como un auténtico problema de salud pública tanto por su incidencia, es el tercer tumor más frecuente en el mundo representando el 10 % del total de las neoplasias, como por su mortalidad que lo sitúa como la segunda causa de muerte por cáncer. En España y considerando ambos sexos, el CCR es el más tumor más frecuente superando en la actualidad al de mama y pulmón.

A pesar de los importantes avances en el tratamiento del CCR en los últimos años y de la mejora en su diagnóstico precoz, un número muy importante de pacientes, entre un 20-25%, presentan enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico y hasta un 50% desarrollan metástasis a lo largo de la evolución de la enfermedad. Por tanto, **el diagnóstico precoz**, así como el desarrollo de estrategias para determinar su pronóstico y la eficacia de la terapia aplicada, es un campo prioritario en la investigación oncológica.

En este contexto, el conocimiento cada vez más profundo de la etiopatogenia del CCR, el carácter **heterogéneo** del mismo, y la demostración de que múltiples alteraciones tanto genéticas como epigenéticas son capaces de alterar los mecanismos de control de los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis celular, están dando paso, no sólo al uso de nuevas dianas moleculares que permitan un tratamiento más preciso y específico, sino a la determinación de nuevas biomoléculas, que usadas como biomarcadores, puedan indicarnos la presencia, la evolución y/o la respuesta al tratamiento de la enfermedad.

Los biomarcadores tumorales, entendidos como entidades biológicas que puede ser detectadas en los diferentes medios orgánicos de pacientes con cáncer, son las moléculas que están permitiendo el seguimiento de la enfermedad monitorizando sus niveles, su diagnóstico (incluyendo métodos de *screening* poblacional), su pronóstico e incluso, el seguimiento de la respuesta terapéutica. En la actualidad, existe un déficit de marcadores precisos y sensibles para el cáncer en general y para el CCR en particular. Así, son muchos los estudios que han investigado como biomarcador en CCR, moléculas de DNA liberadas a sangre en procesos de apoptosis celular o paso de células vivas al torrente circulatorio (CTSs). Los exosomas, pequeñas vesículas

envueltas por una bicapa lipídica que están implicados en la transferencia de miRNAs, **ARMm** y proteínas a una célula diana, también han sido propuestos como biomarcadores de esta enfermedad. Incluso la presencia en el suero de pacientes con CCR de determinadas proteínas ha sido analizada ampliamente, a pesar de lo cual, sólo CEA y CA-19-9 siguen siendo clínicamente utilizadas, aunque adolecen de una baja sensibilidad y especificidad. Múltiples estudios han sido también realizados para determinar miRNA en pacientes con CCR que sean específicos para su diagnóstico o pronóstico, pero sin resultados definitivos.

Entre las moléculas más ampliamente analizadas como biomarcadores de CCR se encuentran la presencia de **ARNm** en sangre periférica. En este contexto, el ARNm de moléculas relacionadas con el proceso de la angiogénesis han cobrado un gran interés en el CCR, habiéndose testado la sobreexpresión de moléculas como PTGS2 y GUCY2C como marcadores de la enfermedad o de la presencia de metástasis ocultas en pacientes con CCR. Por otra parte, la metabolómica, una disciplina que evalúa los metabolitos endógenos producidos por el organismo, esta revolucionado el campo de los biomarcadores para distintos tipos de patologías. Aplicada al cáncer, la metabolómica ofrece una representación molecular del fenotipo tumoral que puede servir para el diagnóstico, el pronóstico y la identificación de subgrupos relevantes desde un punto de vista clínico. Las células tumorales adaptan su metabolismo a una proliferación descontrolada que provoca alteraciones metabólicas que tiene su reflejo en la aparición o la modulación de los niveles de metabolitos. En el CCR, algunos metabolitos concretos (ácido betahidroxibutirato, cistamina, ácido aspártico, entre otros) han sido propuestos para el diagnóstico de CCR tanto en sangre como en orina, aunque la complejidad para detectarlos y su elevado coste hace necesarios más esfuerzos de investigación para llevarlos a la práctica clínica.

En este contexto, nuestro trabajo ha tenido dos objetivos fundamentales: i) Por una parte, realizar un estudio **de** la utilidad de genes intensamente relacionados **con** el proceso de angiogénesis, fenómeno esencial en el crecimiento y la expansión metastásica de un tumor, como nuevos biomarcadores de fácil detección en sangre periférica o en suero de los pacientes con **CCRM**. Para ello hemos seleccionado cinco

genes, GUCY2C, JAG1, PTGS2, PGF y MMP7, con demostrada relevancia en la angiogénesis y hemos determinado los niveles de ARN circulante tanto en suero como en células mononucleares de sangre periférica en un grupo de 59 pacientes con CCRm enfrentados a un grupo de 47 controles sanos. La presencia de estos marcadores en los fluidos biológicos fue realizada por una tecnología altamente sensible como es la dPCR que permitiría un fácil desarrollo de su aplicación clínica en un corto plazo de tiempo, mientras que el análisis del AUC se utilizó para estimar el valor predictivo de los biomarcadores tanto de forma individual como en combinaciones (firma biológica). ii) Por otra parte, hemos realizado un estudio para identificar biomarcadores basados en la determinación de metabolitos en suero de pacientes de CCRm que sea útil en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de estos pacientes. En este caso y basándonos en técnicas de metabolómica no dirigida, se han analizado los sueros de un grupo 65 pacientes con CCRm enfrentados a 60 controles sanos. Las muestras fueron sometidas a estudios mediante cromatografía líquida de fase inversa acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS), que nos permitió obtener una matriz para comparar controles sanos con pacientes con CCR. Los metabolitos obtenidos fueron analizados de forma individual y también en forma de “clúster” con el objeto de obtener una posible huella biológica.

Nuestros resultados demostraron que, a través de la utilización de la dPCR, existieron diferencias significativas en los niveles de ARNm de tres genes relacionados con la angiogénesis (PTGS2, GUCY2C y JAG1) en el suero de pacientes con CCRm en relación con el suero de controles sanos. El mayor rendimiento en cuanto a la discriminación entre grupos fue observado para el ARNm de PTGS2. Sólo la determinación de ARNm de JAG1 en sangre demostró un valor de discriminación aceptable como biomarcador. En general, el nivel de ARNm circulante de todos los genes en el suero de los pacientes fue significativamente más abundante que el detectado en las células sanguíneas. Por otra parte, la asociación de genes con la intención de buscar una “firma” para la patología estudiada no mostró una mejora significativa de la capacidad discriminatoria en relación con los genes individuales. Curiosamente, la expresión sérica de GUCY2C y GUCY2C/ PTGS2 se correlacionaron significativamente con la respuesta terapéutica. Sin embargo, ninguno

de los biomarcadores se correlacionó con la **SG** o la **SLP**. Por otra parte, los estudios de metabolómica de los sueros de pacientes con **CCRm** **revelaron** la presencia de cinco compuestos de tres clases de moléculas (esfingolípidos endocannabinoides y glicerofosfolípidos), no detectados o detectados en niveles muy bajos en el grupo control. Las AUC obtenidas de los análisis ROC realizados sugieren que estos cinco candidatos constituyen una huella metabolómica que tendría potencial para ser usada como biomarcadores con capacidad discriminativa entre **CCRm** y sujetos sanos.

En conclusión, el **CCRm** precisa del desarrollo de marcadores específicos que permitan su diagnóstico y ayuden a la determinación de su pronóstico y la eficacia de su tratamiento. Nuestros hallazgos sugieren que los genes relacionados con la angiogénesis pueden ser excelentes biomarcadores no invasivos y de fácil determinación para su aplicación clínica en el diagnóstico y/o pronóstico de estos pacientes. Por otra parte, el uso de una firma metabolómica formada por cinco moléculas en suero, incluyendo un endocanabinoide, dos glicerofosfolípidos y dos esfingolípidos, fue capaz de discriminar entre pacientes con **CCRm** y controles sanos. Estos hallazgos soportan la hipótesis de que la metabolómica con **LC-HRMS** es una potente herramienta para el diagnóstico **de CCRm**. Nuestros resultados aportan nuevos conocimientos sobre posibles marcadores para el **CCRm** que podrían tener relevancia clínica. Nuevas investigaciones con estudios más amplios y validaciones externas serán necesarias para determinar la aplicabilidad clínica de estos biomarcadores en **CCR**.



# **S***ummary*



Colorectal cancer (CRC) must be considered a real public health problem both because of its incidence, it is the third most frequent tumour in the world, representing 10% of all neoplasms, and because of its mortality, which places it as the second leading cause of death from cancer. In Spain and considering both sexes, CRC is the most frequent tumour, currently surpassing breast and lung tumours.

Despite the important advances in the treatment of CRC in recent years and the improvement in its early diagnosis, a very important number of patients, between 20-25%, present metastatic disease at the time of diagnosis and up to 50 % develop metastases throughout the course of the disease. Therefore, the determination of the metastatic stage of the disease at an early stage, as well as the development of strategies to determine its prognosis and the effectiveness of the applied therapy, is a priority field in cancer research.

In this context, the increasingly in-depth knowledge of the etiopathogenesis of CRC, its heterogeneous nature, and the demonstration that multiple genetic and epigenetic alterations are capable of altering the control mechanisms of proliferation, differentiation and apoptosis cellular, are giving way, not only to the use of new molecular targets that allow a more precise and specific treatment, but to the determination of new biomolecules, which, used as biomarkers, can indicate the presence, evolution and / or response to treatment of the illness.

Tumour biomarkers, understood as biological entities that can be detected in the different organic environments of cancer patients, are the molecules that are allowing the follow-up of the disease by monitoring its levels, its diagnosis (including population screening methods), its prognosis and even the follow-up of the therapeutic response. At present, there is a shortage of precise and sensitive markers for cancer in general and for CRC in particular. Thus, there are many studies that have investigated as a biomarker in CRC, DNA molecules released into the blood in process of cellular apoptosis or passage of living cells into the circulatory stream (circulating tumor cells or CTCs). Exosomes, small vesicles surrounded by a lipid bilayer that are involved in the transfer of miRNAs, mRNAs and proteins to a target cell, have also been proposed as biomarkers of this disease. Even the presence in the

serum of patients with CRC of certain proteins has been extensively analyzed, despite which, only CEA and CA-19-9 are still used clinically, although they suffer from low sensitivity and specificity. Multiple studies have also been carried out to determine microRNA in patients with CRC that are specific for their diagnosis or prognosis but without definitive results.

Among the molecules most widely analysed as CRC biomarkers are the presence of messenger RNA (mRNA) in peripheral blood. In this context, the mRNA of molecules related to the angiogenesis process have gained great interest in CRC, having tested the overexpression of molecules such as PTGS2 and GUCY2C as markers of the disease or of the presence of hidden metastases in patients with CRC. On the other hand, metabolomics, a discipline that evaluates the endogenous metabolites produced by the body, has revolutionised the field of biomarkers for different types of pathologies. Applied to cancer, metabolomics offers a molecular representation of the tumour phenotype that can be used for diagnosis, prognosis, and identification of clinically relevant subgroups. Tumour cells adapt their metabolism to uncontrolled proliferation that causes metabolic alterations that are reflected in the appearance or modulation of metabolite levels. In CRC, some specific metabolites (beta-hydroxybutyrate acid, cystamine, aspartic acid, among others) have been proposed for the diagnosis of CRC in both blood and urine, although the complexity to detect them and their high cost require more research efforts to take them into clinical practice.

In this context, our work has had two fundamental objectives: i) On the one hand, to carry out a study that the utility of genes intensely related by the angiogenesis process, an essential phenomenon in the growth and metastatic expansion of a tumor, as new biomarkers easily detected in peripheral blood or serum of patients with metastatic CRC. For this we have selected five genes, GUCY2C, JAG1, PTGS2, PGF and MMP7, with demonstrated relevance in angiogenesis and we have determined the levels of circulating RNA both in serum and in peripheral blood mononuclear cells in a group of 59 patients with metastatic RCC faced with a group of 47 healthy controls. The presence of these markers in biological fluids was carried out by a highly sensitive

technology such as digital PCR (dPCR) that would allow an easy development of its clinical application in a short period of time, whilst the analysis of the area under the curve (AUC) was used to estimate the predictive value of biomarkers both individually and in combinations (biological signature). ii) On the other hand, we have carried out a study to identify biomarkers based on the determination of metabolites in the serum of metastatic CRC patients that is useful in the diagnosis, prognosis and follow-up of these patients. In this case, and based on undirected metabolomics techniques, the sera of a group of 65 patients with metastatic CRC compared to 60 healthy controls were analysed. The samples were subjected to studies by reverse phase liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), which allowed us to obtain a matrix to compare healthy controls with patients with CRC. The metabolites obtained were analyzed individually and also in the form of a "cluster" in order to obtain a possible biological trace.

Our results demonstrated that, through the use of dPCR, there were significant differences in the mRNA levels of three genes related to angiogenesis (PTGS2, GUCY2C and JAG1) in the serum of patients with metastatic CRC in relation to the serum of healthy controls. The highest performance in terms of discrimination between groups was observed for PTGS2 mRNA. Only the determination of JAG1 mRNA in blood showed an acceptable discrimination value as a biomarker. In general, the level of circulating mRNA of all genes in the serum of patients was significantly more abundant than that detected in blood cells. On the other hand, the association of genes with the intention of looking for a "signature" for the pathology studied did not show a significant improvement in the discriminatory capacity in relation to the individual genes. Interestingly, the serum expression of GUCY2C and GUCY2C / PTGS2 were significantly correlated with the therapeutic response. However, none of the biomarkers correlated with overall survival or progression-free survival. On the other hand, metabolomics studies of the sera of patients with metastatic CRC revealed the presence of five compounds of three types of molecules (endocannabinoid sphingolipids and glycerophospholipids), not detected or detected at very low levels in the control group. The AUCs obtained from the ROC analysis carried out suggest that these five candidates constitute a metabolomic trace that

would have the potential to be used as biomarkers with discriminatory capacity between metastatic CRC and healthy subjects.

In conclusion, metastatic RCC requires the development of specific markers that allow its diagnosis and help determine its prognosis and the efficacy of its treatment. Our findings suggest that genes related to angiogenesis can be excellent non-invasive and easily determined biomarkers for their clinical application in the diagnosis and / or prognosis of these patients. On the other hand, the use of a metabolomic signature formed by five molecules in serum, including an endocannabinoid, two glycerophospholipids and two sphingolipids, was able to differentiate between patients with metastatic CRC and healthy controls. These findings support the hypothesis that high-resolution mass spectrometry-coupled liquid chromatography metabolomics is a powerful diagnostic tool for metastatic RCC. Our results provide new insights into possible markers for metastatic CRC that could be of clinical relevance. Further investigations with larger studies and external validations will be necessary to determine the clinical applicability of these biomarkers in CRC.



# **I***ntroducción*



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. SITUACIÓN ACTUAL DEL CÁNCER EN ESPAÑA

#### 1.1.1. INCIDENCIA

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbi-mortalidad del mundo. Los últimos datos disponibles a nivel mundial estimados dentro del proyecto GLOBOCAN confirman que en el año 2020 se diagnosticaron aproximadamente 19,3 millones de casos nuevos en el mundo. (Bray y cols., 2018). Sin embargo, sabemos que la pandemia de la COVID-19 ha afectado el número de diagnósticos de cáncer en muchos países por lo que probablemente el número real de cánceres diagnosticados en 2020 habrá sido menor. Las estimaciones a nivel mundial indican también que el número de casos nuevos aumentará en las dos próximas décadas a 30,2 millones de casos nuevos al año en 2040. Los tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo en el año 2020 fueron los de mama (que ocupa la primera posición), pulmón, colon y recto, próstata y estómago, todos ellos con más de un millón de casos. (Siegel y cols., 2020)

En España, el cáncer es también una de las principales causas de morbi-mortalidad. El número de cánceres diagnosticados en España en el año 2021 se estima que alcanzará los 276.239 casos, según los cálculos de REDECAN, un número muy similar al del año 2020 (tabla 1). Sin embargo, igual que a nivel mundial, la realidad puede ser ligeramente diferente ya que esta estimación no incluye el posible efecto de la pandemia de la COVID-19. Por ejemplo, a causa de la pandemia de la COVID-19 los programas de cribado de cáncer se vieron afectados en mayor o menor grado por lo que, con toda probabilidad, el número de cánceres colorrectales y de mama finalmente diagnosticados en 2020 fue menor al esperado.

Los cánceres más frecuentemente diagnosticados en España en 2021 serán los de colon y recto (43.581 nuevos casos), próstata (35.764), mama (33.375), pulmón (29.549) y vejiga urinaria (20.613). Los cánceres más frecuentes diagnosticados en

varones en España en 2021 serán los de próstata, colon y recto, pulmón y vejiga urinaria y en mujeres serán los de mama y los de colon y recto

	Hombres	Mujeres	Ambos sexos
<b>45 a 64 años</b>	46.802	45.030	91.832
<b>&gt;65 años</b>	106.263	62.675	168.938
<b>Todas las edades</b>	158.867	117.372	276.239

*Fuente: Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).*

**Tabla 1.** Estimación del número de nuevos casos de cáncer en España para el año 2021

En las últimas décadas, el número absoluto de cánceres diagnosticados en España ha aumentado a causa del aumento poblacional, el envejecimiento de la población (la edad es un factor de riesgo fundamental en el desarrollo del cáncer), la exposición a factores de riesgo (como el tabaco, el alcohol, la contaminación, la obesidad, el sedentarismo entre otros muchos) y, en algunos tipos de cáncer como el colorrectal, y los de mama, cérvix o próstata, el aumento de la detección precoz. Sin embargo, en los últimos años parece identificarse un enlentecimiento en el aumento de la magnitud de la población española y en su envejecimiento. (Cleries y cols., 2016) Asimismo, también se ha producido una variación en la prevalencia de algunos factores de riesgo siendo el más importante el tabaquismo. (EUROSTAT, 2020). Todo ello comporta una estabilización de la incidencia del cáncer en varones (debido a la reducción del número de tumores relacionados con el tabaco, por la disminución del tabaquismo en hombres), mientras que en mujeres se observa un incremento global

En relación a la edad se puede observar que el riesgo empieza a aumentar de forma importante a partir de los 45-50 años. Desde el nacimiento hasta los 80 años, los hombres tienen un riesgo de desarrollar cáncer de un 40,9% y las mujeres de un 27,0%. A los 85 años, estos valores son de un 49,1% en los hombres y de un 31,8% en las mujeres.

### **1.1.2 MORTALIDAD**

A nivel mundial, el cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de mortalidad del mundo, con aproximadamente 9,9 millones de muertes relacionadas con cáncer en el año 2020 de acuerdo con los datos proporcionados por la International Agency for Research on Cancer (IARC), estas estimaciones de la mortalidad deben entenderse como la mortalidad que se estima que habría habido en 2020 si no hubiera habido la pandemia de la COVID-19. Al igual que con la incidencia, se espera un incremento de la mortalidad en los próximos años, estimándose la mortalidad en más de 16 millones en 2040. Los cánceres responsables del mayor número de fallecimientos a nivel mundial fueron el cáncer de pulmón (18,0% del total de muertes por cáncer), el cáncer colorrectal (9,4%), el cáncer hepático (8,3%), el cáncer de estómago (7,7%) y el cáncer de mama (6,9%).

En España, se estima que la mortalidad por cáncer se incrementará de 113.000 casos en 2020 a más de 160.000 en 2040. Según datos provisionales del INE del período enero a mayo de 2020, en este periodo de tiempo, los tumores constituyeron la tercera causa de muerte en España (21% de los fallecimientos, 47.220), por detrás de las enfermedades del sistema circulatorio (24% de las muertes, 53.201) y las enfermedades infecciosas (22%, 48.936). Esto supone un cambio con respecto a años anteriores, debido al aumento de mortalidad por enfermedades infecciosas a causa de la pandemia de la COVID-19. En varones, a pesar de la pandemia, los tumores han seguido siendo la principal causa de mortalidad en España (26%, 28.291), por delante de las enfermedades infecciosas (22%, 24.712) y las cardiovasculares (22%, 24.474). En mujeres, las enfermedades cardiovasculares fueron la principal causa de mortalidad (26%, 28.727), seguidas de las enfermedades infecciosas (21%, 23.681) y los tumores (17%, 18.931). (tabla 2) En España, los tipos de cáncer responsables de una mayor mortalidad son el cáncer de pulmón (22.930; 20,3%), el colorrectal (16.470; 14,6%), y los cánceres de páncreas (7.568; 6,7%), mama (6.606; 5,8%) y próstata (5.798; 5,1%). En varones, se estima que el cáncer de pulmón será el responsable de una cuarta parte de las muertes por cáncer (17.346 fallecimiento; 25,6%), seguido por los cánceres colorrectales (9.640; 14,2%), En mujeres, los tipos de cáncer responsables

de una mayor mortalidad serán los cánceres colorrectales (6.830; 15,1%), y los de mama (6.606; 14,6%)

TOTAL	
<b>Tumores</b>	47222
<b>Cáncer de pulmón</b>	9147
<b>Cáncer de colon</b>	4579
<b>Cáncer de páncreas</b>	3058
<b>Cáncer de mama</b>	2832
<b>Cáncer de próstata</b>	2550

Fuente INE.

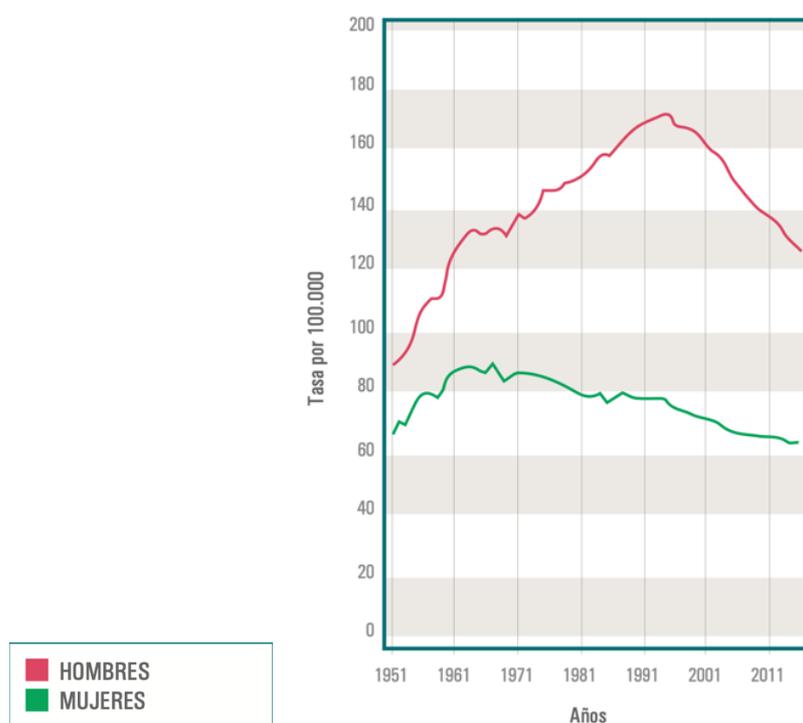
**Tabla 2:** Fallecimientos por tumores en España de enero a mayo de 2020, ambos sexos.

### 1.1.3 SUPERVIVENCIA

De forma general, la mortalidad por cáncer en España ha experimentado un fuerte descenso en las últimas décadas. Estas tendencias reflejan las mejoras en la supervivencia de los pacientes con tumores debido a las actividades preventivas, las campañas de diagnóstico precoz, los avances terapéuticos, y, en varones, a la disminución de la prevalencia del tabaquismo (Figura 1)

Globalmente, la supervivencia neta a 5 años del diagnóstico de los pacientes diagnosticados en el periodo 2008-2013 en España fue de 55,3% en los hombres y de 61,7% en las mujeres. Estas diferencias en la supervivencia global entre sexos se debe probablemente a que determinados tumores son más frecuentes en un sexo que en otro, ya que las diferencias más importantes en supervivencia se deben al tipo tumoral (junto con el estadio al diagnóstico).

La supervivencia de los pacientes con cáncer de España es similar a la de los países de nuestro entorno. Se estima que se ha duplicado en los últimos 40 años y es probable que, aunque lentamente, continúe aumentando en los próximos años. En hombres, la supervivencia neta a 5 años para el total de cánceres, excepto piel no melanoma, pasó de 52,0% en el periodo 2002-2007 a 55,3% en el periodo 2008-2013. Así, la supervivencia neta entre los dos periodos se incrementó en 3,3 puntos porcentuales. En mujeres, la supervivencia neta entre los dos sexenios aumentó de 59,1% a 61,7% siendo el incremento de 2,6% puntos porcentuales



Fuente: LARC 2021

**Figura 1:** Evolución temporal de la mortalidad estandarizada por edad por tumores en España

## 1.2. CÁNCER COLORRECTAL

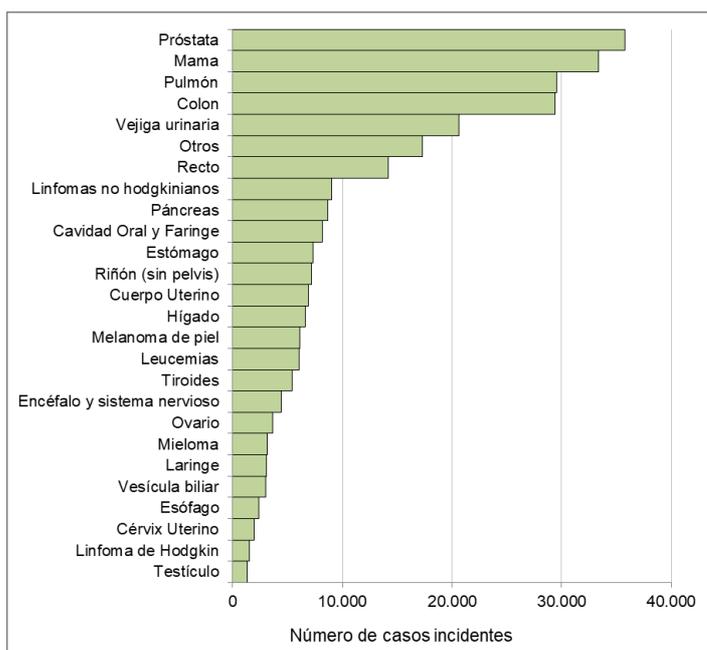
### 1.2.1 EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El cáncer colorrectal (CCR) representa el tercer tumor más frecuente a nivel mundial en el año 2020, detrás del cáncer de mama y del cáncer de pulmón, con un total de 1,9 millones de nuevos casos, lo que supone un 10% del total de las neoplasias.

Representa la segunda causa de muerte por cáncer, tras el cáncer de pulmón, con un total de 935.173 fallecimientos (9,4%).

Las tasas de incidencia son más altas en países desarrollados, lo que se atribuye a factores ambientales, apoyando esta idea, se observa un incremento de la incidencia de esta neoplasia en la población migrante a áreas de mayor incidencia. De forma global la incidencia está aumentando debido al envejecimiento de la población, al incremento del diagnóstico precoz (campañas de cribado), a la dieta y a los hábitos de vida, entre otros factores.

En España, en el conjunto de la población, representa el tumor mas incidente: la incidencia estimada para el año 2021 es de 43.581 nuevos casos (29.372 de colon y 14.209 de recto), por sexos 25.678 casos nuevos en hombres y 17.903 casos en mujeres ( figura 2)



Fuente: Red Española de Registros de Cáncer

**Figura 2.** Número estimado de casos incidentes de cáncer en España por tipo tumoral, 2021. Ambos sexos

En relación a la mortalidad, en 2020 fallecieron en España 16.470 pacientes por CCR (14,6% de la mortalidad global por cáncer en España). Se ha observado una reducción de la mortalidad del 2,4% debido, principalmente, a las campañas de diagnóstico

precoz (que permite realizar el diagnóstico en fases más tempranas de la enfermedad e, incluso, de lesiones precursoras) y a las mejoras en el tratamiento.

Según los datos del *Surveillance, Epidemiology and End Results Program* (SEER), el 39% de los pacientes con CCR se diagnosticaron en estadios iniciales, el 35% en estadios avanzados y el 22% con enfermedad metastásica. La supervivencia relativa del CCR a los cinco años es del 64,4%, siendo del 89,9% en estadios localizados, del 71,3% cuando se afectan órganos adyacentes o ganglios regionales y del 14,2% en los casos metastásicos (porcentaje que ha aumentado en los últimos años debido a las mejoras en los tratamientos sistémicos y a la cirugía de las metástasis y técnicas ablativas locorregionales o combinaciones de ellas dentro de un manejo multidisciplinar del paciente) (Howlader y cols., 2019)

La gran mayoría de los CCR son esporádicos, un 5% se deben a mutaciones genéticas hereditarias y aproximadamente un 20% tienen agregación familiar; en este grupo no se ha detectado ningún síndrome hereditario y pueden deberse a alteraciones genéticas secundarias a una predisposición hereditaria o a factores dietéticos y ambientales comunes.

La edad es el factor de riesgo más importante para el CCR esporádico; la mayoría se diagnostican en pacientes mayores de 50 años, y a partir de esta edad el crecimiento es exponencial. La edad media para el cáncer de colon( CC) es de 68 años en varones y 72 en mujeres, mientras que para el cáncer de recto( CR) es de 63 años en ambos sexos. Aproximadamente el 11% acontece en menores de 50 años.

Dentro de los factores de riesgo destacar: antecedentes familiares y personales de CCR, pólipos colónicos, dieta pobre en fibra y alta en grasas y carnes rojas, obesidad, diabetes, consumo de alcohol, tabaquismo, sedentarismo, enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa, que es la más frecuentemente asociada, y enfermedad de Crohn) y antecedentes de uterosigmoidostomía, entre otros. (Turati y cols., 2017) En los últimos años se está investigando el papel de la microbiota y los desequilibrios

de esta en el desarrollo del CCR, así como el hecho de que la modulación del microbioma puede afectar a la respuesta a las diferentes terapias. (Wirbel y cols., 2019)

### **1.2.2 CARCINOGENESIS DEL CCR**

El CCR es una enfermedad heterogénea, aunque es una de las neoplasias cuya carcinogénesis se conoce mejor. Se produce como consecuencia de múltiples alteraciones, tanto genéticas como epigenéticas, que desregulan las vías de señalización involucradas en la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis. Existen tres vías de carcinogénesis del CCR, la vía supresora o de inestabilidad cromosómica, la vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites y el fenotipo CIMP (*CpG island methylation phenotype*) o la vía serrada. Cada una de estas vías presenta diferencias desde el punto de vista molecular, histopatológico y pronóstico, pero no son mutuamente excluyentes y algunos tumores presentan características de múltiples vías (Al-Sohaily y cols., 2012)

- Vía supresora o de inestabilidad cromosómica (IC): es la más frecuente y fue descrita por Volgestein; es responsable del 70-80% de los CCR esporádicos; también está presente en síndromes hereditarios como la poliposis adenomatosa familiar con mutación en la línea germinal del gen APC (*adenomatous polyposis coli*). Es la vía más conocida y se caracteriza por la inactivación de genes supresores de tumores (APC, SMAD4, DDC, TP53) o la activación de genes como KRAS, C-MYC, que favorecen que un pólipo llegue a transformarse en un carcinoma. Es la mutación del gen APC un evento precoz en la secuencia adenoma-carcinoma, que provoca un aumento de la señal de la vía WNT, activándose factores de transcripción relacionados con proliferación, diferenciación, migración y adhesión de las células colorrectales. Por otro lado, esta mutación puede aumentar la activación de las cinasas dependientes de ciclinas que controlan el ciclo celular, pudiendo escapar la célula de la apoptosis. También se puede producir mutación de PI3KCA, que conduce a un mayor crecimiento celular. Posteriormente se van produciendo otras mutaciones que facilitan la progresión tumoral en la secuencia adenoma-carcinoma como RAS, que lleva a la activación constante de la vía MAPK, que permite evadir la apoptosis y facilitar la proliferación celular. Más

tardíamente se producen otras mutaciones como la de TP53, que facilita la proliferación celular. Otras mutaciones necesarias para el desarrollo de un perfil invasor son las alteraciones en la vía de señalización del factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TFG- $\beta$ ) o a nivel de DCC (*deleted colorectal cancer*). En este tipo de tumores se observa desequilibrio cromosómico (aneuploidía) con deleciones, amplificaciones y alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad del brazo largo del cromosoma 18. Suelen ser tumores localizados en el colon izquierdo, bien diferenciados y con poca frecuencia de tumores mucinosos, y que no suelen presentar infiltración linfocítica.

- Vía mutadora: presente en aproximadamente el 15% de los CCR esporádicos y en casi todos los CCR de los síndromes no polipósicos. Se caracteriza por el acúmulo de mutaciones por un defecto en el sistema de reparación del ADN (*mismatch repair system*), compuesto por diferentes genes (MLH1, MSH2, MSH6, MLH3, PMS2 y PMS1); estas mutaciones ocurren con mayor frecuencia en los microsatélites (secuencias repetitivas cortas de ADN), y es lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites (IMS), alteración que constituye el marcador fenotípico del síndrome de Lynch, definido por la existencia de mutación germinal en uno de estos genes reparadores del ADN. Esta alteración del sistema reparador provoca el acúmulo de errores en microsatélites, y los genes supresores de tumores no son reparados, de modo que pierden su función, como por ejemplo TFG- $\beta$ 2 o gen Bax. La presencia de IMS tiene implicaciones pronósticas y predictivas de respuesta a fluoropirimidinas en estadios iniciales (estadios II). En los casos esporádicos, el mecanismo de IMS se debe a la hipermetilación a nivel de la región promotora de genes relacionados con el sistema de reparación del ADN, el más frecuente MLH1; un porcentaje importante se asocia a mutación del oncogén BRAF. Son tumores que se localizan con mayor frecuencia en el colon derecho suelen ser pobremente diferenciados, con presencia de infiltración linfocitaria, y mucinosos.
- Inactivación transcripcional: mediada por metilación de regiones ricas en citosina y guanina: denominada islas CpG promotoras de determinados genes supresores

de tumores, conocido como fenotipo metilador (CIMP) o vía serrada; es la identificada más recientemente y se distinguen tres tipos de fenotipos metiladores: ausencia de metilación, metilación baja y metilación alta. La lesión precursora suele ser el pólipo serrado en vez del adenoma convencional. En esta vía, la presencia de mutación de BRAF es un evento temprano y se suele encontrar en los de mayor metilación. También se observa en aquellos de baja metilación la presencia de mutación de KRAS.

Cada una de estas vías se asocia a determinadas características clínicas y anatomopatológicas; los tumores de localización izquierda suelen presentar inestabilidad cromosómica con mayor frecuencia que los de localización derecha, que tienen una mayor frecuencia de IMS y fenotipo metilador. Basándose en estas vías moleculares y en los eventos moleculares de cada una de ellas, en los últimos años se han descrito diferentes clasificaciones moleculares y, a través de un consorcio internacional, se ha elaborado una única clasificación molecular ( The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer )( tabla 3)

CSM1	CMS2	CMS3	CMS4
Inmune	Canónico	Metabólico	Mesenquimal
15%	40%	13%	25%
IMS*	IC	IC	IC
Mutación en BRAF	Epitelial	Epitelial	Mesenquimal
Infiltración inmunitaria mutación BRAF	Activación de rutas WNT, MYC y EGFR	Mutación RAS	Activación vías de TGFB, angiogénesis e infiltración estromal
Activación inmunológica	Sin activación inmunológica	Sin activación inmunológica	Inmunosupresión
Lado derecho	Lado izquierdo	Lado derecho	Ambos lados

**Tabla 3:** Adaptada de: 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(11):1350-6.

### ***1.2.3 CLÍNICA DEL CCR***

Los síntomas más frecuentes pueden derivar del tumor primario y su presencia, en mayor o menor medida, dependerá de la localización de este (anemia, alteraciones del ritmo intestinal, sangrado, presencia de masa palpable, dolor, obstrucción intestinal, tenesmo, cambio en el calibre de las heces, etc.), y en los casos de metástasis, síntomas/signos derivados de estas (ascitis, ictericia, dolor, hepatomegalia, derrame pleural, síntomas respiratorios, etc.) y otros como fiebre, síndrome constitucional con astenia, anorexia y pérdida de peso.

Un 30-40% de los CCR se localizan en el colon derecho (considerando desde el ciego al colon transversal) y el 60-70% en el colon izquierdo (desde el ángulo esplénico al recto), con características moleculares diferentes, distinto pronóstico y con diferente manejo terapéutico en la enfermedad metastásica, considerándose la localización y el perfil molecular a la hora de la elección del tratamiento.

### ***1.2.4 DIAGNÓSTICO DEL CCR***

El diagnóstico más precoz ha sido posible gracias a la mejoría de los métodos de cribado. En la actualidad, hay discrepancia sobre el cribado más eficiente del CCR, pero se proponen dos alternativas: la detección de sangre oculta en heces y la colonoscopia. La detección de sangre oculta en heces es un método más barato y menos invasivo frente a la segunda opción que por su parte es necesaria para confirmar el diagnóstico. En nuestro país, se recomienda la realización a partir de los 50 años de un test de sangre oculta en heces a la población general cada 2 años hasta los 74 años. En caso de positividad, se deberá realizar una colonoscopia. En el caso de pacientes con familiares de primer grado afectados con CCR o pacientes con enfermedades que predisponen al CCR (síndrome de Lynch, enfermedad inflamatoria intestinal entre otras), la edad a partir de la cual realizar dicho cribado disminuye. Si

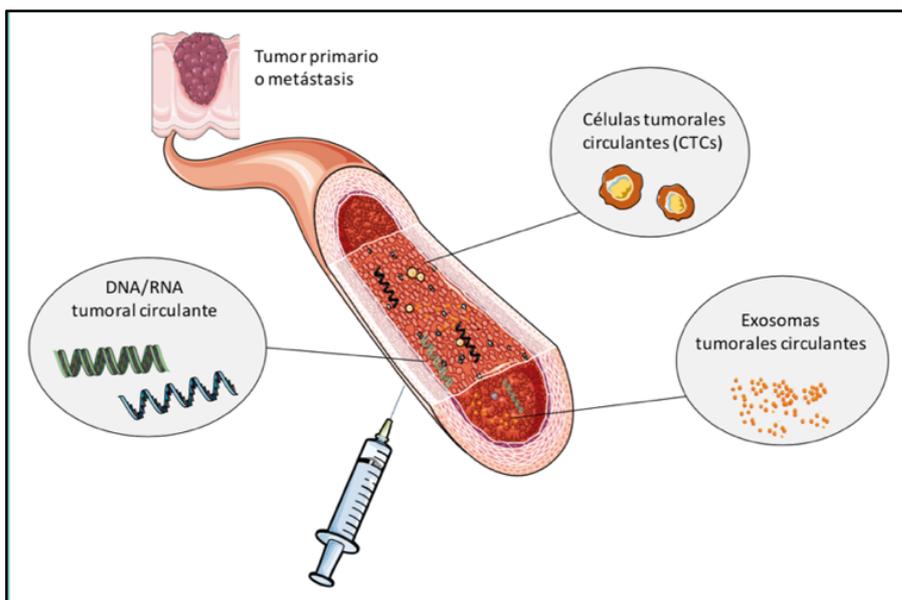
es posible, no obstante, se debería realizar colonoscopia al menos cada 5 años a partir de los 50 años, aunque dicha maniobra es poco eficiente.

#### 1.2.4.1 Diagnóstico histológico

Para la confirmación del diagnóstico es preciso realizar una biopsia para el estudio histológico, que aportará información sobre el tipo de tumor, el grado de diferenciación y otros marcadores moleculares útiles para la planificación terapéutica: RAS, NRAS, BRAF, alteraciones de los genes reparadores o inestabilidad de microsatélites. La biopsia se puede obtener bien del tumor primario o de la metástasis en los casos de debut sincrónico.

En los últimos años se está incorporando al arsenal diagnóstico la biopsia líquida, alternativa no cruenta, rápida y accesible que permite realizar estudios de biomarcadores en fluidos biológicos (sangre, saliva, orina, líquido ascítico) a través de la obtención del ADN libre circulante y que incluye el ADN tumoral circulante y, así, es posible llevar a cabo un análisis molecular útil para el diagnóstico, monitorización a lo largo de la evolución (también para la detección de mutaciones secundarias, por ejemplo, en RAS) y seguimiento (adelantando las recaídas o progresiones a las técnicas de imagen) (Crowley y cols., 2013) (Figura 3)

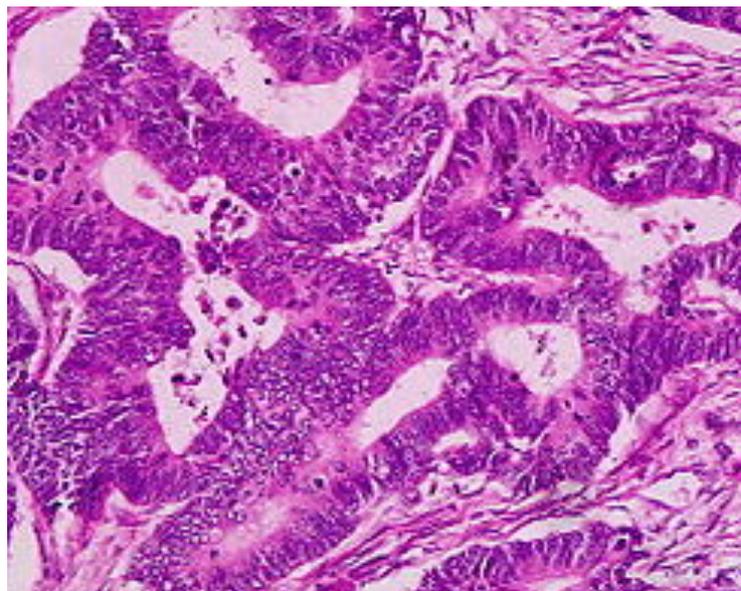
Figura 3: Principales componentes para realizar Biopsia líquida



Un 95% de los CCR son adenocarcinomas( figura 4); otros subtipos, definidos por la Organización Mundial de la Salud, son adenocarcinomas mucinosos, de células en anillo de sello, carcinoma escamoso, medular, adenoescamoso, neuroendocrino, indiferenciado y otros (melanomas, sarcomas, carcinoides, linfomas).



**Figura 4:** Imagen macroscópica de adenocarcinoma de colon



**Figura 5:** Adenocarcinoma de colon pobremente diferenciado

Dentro del estudio anatomopatológico es necesaria la determinación del grado de diferenciación; se han utilizado diferentes criterios desde Bordes en 1925, aunque la mayoría diferencian entre tres y cuatro grados; el recomendado por la octava edición del Manual TNM es el de cuatro grados: TNM 2017

- bien diferenciado (> 95% de formación de glándulas)
- moderadamente diferenciado (50-95% de formación de glándulas)
- poco diferenciado (< 50% de formación de glándulas)
- indiferenciado (sin formación de glándulas o mucina, sin diferenciación escamosa o neuroendocrina) (Figura 5)

#### **1.2.4.2 Estudio de extensión**

Las vías de diseminación más frecuentes en el CCR son:

- linfática: habitualmente sigue un orden anatómico, invadiendo en primer lugar los ganglios paracólicos y pararrectales, y desde ahí sigue en orden ascendente, en el caso de colon y aquellos rectos a más de 8 cm del margen anal hacia los ganglios mesentéricos superiores, mientras que los tumores rectales localizados desde el margen anal hasta los 3 cm diseminan hacia los linfáticos inguinales, y aquellos situados entre los 3-8 cm a los ganglios ilíacos internos;
- hematológica: se disemina a través de los vasos de la pared del colorrecto mediante el drenaje venoso portal, siendo el hígado el lugar más frecuente mas afectado por metástasis de CCR

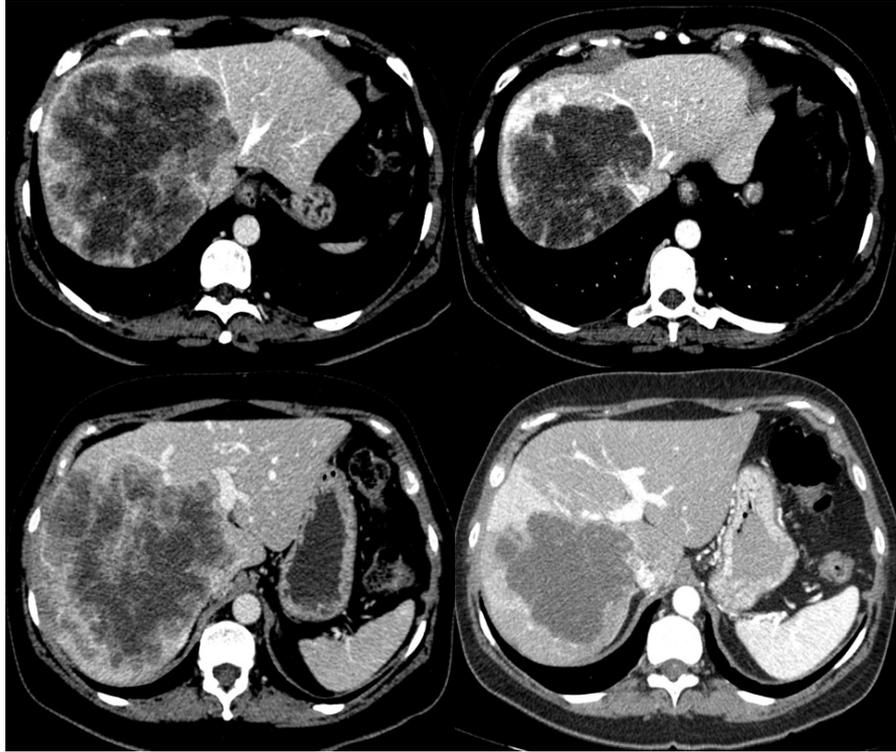
Una vez confirmado el diagnóstico de carcinoma colorrectal mediante biopsia,

se deberá completar estudio de extensión. El estudio debe incluir (Labianca y cols., 2013):

- Historia clínica completa, con especial atención a antecedentes personales y familiares de cáncer colorrectal y de otros tipos de neoplasia
- Grado funcional: grado ECOG y/o Índice de Karnofsky
- Exploración física con especial atención al tacto rectal
- Colonoscopia: (figura 6) siempre debe efectuarse una colonoscopia completa, ya sea preoperatoria, intraoperatoria o postoperatoria



- Biopsia endoscópica y diagnóstico histológico preoperatorio
- Estudio radiológico:
  - Radiografía de tórax simple postero-anterior y perfil
  - Tac abdominal ( figura 7)
  - Se puede plantear TAC torácico para completar estudio si hay sospecha de metástasis a distancia o en función del estadio final anatómo-patológico.



**Figura 7:** Estadificación con TAC TORACOABDOMINAL

-Colonoscopia virtual: A individualizar en cada caso para descartar lesiones sincrónicas a nivel colónico.

- Laboratorio:

- Hematología y bioquímica

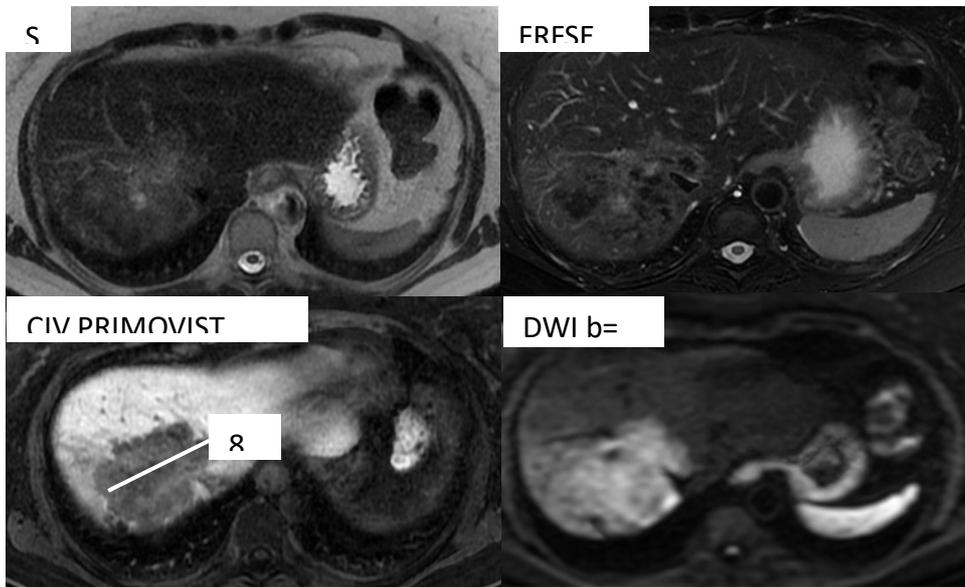
- Antígeno carcinoembrionario (CEA)

- Otras exploraciones:

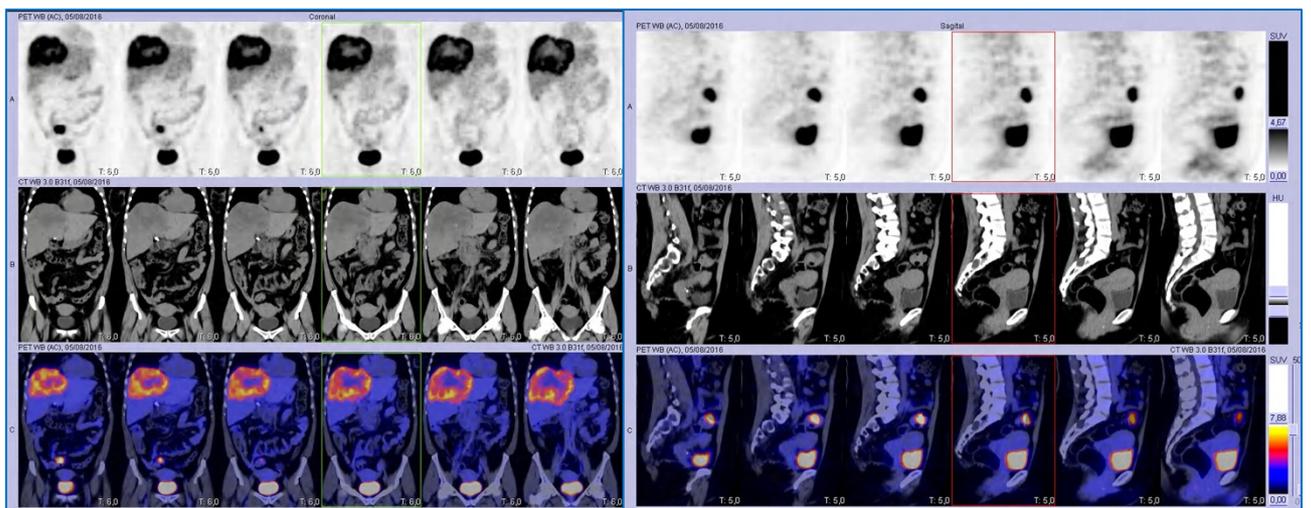
- Enema opaco: cuando no se pueda realizar la colonoscopia completa.

- Cistoscopia: cuando se sospeche invasión vesical

- Resonancia magnética (RM) es la prueba diagnóstica de elección para la estadificación hepática (figura 8)



**Figura 8 :** Metástasis hepática de CCR vista por RM hepática con contraste hepatoespecífico



**Figura 9:** PET-TAC: Neoplasia de colon sigmoide con metástasis hepáticas

-La indicación de tomografía por emisión de positrones (PET) en CCR se recomienda para descartar la existencia de metástasis a otros niveles antes de la resección

quirúrgica en la enfermedad metastásica resecable, o ante la sospecha de recurrencia con el resto de pruebas negativas (figura 9)

### 1.2.5 ESTADIFICACIÓN

El estadiaje es el factor pronóstico independiente más importante en CCR. Actualmente hay consenso en la utilización de la clasificación TNM de la AJCC, ( tabla 4) aunque históricamente se habían utilizado otras clasificaciones como la de Dukes. De acuerdo a la octava edición propuesta por el *American Joint Committee on Cancer*, el estadiaje de esta enfermedad debe realizarse en base a la anatomía patológica del tumor primario, a excepción de los casos con enfermedad metastásica que se consideran estadio IV, siendo estadio IVa cuando hay enfermedad en un solo órgano, estadio IVb si hay en más de uno y estadio IVc si hay enfermedad peritoneal (AJCC 8ª edición )

**Tabla 4** Clasificación TNM de cáncer colorrectal de acuerdo a la 8ª edición

<b>Tumor Primario (T)</b>	
<b>Tx</b>	No se puede evaluar tumor primario
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario
<b>T1s</b>	Carcinoma in situ (carcinoma intramucoso que afecta lámina propia pero no se extiende a la muscular de la mucosa)
<b>T1</b>	El tumor invade la submucosa a través de la muscular de la mucosa pero no en la muscular propia
<b>T2</b>	El tumor invade la muscular propia
<b>T3</b>	El tumor invade los tejidos pericólicas
<b>T4</b>	El tumor invade el peritoneo visceral (T4a) o infiltra órganos adyacentes o estructuras (T4b)
<b>Ganglios regionales (N)</b>	
<b>Nx</b>	No se puede evaluar ganglios regionales
<b>N0</b>	No existen ganglios locorregionales afectados

N1 N1a N1b N1c	Uno a tres ganglios afectados o depósitos tumorales  Un ganglio positivo  Dos o tres ganglios positivos  Depósitos tumorales en la subserosa, mesentérico o en los tejidos mesorectales o perirrectales
N2 N2a N2b	Cuatro o más ganglios positivos  Cuatro a seis ganglios positivos  Siete o más ganglios afectos
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1  M1a M1b  M1c	Metástasis en uno o más sitios distantes o peritoneo  Metástasis en un sitio sin afectación peritoneal  Metástasis en dos o más sitios sin afectación peritoneal  Metástasis en el peritoneo sólo o con otra localización

Estadio	T	N	M
0	T1s	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2 T1	N1/N1c N2a	M0 M0
IIIB	T3-T4a T2-T3 T1-T2	N1/N1c N2a N2b	M0 M0 M0
IIIC	T4a T3-T4a T4b	N2a N2b N1-N2	M0 M0 M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a

IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b
IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1c

### **1.2.6 FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS EN CCR**

El CCR es una entidad con un pronóstico variable en función de distintos factores clínicos, patológicos y moleculares. De forma similar, la respuesta a los tratamientos depende también de otros factores, algunos comunes con los pronósticos, que se conocen como factores predictivos.

#### **1.2.6.1. Factores clínicos, analíticos y patológicos**

A día de hoy, no hay un consenso claro sobre qué factores clínicos y analíticos son válidos y consistentes como factores pronósticos en el CCR, a excepción de la estadificación TNM. La clasificación pronóstica de Köhne, realizada en más de 3.000 pacientes y validada internamente, fue propuesta en 2002 previamente al conocimiento exhaustivo de la biología molecular (Khoney cols., 2002). En ella se establecieron tres grupos de riesgo: alto, medio y bajo, con una supervivencia global de 14,7, 10,5 y 6,4 meses, respectivamente. Esta clasificación se basa en el ECOG, los niveles de fosfatasa alcalina, el número de localizaciones metastásicas y el recuento de glóbulos blancos. Ha sido validada externamente en diferentes cohortes de pacientes con CCR metastásico (CCRm) y recientemente se ha publicado el análisis de datos de dos ensayos clínicos fase III en primera y segunda línea de CCRm RAS no mutado que reafirma su posible utilidad (Siena y cols., 2018). Sin embargo, a día de hoy en la práctica clínica no se utiliza habitualmente debido al mejor conocimiento de la biología molecular.

Respecto a los marcadores tumorales en sangre, los dos habitualmente solicitados y monitorizados son el CEA y el CA 19.9 (Levi y cols.,2008). Su valor pronóstico no está tampoco bien definido. En el caso del CEA, se trata de un factor pronóstico independiente y con el que se puede monitorizar la recurrencia en tumores localizados tras resección del tumor primario. Sin embargo, su papel en el CCRm está más

cuestionado. Los datos más recientes muestran que puede ser un factor pronóstico negativo en correlación con otros marcadores como es el caso de la serpina B5 expresada en el tumor. De forma similar, los niveles de CEA son más elevados en tumores con mutación de KRAS y su elevación está asociada a un peor pronóstico. En el caso del marcador tumoral CA 19.9, sí parece que se encuentra más frecuentemente elevado en pacientes con metástasis y que pudiera ser un factor pronóstico. Parece, igualmente, que CA 19.9 pudiera ser un marcador pronóstico para el desarrollo de metástasis pulmonares o peritoneales en pacientes con CCR con metástasis hepáticas. No obstante, existen también datos que muestran que la presencia de CEA y CA 19.9 en sangre es mayor en pacientes con CCR con metástasis hepáticas y que son factores independientes predictores de supervivencia en pacientes no resecables. En cuanto a los factores patológicos, la histología más frecuente de CCR es el adenocarcinoma. Sin embargo, se sabe que existen variantes como el adenocarcinoma mucinoso (10%) o el adenocarcinoma con células en anillo de sello (2%), con un peor pronóstico y una peor respuesta al tratamiento. En cierta manera, esto se debe a las características moleculares de peor pronóstico que llevan asociadas estos tipos de histologías, y que se describen en el siguiente apartado.

#### ***1.2.6.2. Factores moleculares pronósticos y predictivos de respuesta***

##### ***a. Vía de la inestabilidad de microsatélites (IMS)***

Se encuentra presente en aproximadamente el 15% de los tumores de colon esporádicos y es la vía responsable de la práctica totalidad de los tumores generados en los síndromes no polipósicos de cáncer colorrectal, como es el caso del síndrome de Lynch. La IMS consiste en la presencia de mutaciones en unas regiones repetidas del ácido desoxirribonucleico (ADN). Esto se produce por un defecto en el sistema de reparación del ADN (conocido como *mismatch repair system*) que se encarga habitualmente de reparar cuando dos nucleótidos no están emparejados. Las proteínas más frecuentemente alteradas de este sistema son MSH2 y MLH1. Los tumores generados por esta vía tienen características clínicas particulares: suelen ser proximales, más indiferenciados y tienen una histología mucinosa o medular con intenso infiltrado linfocítico. Suelen ser tumores de mejor pronóstico en el contexto

de tumores localizados, aunque no está tan claro en el contexto metastásico, dado que las respuestas a fluoropirimidinas son menores. (Sinicrope y cols., 2012)

Respecto a los tumores hereditarios generados por esta vía, la entidad más habitualmente asociada es el síndrome hereditario no polipósico (conocido también como síndrome de Lynch), enfermedad autosómica dominante producida a raíz de una mutación en la línea germinal de algún componente del sistema de reparación. Generalmente, la alteración suele ser por mutaciones en los genes MLH1 o MSH2, aunque también hay que tener en cuenta los genes PMS2, MLH6 o deleciones del gen de la molécula de la adhesión epitelial (EPCAM) que producen silenciamiento del gen MLH1. Estas mutaciones suelen ir asociadas a mayor riesgo de desarrollo de otros tumores, como es el caso de endometrio, gástrico u ovario. (Giannakis y cols.,2014) y cols. En relación con los tumores esporádicos generados por esta vía, son habitualmente secundarios al silenciamiento epigenético del promotor del gen MLH1 que lleva a la inactivación de estos genes. Una parte importante de estos tumores esporádicos se asocian a mutaciones en el oncogén BRAF (V600E), además, se asocia a la presencia de otras mutaciones como las mutaciones en la vía del factor de crecimiento tisular  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Por otra parte, en estos tumores, se han descrito mutaciones en los genes de la proteína en anillo 43 (RNF43) y de la R-espondina (RSPO). Se encuentran mutaciones en el receptor tipo 2 del factor de crecimiento tisular  $\beta$  (TGF- $\beta$ RII), SMAD2, SMAD4 o ACVR2 hasta en el 80% de estos tumores. También se han reportado mutaciones en el gen supresor de tumores proapoptótico BAX, en el receptor de crecimiento insulínico tipo 2, en el gen de PI3KCA o en el gen de la ciclina D1. (Montagut y cols., 2012, Barbarino y cols., 2014)

#### b. Alteraciones en la vía de las MAPK

La vía de las MAPK es relevante en el desarrollo del CCR, ya que casi dos terceras partes de los tumores presentan alguna alteración en ella.

##### **i.Alteraciones el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**

Las alteraciones más descritas en EGFR son la alteración en el número de copias, la sobreexpresión del receptor, las mutaciones en el gen que codifica dicho receptor y la

sobreexpresión de los ligandos de EGFR como epiregulina o anfiregulina. La expresión del receptor de membrana EGFR se observa en el 60-80% de los tumores colorrectales mediante técnicas de inmunohistoquímica. Sin embargo, solo un 20% aproximadamente de los tumores con expresión presentan una amplificación génica. En cualquier caso, no está claro el valor pronóstico de esta expresión ni tampoco el predictivo de respuesta a terapia anti-EGFR, aunque hay datos de que los tumores sin expresión de EGFR podrían también responder a cetuximab. Las mutaciones activadoras en el dominio catalítico de EGFR tienen un papel muy importante pronóstico y terapéutico en el cáncer de pulmón, aunque no así en el cáncer colorrectal, donde son poco frecuentes y no están asociadas a respuesta a terapia anti-EGFR, a excepción de la mutación S492R, que se ha descrito como mutación de resistencia a cetuximab, pero no a panitumumab. (Montagut y cols., 2012). En cuanto a la ganancia del número de copias de este gen, se debe bien a la amplificación del gen o a la polisomía del cromosoma 7 donde este se encuentra. Por ello, su prevalencia es muy variable, aunque se reporta hasta en un 50% de los casos. La amplificación del gen está asociada con respuesta clínica a cetuximab pero con una menor supervivencia, aunque la discrepancia en la metodología de medición ha hecho que no se considere un factor predictivo y pronóstico validado. La sobreexpresión de los ligandos del receptor como epiregulina y anfiregulina promueve el crecimiento tumoral y la supervivencia celular. Algunos estudios han sugerido un valor pronóstico positivo a altos niveles de estos ligandos en pacientes tratados con cetuximab.

## **ii. Alteraciones en la proteína RAS**

RAS es una proteína GTPasa que es capaz de unirse a la membrana citoplasmática que, al ser fosforilada, se convierte en una enzima activa que produce la fosforilación, a su vez, de otras proteínas involucradas en la cascada de señalización celular, entre ellas la vía de las MAPK. Esta proteína está codificada por tres oncogenes, que son KRAS, NRAS y HRAS. Cabe destacar que una mutación en alguno de estos oncogenes puede llevar a la formación de una proteína con un cambio conformacional que haga que esté constitutivamente activada y, por tanto, sea capaz

de inducir la proliferación celular. En el CCR, los oncogenes alterados son con mayor frecuencia en este orden: KRAS y NRAS.

KRAS se encuentra mutado en el adenocarcinoma de colon en aproximadamente el 40% de los casos. El gen codifica a una proteína de 188 aminoácidos que tiene actividad inherente catalítica, situándose cerca de la membrana celular. La activación de RAS se produce cuando esta proteína presenta unión a GTP (trifosfato de guanosina) y no a GDP (difosfato de guanosina). Cuando hay una mutación en esta proteína, RAS permanece unida en todo momento al GTP y se produce una activación sin control de toda la vía de señalización intracelular. Los principales lugares de mutación son, en este orden, el exón 2 (codones 12 y 13), el exón 3 (codones 59 y 61) y el exón 4 (codón 146). Hasta un 95% de las mutaciones ocurren en el exón 2, siendo la más frecuente la mutación en el codón 12, con un cambio de una guanina por una adenina en dicha posición (KRAS G12D). En cuanto al papel pronóstico de la mutación de KRAS, se ha consensuado que puede conferir una peor supervivencia, aunque es cierto que existen datos contradictorios. (Hutchins y cols., 2011).

La mutación en NRAS está presente en menos del 5% de los tumores colorrectales, y, al igual que KRAS, se encuentra principalmente mutada en el exón 2 (codones 12 y 13). Su impacto pronóstico no ha sido claramente establecido, aunque parecen más prevalentes en el colon izquierdo, y en estudios retrospectivos han mostrado un peor pronóstico que los KRAS mutados y salvajes.

En cuanto al papel como predictor de respuesta, es indudable que la presencia de mutación en KRAS y NRAS confiere una resistencia a tratamiento antiEGFR por lo que se considera un factor predictivo negativo de respuesta. Un metaanálisis que incluyó un total de 5.948 pacientes de nueve ensayos clínicos aleatorizados fase II y III confirma estos resultados. (Sorich y cols., 2015)

La mutación en el gen BRAF en el CCR es poco frecuente (en torno al 8-12%) y se ha asociado a un determinado fenotipo: parece más habitual en mujeres y en estadios más avanzados. Asimismo, tradicionalmente se ha relacionado con tumores de colon derecho, pobremente diferenciados, con histología mucinosa y con IMC. Además,

parece que presentan más metástasis peritoneales y menos enfermedad limitada al hígado o pulmón. En cuanto al papel pronóstico de BRAF, parece que la mutación, principalmente V600E (más del 90% de los casos), es un factor negativo pronóstico, aunque su asociación con la IMS debe tenerse en cuenta. (Seligmann y cols., 2017). Por lo que se refiere al valor predictivo de respuesta de BRAF, este es más controvertido. A pesar de que las respuestas al tratamiento son limitadas, no parece que existan diferencias según la quimioterapia realizada esté basada en oxaliplatino o irinotecán. La combinación de todos los fármacos (FOLFOXIRI) con bevacizumab parecía mostrar un beneficio mayor cuando existía la presencia de una mutación en BRAFV600E pero no ha sido confirmado en el último metanálisis publicado (Cremolini y cols., 2020). En cuanto al valor predictivo de respuesta a anticuerpos anti-EGFR, no está bien establecido. Estos datos han sido analizados conjuntamente en dos metaanálisis. El primero de ellos, llevado a cabo por Pietrantonio y cols., 2015, sugirió un valor predictivo negativo de esta mutación para el tratamiento con anticuerpos anti-EGFR: cetuximab y panitumumab no mejoraban la supervivencia libre de progresión (SLP) (HR 0,88;  $p = 0,33$ ), la global (HR 0,91;  $p = 0,63$ ) ni la tasa de respuestas (*odds ratio* [OR]: 1,31;  $p = 0,25$ ) comparados con el brazo control. Por el contrario, el metaanálisis de Rowland sugiere que no hay evidencia suficiente para descartar el uso de estas terapias en pacientes con cáncer colorrectal metastásico (CCRM) con mutación BRAFV600E. No obstante, no todas las mutaciones de BRAF confieren mal pronóstico: las mutaciones en los codones 594 y 596 tienen un fenotipo diferente y su supervivencia es mayor que los BRAF mutados en V600E (62 *versus* 12,6 meses; HR 0,36;  $p = 0,002$ ) (Jones y cols., 2017)

### c.Alteraciones en la vía de PIK3CA y PTEN

En condiciones normales, la vía de PIK3CA se encarga de la apoptosis y de estimular el crecimiento celular y la proliferación. En el CCR se han descrito principalmente alteraciones en PIK3CA y en PTEN. Pero al contrario que ocurre con las alteraciones de la vía de la MAPK, no se recomienda, a día de hoy, realizar de forma rutinaria el análisis, dado que desde el punto de vista pronóstico y predictivo de respuesta, los datos no son consistentes. (Van Cutsem y cols., 2016). Las mutaciones de PIK3CA se han reportado en torno al 15% de los tumores colorrectales, principalmente en los

exones 9 y 20, que conlleva la activación constitutiva enzimática de la subunidad p100a, lo que produce activación continua de la vía. Al contrario que las mutaciones de KRAS y BRAF, no son mutuamente excluyentes. En cuanto al papel pronóstico, diversos metaanálisis han concluido que los tumores con mutación de PIK3CA presentan peor tasa de respuesta y de SLP, aunque parece que mayoritariamente debido a la mutación del exón 20. Sin embargo, existen datos contradictorios sobre el papel pronóstico, teniendo en cuenta PIK3CA como factor pronóstico independiente respecto a otros factores como mutaciones en KRAS o BRAF. En cuanto al valor predictivo de respuesta a anti-EGFR, los datos publicados no son suficientes para considerar la mutación de PIK3CA como de resistencia a dicha terapia. Por todo ello, a día de hoy, la determinación de PI3KCA no se practica rutinariamente en pacientes con CCR. Al igual que con PIK3CA, no hay suficiente evidencia para recomendar el análisis de PTEN de forma rutinaria en el CCR. PTEN es un gen supresor de tumores que evita la activación de la vía de PI3K. En el momento en que hay una pérdida o mutación de este gen, el resultado es que deja de ejercer su función y se produce una activación de la vía. Se han reportado alteraciones de PTEN en el 10% de los casos aproximadamente. No existe una clara asociación pronóstica en el CCR. En cuanto al valor predictivo de PTEN en lo que respecta a terapia anti-EGFR, también existen discrepancias, y aunque hay estudios que mostraron falta de beneficio en caso de pérdida de PTEN, otros no observaron diferencias significativas

#### d. Biomarcadores predictivos de eficacia o toxicidad de la quimioterapia

Existen varios marcadores que se han relacionado con eficacia o toxicidad a fármacos quimioterápicos usados en el CCR, como el 5-fluorouracilo (5-FU) /capecitabina, irinotecán y oxaliplatino. UGT1A1 es responsable de la glucuronidación de la bilirrubina, así como de la glucuronidación de SN-38, el metabolito activo del irinotecán. La actividad enzimática de UGT1A1 está estrechamente asociada con los polimorfismos genéticos de UGT1A1, especialmente UGT1A1 \*28 y UGT1A1 \*6, que están asociados con el síndrome de Gilbert y que también se relacionan con la gravedad de las toxicidades inducidas por irinotecán. Se ha demostrado que el alelo \*28 está asociado con un mayor riesgo de desarrollar neutropenia y diarrea en

pacientes que reciben irinotecán. (Barbarino y cols., 2014). La dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) es una enzima clave en el catabolismo metabólico de 5-FU y capecitabina. El déficit de DPD se ha correlacionado con alta toxicidad a 5-FU y capecitabina. Los pacientes con deficiencia parcial conocida de DPD se benefician de la adaptación de la dosis de su terapia con 5-FU/capecitabina para evitar toxicidad grave. En pacientes con deficiencia completa de DPD no se deben usar fluoropirimidinas y se ha de ofrecer un tratamiento alternativo. Sin embargo, la frecuencia de déficit de DPD es extremadamente baja y la técnica de determinación no está bien establecida. (Meulendiks y cols., 2015). La expresión de ERCC1 se ha relacionado con mal pronóstico y poca eficacia a oxaliplatino. Por lo tanto, la alta expresión de ERCC1 parece conferir resistencia al oxaliplatino, mientras que los polimorfismos ERCC1-C118T predicen respuesta al tratamiento con oxaliplatino. Sin embargo, a falta de evidencia más sólida, su determinación no se recomienda de forma rutinaria (Yoshino y cols., 2018 ). La timidilato-sintasa (TS) es la diana principal de 5-FU. Se ha demostrado que los bajos niveles de expresión de TS conducen a una mejor respuesta al 5-FU y a una mejor supervivencia de los pacientes con CCR. El gen de TS (TYMS) está regulado por un promotor que actúa como potenciador (TSER). Algunos estudios han demostrado que un aumento en el número de repeticiones de TSER (TSER2\*, TSER3\* o superior) se asocia a una mayor expresión y actividad de TS. Por lo tanto, la actividad de TS y la sensibilidad a 5-FU parecen correlacionarse con los polimorfismos de TSER. Sin embargo, estas correlaciones deben confirmarse en estudios aleatorizados y no se recomienda la actividad TS y el genotipo TSER para su uso en la práctica clínica.

## **1.2.7 TRATAMIENTO DEL CCR**

### **1.2.7.1 Tratamiento del cáncer de colon (CC) localizado**

La cirugía es el tratamiento de elección en los pacientes con CC y enfermedad locorregional al diagnóstico, sin embargo la recidiva sistémica tras la cirugía es frecuente y suele ser la causa final de fallecimiento en estos pacientes. En función del estadio de la enfermedad se establece la supervivencia a 5 años en los pacientes tras cirugía sola: estadio I: 78-74%, estadio II 67-38% y estadio III (78-28%). Después de

la resección curativa, el tratamiento adyuvante con quimioterapia (QT) es el estándar actual de pacientes con CC estadio III y debe considerarse en pacientes CC estadio II de alto riesgo.

#### **1.2.7.1.1 Tratamiento adyuvante en pacientes estadio III**

El beneficio de combinaciones con oxaliplatino se ha demostrado en tres estudios de referencia. La actualización del estudio MOSAIC a 6 años de seguimiento, confirma el beneficio en SLP para el brazo con Oxaliplatino y una ventaja también en Supervivencia global (SG)) pero sólo para los pacientes estadio III . (André y cols., 2015). El ensayo NSABP C-07 confirma el beneficio en SLP para el brazo de oxaliplatino y la magnitud de reducción en el riesgo de recurrencia fue similar a la del ensayo MOSAIC. (Yothers y cols., 2011). .El estudio fase III XELOXA en pacientes en estadio III demuestra que XELOX( oxaliplatino+ capecitabina) fue bien tolerado y superior a la fluoropirimidina iv. (Schmoll y cols., 2015). Un análisis agrupado de datos de pacientes individuales de 4 ensayos aleatorizados reveló que la adición de oxaliplatino a capecitabina o 5-FU / Leucovorin( LV) mejoró los resultados en pacientes con CC estadio III. Basándose en estos datos, XELOX/ FOLFOX se considera tratamiento estándar categoría 1 como terapia adyuvante para pacientes con CC en estadio III.( Schmoll y cols., 2014). El ensayo X-ACT mostró que la capecitabina es un agente activo con un perfil de toxicidad favorable y después de 4,3 años de seguimiento, los datos siguen confirmando la equivalencia en términos de SLP entre capecitabina y 5-FU / LV en pacientes en estadio III considerándose este tratamiento una alternativa para aquellos pacientes no candidatos a tratamiento en combinación con oxaliplatino. (Twelves y cols., 2012).

Actualmente no hay ningún papel para agentes dirigidos asociados con la quimioterapia en el tratamiento adyuvante del CC. Todos los ensayos que evaluaron bevacizumab( NSABP C-08 , AVANT) o cetuximab( NCCTG NO147 y PETACC-8) son negativos, probablemente debido a las diferentes características biológicas de la enfermedad localizada y la enfermedad avanzada. En marcha el estudio IROCAS

que randomiza a pacientes estadio III de alto riesgo( pT4N1 o pT1-4 N2) a 6 meses de tratamiento adyuvante con esquema FOLFOX vs FOLFIRINOX

En cuanto a la duración del tratamiento adyuvante, hasta el momento se considera estándar una duración de 6 meses; recientemente se ha publicado el estudio IDEA en el que se realiza el análisis conjunto de 6 estudios fase III que investigan la no inferioridad de 3 meses(m) vs 6 m de tratamiento adyuvante basado en Oxaliplatino para pacientes con CC estadio III. El objetivo primario del estudio fue SLP. La neurotoxicidad grado 3 fue significativamente superior para el brazo de 6 m. En la cohorte general no se consigue demostrar la no inferioridad de 3 vs 6m; en el análisis por grupos de riesgo, estratificado pero no preespecificado, para los pacientes considerados de bajo riesgo (T1-3N1) se demuestra la no inferioridad de 3 vs 6 m de tratamiento adyuvante con esquema XELOX pero no para los pacientes tratados con FOLFOX. (Grothey y cols., 2018) ( tabla 5)

<b>Objetivo secundario: SG a 5 años</b>	<b>CAPOX</b>	<b>FOLFOX</b>	<b>Subgrupo bajo riesgo (T1-T3 y N1)</b>	<b>Subgrupo alto riesgo (T4 ó N2):</b>
<b>3 MESES</b>	No significativamente no inferior 3 meses versus 6 meses 82.1%	No significativamente no inferior 3 meses versus 6 meses 82.6%	No significativamente no inferior 3 meses versus 6 meses 89.6%	No significativamente no inferior 3 meses versus 6 meses 72%
<b>6 MESES</b>	HR 0.96 IC 95%:0.85-1.08; p=0.033 81.2%	HR 1.07 IC 95%:0.97-1.18; p=0.34 83.8%	HR 0.95 IC 95%:0.84-1.08; p=0.033 88.9%	HR 1.08 IC 95%:0.98-1.19; p=0.39 74.1

**Tabla 5** : Resultados estudio IDEA en relación a la duración del tratamiento adyuvante

### 1.2.7.1.2 Tratamiento adyuvante del CC estadio II

El valor potencial que pueda tener la QT adyuvante para pacientes de CC en estadio II sigue siendo polémico. Aunque el riesgo de recidiva de algunos subgrupos de pacientes de CC en estadio II puede ser mayor que pacientes con estadio III no hay pruebas congruentes de que la QT se relacione con una mejor SG en comparación

con la cirugía sola. Actualmente se aceptan como pacientes de alto riesgo dentro del estadio II aquellos con al menos uno de las siguientes características clínicas: tumor pobremente diferenciado, menos de 12 ganglios linfáticos regionales analizados, invasión vascular, linfática o perineural, obstrucción o perforación del tumor al diagnóstico y pT4. El impacto de la QT adyuvante en pacientes con CC en estadio II se ha valorado en varios ensayos clínicos con resultados contradictorios. Verhoeff 2016 y cols. El beneficio de oxaliplatino en la terapia adyuvante para pacientes con CC en estadio II también es controvertido. Los resultados de un reciente análisis post-hoc exploratorio del estudio MOSAIC no mostraron un beneficio significativo de SLE para oxaliplatino en estadio II en un seguimiento de 6 años. Además, los pacientes con estadio II de alto riesgo que recibieron FOLFOX no mejoraron la SLE. Se observaron resultados similares en el ensayo C-07, en pacientes con estadio II. Recientemente se presenta un análisis prospectivo de los datos individuales de los pacientes con estadio II de alto riesgo de 4 ensayos Fase III incluidos en estudio IDEA. (Iveson y cols., 2019). No se consigue demostrar la no inferioridad de 3 vs 6 m si bien en el análisis por subgrupos observamos que 3m de XELOX fue no inferior a 6 m. Por lo tanto, a día de hoy el tratamiento adyuvante de pacientes con CC estadio II debe ser individualizado en función de los factores de riesgo de cada paciente. Se sigue investigando en la búsqueda de factores clínicos y moleculares que ayuden a una mejor selección de los pacientes

#### **1.2.7.1.3 Individualización del tratamiento adyuvante en CC**

**a. Papel de la IMS** Es fundamental en la toma de decisiones del tratamiento adyuvante por sus implicaciones pronósticas. Esto tiene particular valor en el estadio II. El estudio PETACC-3 puso de manifiesto que los tumores con IMS son más frecuentes en los estadios II que en los estadios III (22 vs 12%). Esto significaría que este tipo de neoplasias tiene menor probabilidad de metastatizar y se trataría de tumores de mejor pronóstico. Por el contrario, este impacto favorable en términos de pronóstico parece quedar más diluido en los estadios III de modo que entrarían en juego más factores como por ejemplo la localización tumoral. Cabe destacar que algunos estudios han sugerido que la IMS puede constituir un biomarcador predictor de modo que podría existir un efecto detrimental del tratamiento con

fluoropirimidinas en monoterapia en estadios II. La última versión de las guías NCCN recomienda la determinación de IMS a todos los pacientes que van a recibir tratamiento adyuvante. Recientemente se ha publicado un estudio que tiene como objetivo principal, a partir de los datos de pacientes incluidos en siete estudios de CCR que reciben tratamiento quimioterápico adyuvante, analizar retrospectivamente la SG en relación al sistema de reparación del DNA (MMR) y del status mutacional de BRAF; para establecer su aparente valor pronóstico. De los 2630 pacientes analizados, 307 (11.7%) presentaron mutación en BRAF y 271 (10.3%) presentaron status IMS/dMMR. Un 33.6% de los pacientes IMS/dMMR presentaban también mutaciones en BRAF. En el análisis multivariante los factores asociados a peor pronóstico fueron la edad avanzada, la localización proximal, T4, N2, alto grado, mutación en KRAS y la recurrencia precoz. Cuando se ajusta el modelo a factores clinicopatológicos los factores asociados a peor pronóstico fueron el status MSS/pMMR y la mutación de BRAF. (Taieb y cols., 2019)

#### **b. Plataformas de determinación multigénica**

Las plataformas más desarrolladas son Oncotype DX y ColoPrint. Oncotype DX logra establecer una clasificación pronóstica en alto, medio o bajo riesgo de recurrencia. Se ha validado en estadios II y III en los estudios QUASAR y NSABP. Estos estudios demostraron que estos índices de recurrencia tenían valor para recaída, SLP y SG. De este modo, el porcentaje de recaída a 3 años para riesgo bajo, intermedio y alto fueron del 12%, 18% y 22% respectivamente. Los análisis multivariados evidenciaron que el resultado de la firma constituía un factor de riesgo de recaída independiente a TNM, MSI, grado de diferenciación y número de ganglios analizados en estadios II y III. ColoPrint ofrece un riesgo de recurrencia alto *vs* bajo. (Kopez y cols., 2015). La validación clínica se llevó a cabo en 416 pacientes con CC estadio II, de los cuales 301 enfermos presentaban características T3/No-MSI. Justamente en este subgrupo de pacientes, un 59% fue clasificado como riesgo bajo presentando un riesgo de recaída del 9.9% a 5 años. Por el contrario, los pacientes clasificados como alto riesgo por la plataforma (31% restante) presentaron un riesgo de recaída del 22.4% a 5 años. Cabe destacar que los factores clínico-patológicos clásicos no consiguieron identificar estos dos perfiles de pacientes (15% *vs* 13% riesgo de recaída para riesgo alto/bajo en base a criterios estándar). Sin embargo, a día de hoy no existe

evidencia suficiente como para recomendar el uso de estas plataformas en la práctica clínica rutinaria fundamentalmente por la falta de valor predictivo respecto a la quimioterapia.

### **c. Papel de la biopsia líquida en el tratamiento adyuvante del CC**

La detección en sangre de ADN tumoral circulante (*ctDNA*) tras la cirugía podría ayudar a identificar la enfermedad mínima residual que puede predecir la recurrencia tumoral sobre todo en estadio II, donde el papel del tratamiento adyuvante es controvertido. Estudios retrospectivos y pequeños han mostrado evidencia al respecto, aunque es difícil extraer conclusiones por la heterogeneidad de los métodos de análisis y los estadios incluidos (tabla 6).

Sin embargo, los datos más consistentes proceden de un estudio prospectivo de 230 pacientes tras resección de neoplasia de colon estadio II que realizó seguimiento de una mutación en *ctDNA* (concretamente la mutación con mayor fracción mutante alélica) (Sholer y cols., 2017). En este estudio se determinó que la detección de *ctDNA* tras la QT se asociaba con una menor recurrencia libre de enfermedad y que el *ctDNA* poscirugía puede ser un marcador subrogado de enfermedad mínima residual. Sin embargo, este estudio tiene importantes limitaciones, como que solo se realizó el seguimiento de una mutación y no se refleja la heterogeneidad tumoral por ello.

El grupo australiano liderado por Jeanne Tie publicó el trabajo de biopsia líquida en pacientes con CC estadio II (Tie y cols., 2019). De cada paciente, se realizó un panel de secuenciación del tumor primario que incluyó mutaciones en TP53, APC, KRAS, BRAF, PI3K, FBXW7 y SMAD4. Identificadas las mutaciones propias de cada tumor, tras la cirugía del primario realizaron seguimiento en plasma de las mutaciones previamente identificadas. La determinación de *ctDNA* tras la cirugía demostró con una HR de 18 (IC95% 7.9-40) el alto riesgo de recaída de los pacientes con *ctDNA* positivo tras la cirugía. Por otro lado, el grupo danés liderado por Reinert, evaluó el papel de *ctADN* en estadios I-III siendo la mayor parte de los pacientes estadios III. De manera similar al estudio australiano en las muestras de plasma postquirúrgica, el 10% de los pacientes presentaban *ctDNA* positivo siendo la HR de recidiva en caso de biopsia líquida positiva de 7.2 (IC95% 2,7-19). En los análisis de plasma

longitudinales la sensibilidad de la biopsia líquida aumentaba de forma significativa, permitiendo identificar con mayor precisión aquellos pacientes con mayor riesgo de recidiva (HR 43.5 IC95% 9,8-193,5) (Reinert y cols., 2019). Finalmente, en el congreso ASCO GI 2021 se presentó la actualización del trabajo del grupo danés que incluyó 90 pacientes en estadio II y 166 pacientes en estadio III. El dato más relevante en esta actualización fue que el seguimiento longitudinal demostró aumentar la sensibilidad y la especificidad para identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de recidiva (HR 51, IC95% 20-126) demostrándose que la determinación seriada de ctDNA es el factor pronóstico actualmente más robusto. (Henriksen y cols., 2021).

Sin embargo, es importante resaltar la heterogeneidad entre los distintos estudios que han evaluado la biopsia líquida en cáncer de colon localizado, particularmente que las tecnologías para evaluar el ctDNA son distintas y que la definición de biopsia líquida positiva también difiere entre los distintos grupos. Actualmente hay múltiples estudios en marcha que están implementando la biopsia líquida para intentar adecuar la adyuvancia en función del riesgo de recidiva.

Estudio	Población	Mutaciones y técnica utilizada	Momento de determinación del ctADN	Resultados
<b>Frattini y cols</b>	70 pacientes Estadio II: 36 Estadios III: 28 Estadio IV: 6	KRAS p16INK PCR convencional	Precirugía 4-10-16 meses tras la cirugía	solo en 13 había alteraciones en plasma y tejido concordante.
<b>Lindforss y cols.</b>	25 pacientes Estadio I: 4 Estadio II: 7 Estadio III: 13 Estadio IV: 1	KRAS Electroforesis	Precirugía Día +3 tras cirugía	Al 3er día en ocho pacientes se seguía observando mutación de KRAS
<b>Reinert y cols</b>	14 pacientes Estadio I: 1 Estadio II: 6 Estadio III: 3 Estadio IV: 4	Mutaciones específicas de cada tumor identificadas por NGS ddPCR	Preoperatorio Ocho días postcirugía Treinta días postcirugía Cada 3 meses	Sensibilidad y especificidad en detectar recaída posquirúrgica del 100%

<b>Scholer y cols.</b>	45 pacientes Estadio I: 5 Estadio II: 8 Estadio III: 8 Estadio IV: 24	Alteraciones somáticas puntuales detectadas en tumor por NGS ddPCR	Preoperatorio Dia 8 postcirugía Dia 30 postcirugía Cada 3 meses	Se detectó ctADN de media 9.4 meses antes de la progresión radiológica.
<b>Tie J y cols.</b>	250 pacientes estadio II	Alteraciones somáticas detectadas en tumor por NGS (Safe-SeqS assay)	4-10 semanas tras la cirugía, posteriormente cada 3 meses.	El 9% de los pacientes tenía biopsia líquida positiva postquirúrgica de los cuales, el 80% recidivó.
<b>Herniksen y cols.</b>	260 pacientes Estadio I: 4 Estadio II: 90 Estadio III: 166	Signatera	En la cirugía, 30 días tras la misma y cada 3 meses	El 83% de los pacientes con biopsia líquida postquirúrgica recidivaron frente al 13% que recidivaron con biopsia líquida postquirúrgica negativa

**Tabla 6** Principales estudios sobre el papel de ctADN tras la cirugía de cáncer colorrectal

#### **d.Subtipos moleculares e Inmunoscore (IS)**

Diferentes trabajos analizan la asociación entre supervivencia y los subtipos intrínsecos en pacientes con estadio II y III de CC concluyendo que, si bien los subtipos intrínsecos se distribuyen de forma diferenciada ente colon derecho e izquierdo a excepción del subtipo mesenquimal, no se demuestra su valor pronóstico ni predictivo de respuesta a tratamiento adyuvante con oxaliplatino. (Dietnsmann y cols., 2019). En ASCO 2019 se presenta como comunicación oral un análisis de los subtipos moleculares de los pacientes incluidos en el estudio MOSAIC observando que el subtipo enterocítico no parece beneficiarse del tratamiento con oxaliplatino y

que el subtipo stem-like tiene peor pronóstico y no se beneficia del tratamiento con oxaliplatino.

El IS es un sistema de puntuación para resumir la densidad de los efectores de células T CD3 + y CD8 + dentro del tumor y su margen invasivo proporcionando una estimación fiable del riesgo de recurrencia en pacientes con CC. Al capturar las densidades de ambos tipos celulares en ambas regiones, IS proporciona un sistema de puntuación que va desde densidades de células inmunitarias bajas (Immunoscore 0) a altas (Immunoscore 4) en ambas ubicaciones. IS se ha validado recientemente en una cohorte prospectiva de más de 2500 pacientes en estadios TNM I-III (Pages y cols., 2019.) Se mostró que el IS fue un predictor potente del tiempo libre de recurrencia, la SG y SLE (todos ellos con una  $p < 0,0001$ ), independientemente de otros factores clínicos del paciente, como la edad, el sexo o si eran pacientes MSI. Estos resultados sugieren que la implementación del IS al actual TNM podría mejorar la clasificación pronóstica en CC localizado. (Pages y cols; 2020) Las potenciales ventajas de este enfoque son múltiples, entre ellas: mejorar la clasificación pronóstica de los pacientes con cáncer y la mejor identificación de los pacientes con alto riesgo de recurrencia tumoral. Pese a ello, su papel en la predicción de los beneficios de la QT es actualmente incierto. Esta interacción dinámica entre las células tumorales y el sistema inmune ha sido definida recientemente como “contexto inmune”, representado los parámetros inmunológicos preexistentes asociados con la supervivencia del paciente. (Bruni y cols., 2020).

#### **1.2.7.2 Tratamiento del cáncer de recto (CR) localizado**

El cáncer de recto, supone aproximadamente un tercio de los pacientes que se diagnostican de cáncer colorrectal. Su localización y evolución natural le confieren un especial riesgo de recidiva locorregional con un abordaje terapéutico diferente en la enfermedad localmente avanzada al del cáncer de colon. En los últimos años los avances diagnósticos y terapéuticos así como el abordaje multidisciplinar, han permitido una mejor estadificación y tratamiento. Esto ha supuesto una reducción significativa de las recidivas locorregionales, un beneficio en SG y una reducción de la morbimortalidad. En cambio no se han observado avances en el desarrollo de

recidivas a distancia en este tiempo. La cirugía basada en la escisión total del mesorrecto, constituye el pilar fundamental del tratamiento radical del cáncer de recto. A pesar de la mejora en las técnicas quirúrgicas hasta un 30% de los pacientes intervenidos de cáncer de recto localmente avanzado (CRLA) al diagnóstico pueden recidivar localmente con tratamiento quirúrgico exclusivo. En estos casos el tratamiento QT-Radioterapia(RT) adyuvante y principalmente neoadyuvante(NA) reduce significativamente las recidivas locales y la necesidad de colostomías definitivas. (Glynne-Jones y cols., 2017). En este sentido disponemos de diferentes estrategias de tratamiento encaminadas tanto a la reducción de las recidivas locales como las recidivas a distancia

#### 1.2.7.2.1. Quimiorradioterapia neoadyuvante

Las teóricas ventajas del tratamiento NA: mayor sensibilidad del tumor a la radioterapia, cirugía más conservadora, aumento de la tasa de respuesta completa patológica (pRC) y la erradicación de posibles micrometástasis llevaron al desarrollo de múltiples estudios en este contexto. El estudio alemán AIO-94 confirmó que la administración de QT-RT con 5FU previo a la cirugía conseguía una reducción significativa de las recidivas locales (6% vs 13%, p 0.006) con una menor toxicidad (27% vs 40%, p 0.001) frente al mismo esquema de tratamiento administrado postoperatoriamente, sin diferencias en SG. Estos resultados se mantuvieron en el seguimiento a 10 años publicado posteriormente. Tras la publicación de este estudio en 2004 la QT-RT con 5-FU NA se convirtió en el estándar de tratamiento del CRLA. (Rödel C y cols., 2015). Posteriormente la concomitancia de la radioterapia con capecitabina NA demostró la no inferioridad de la capecitabina frente al esquema estándar. Se ha explorado la asociación de otros citostáticos como oxaliplatino o irinotecan y/o anticuerpos monoclonales al tratamiento QT-RT sin que hayan demostrado beneficio en supervivencia a pesar de aumentar la pRC y si una mayor toxicidad, por lo que ninguno se ha incorporado hasta la fecha al tratamiento estándar.

#### 1.2.7.2.2 Radioterapia de ciclo corto (SCRT)

La radioterapia de ciclo corto (SCRT) previa a la cirugía también ha demostrado disminuir de forma significativa las recidivas locales frente a la cirugía sola con un

beneficio en la SG en la mayoría de los estudios publicados. Comparada frente a QT-RT neoadyuvante, los principales estudios realizados (polaco y australiano/neozelandés) no observan diferencias significativas en SG ni preservación de esfínteres a pesar de observarse un mayor downstaging en los pacientes tratados con QT/RT. La SCRT se considera actualmente una alternativa al tratamiento QT-RT NA en el CR LA. El estudio Stockholm III comparó SCRT y cirugía inmediata frente al tratamiento quirúrgico diferido tras la SCRT demostrando un mayor respuesta local al tratamiento en los pacientes intervenidos de forma diferida. Con estos resultados la SCRT seguida de cirugía del tumor primario a las 8 semanas se ha convertido en una alternativa válida en el tratamiento de los pacientes con CR que precisan un downstaging.

#### 1.2.7.2.3 Quimioterapia de consolidación tras tratamiento SCRT neoadyuvante.

En base a los resultados del estudio Stockholm III los estudios POLISH-2 y RAPIDO, analizan el beneficio de administrar SCRT seguido de tratamiento QT 4 meses y posteriormente cirugía frente al tratamiento estándar en pacientes con CRLA, intentando aumentar el porcentaje de pacientes que completan el tratamiento QT de cara principalmente a la reducción de las recidivas a distancia. En el estudio POLISH-2 no se observó un aumento en la tasa de resecciones R0, objetivo principal del estudio, aunque sí un aumento significativo en términos de SG, que pierde la significación en el seguimiento a largo plazo. K. (Bujko y cols., 2016). Este estudio presenta limitaciones importantes como la no obligatoriedad de RNM pélvica de estadiaje o el uso de oxaliplatino concomitante con la RT. El estudio RAPIDO incluyó pacientes con CR de mal pronóstico: cT4a/b, invasión extramural, cN2, invasión de la fascia mesorrectal o aumento de ganglios considerados metastásicos. Los pacientes fueron randomizados a SCRT (5x5 Gy) seguida de 6 ciclos de XELOX o 9 ciclos de FOLFOX4 seguidos de escisión mesorrectales (TME) (brazo experimental) vs quimiorradiación basada en capecitabina seguida de TME y posterior QT adyuvante según política del hospital con 8 ciclos de CAPOX o 12 ciclos de FOLFOX4 (brazo estándar). Se obtuvo una menor tasa de metástasis a distancia y una elevada tasa de RCp lo que puede contribuir a la preservación de

órgano. Este tratamiento puede considerarse un nuevo estándar. (Bahadoer y cols., 2021).

#### 1.2.7.2.4. Quimioterapia de inducción previo al tratamiento QT-RT.

Pequeños estudios F-II han evaluado el papel de la QT previa al tratamiento concomitante QT-RT con intención de mejorar la exposición y tolerancia del tratamiento, aumentar las pRC, controlar posibles micrometástasis y disminuir el tiempo hasta el cierre de las ileostomías temporales. El estudio F-II GCR-3 randomizó a los pacientes a recibir XELOX antes o después de la QT-RT y la cirugía (Fernández-Martos y cols., 2010). No se observaron diferencias en pRC aunque si una menor toxicidad en los pacientes tratados con QT de inicio y una mayor cumplimentación de la QT. El análisis de supervivencia tras un seguimiento de 5 años no objetiva diferencias significativas. PRODIGE 23 es un estudio fase III multicéntrico randomizado que investiga el papel del mFOLFIRINOX NA antes de la QT-RT preoperatoria seguido de cirugía TME y QT adyuvante en CRLA (cT3 or cT4, M0) a <15 cm del borde anal. Se obtiene un beneficio en Supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 3 años del 75% al 85%. Los autores concluyen que se trata de una estrategia segura y aumenta significativamente la tasa de pCR, SLE. Los datos de SG no están maduros. (Conroy y cols., 2020).

#### 1.2.7.2.5 Quimioterapia NA sin QT/RT

Otra estrategia estudiada, por ahora en estudios pequeños y heterogéneos, ha sido la del tratamiento NA exclusivo con QT en pacientes con tumores mas iniciales. (Francesco Sclafani y cols., 2014). Los resultados tanto de resecabilidad como de supervivencia, junto con la posibilidad de evitar la toxicidad propia de la RT, la convierten en una estrategia interesante. Pendiente de resultados de estudios

#### 1.2.7.2.6 Estrategia conservadora: Watch & Wait (W&W)

La estrategia W&W en pacientes con CR que logran una respuesta clínica completa tras la terapia NA ofrece una oportunidad para que los pacientes eviten una cirugía con sus posibles secuelas. Recientemente se han publicado los datos tras un

seguimiento de 3.3 meses de más de 880 pacientes con resultados muy interesantes de recidivas locales, y supervivencia a 5 años. (Van der Valk y cols., 2018). A pesar de ello, en ausencia de ensayos randomizados debe considerarse una técnica en investigación.

#### 1.2.7.2.7 Papel de la QT adyuvante en el CR.

Son escasos los estudios randomizados que exploran como objetivo principal el papel de la QT adyuvante en el CR y sus resultados son difíciles de interpretar dado que se mezclan numerosas variables. En 2007 se publicaron los resultados del estudio EORTC 22921 en el que se observó un beneficio en SLP para los pacientes que recibían QT (HR 0.87; 95% CI 0.72-1.04; P=.13). Sin embargo, en el seguimiento a largo plazo, el tratamiento adyuvante no demostró beneficio en SG y el beneficio en SLP fue menor y no significativo. Este estudio sugiere que solo los pacientes con buena respuesta al tratamiento NA pT0-2 se benefician del tratamiento adyuvante si bien hay que tener en cuenta que solo el 43% de los pacientes recibieron el tratamiento adyuvante completo y que se administró 5-FU en bolus, esquema actualmente considerado subóptimo. Tampoco está claro el esquema más adecuado en adyuvancia en CR. El estudio F-II ADORE analiza la adyuvancia tras QT-RT y cirugía con FOLFOX vs 5FU/LV, observando un beneficio en SLP a 3 años a favor de FOLFOX del 71.6 vs 62.9%, p .047. El estudio AIO-04 también encuentra beneficio en los pacientes tratados con oxaliplatino tanto en neoadyuvancia como en adyuvancia, aunque los resultados son más difíciles de interpretar. Diferentes meta-análisis que analizan el papel de la adyuvancia en el CR alcanzan conclusiones contradictorias. (Breugnot AJ y cols., 2015). A pesar de estos resultados y en gran medida por extrapolación de los estudios de adyuvancia en cáncer de colon, las principales guías europeas y americanas recomiendan el tratamiento adyuvante en pacientes con E-II de riesgo y estadio III.

#### 1.2.7.3 *Tratamiento del CCRm*

Aproximadamente un 20-25% de los pacientes al diagnóstico de CCR se presentan como enfermedad metastásica y hasta un 50% de ellos van a desarrollar metástasis a lo largo de la evolución de la enfermedad. En los últimos años se ha modificado la

historia natural del CCRm con la incorporación de los avances en el tratamiento quimioterápico, fármacos diana específicos, un mayor conocimiento de la biología molecular y de los biomarcadores que permiten una mejor selección del tratamiento individualizado, con medianas de supervivencias que se encontraban en torno a los 12 m en la era del 5FU con tasas de respuestas en torno al 20%, y que en la actualidad se sitúan en torno a los 30 m con tasas de respuestas de los esquemas en combinación que superan el 50%. Por otro lado, hay que destacar los avances que se han producido en el manejo quirúrgico de las metástasis. La cirugía de las metástasis hepáticas y pulmonares consigue hasta un 40-50% de supervivencia a los cinco años según las diferentes series. Respecto a la cirugía de las metástasis hepáticas, se han ido produciendo importantes avances en los últimos años en las técnicas quirúrgicas, como la incorporación de la laparoscopia, hepatectomías en dos tiempos (descrita por Adam *et al.* en el año 2000) y *associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy* (ALPPS), técnica anglosajona descrita en 2012, que pueden aumentar la posibilidad de reseccabilidad de los pacientes que hace unos años eran considerados irresecables; no obstante, estas indicaciones deben ser valoradas por un equipo multidisciplinar y llevadas a cabo en centros con experiencia. En la actualidad, los criterios de reseccabilidad se han ampliado y agrupan a un gran número de pacientes y situaciones: posibilidad de resección R0, dejar al menos 20-25% de volumen hepático y con drenaje biliar adecuado. En julio de 2019 se publicó el consenso nacional para el manejo multidisciplinar de las metástasis hepáticas, con la participación de las diferentes sociedades científicas implicadas, donde se especifican las diferentes recomendaciones en función del escenario donde nos encontremos. (Vera y cols., 2019). Al mismo tiempo que ha ido evolucionando la resección de metástasis hepáticas, también se han realizado importantes avances en el manejo de las metástasis pulmonares, tanto en el tipo de intervención (metastasectomías, resecciones atípicas, lobectomías, etc.) como en las técnicas (toracotomía, videotoracoscopia). El desarrollo de la cirugía citorreductora más quimioterapia intraperitoneal hipertérmica (HIPEC) continúa en estudio; en casos seleccionados de carcinomatosis peritoneal puede ser una alternativa que consiga aumentar la supervivencia de este grupo de pacientes de mal pronóstico, con medianas de supervivencia entre 15 y 23 meses. Por último, el desarrollo de las técnicas ablativas en el manejo de pacientes con CCRm no

candidatos a cirugía ofrece opciones de tratamientos alternativos para el control de las metástasis; entre estas opciones se encuentran la radioterapia estereotáctica fraccionada corporal (SBRT), la radiofrecuencia, las microondas, la electroporación irreversible, la crioterapia, la quimioembolización o la radioembolización.

### 1.2.7.3.1 Objetivos del tratamiento

Los factores que se deben tener en cuenta en la elección del tratamiento en la enfermedad metastásica se recogen en **tabla 7**

Características del paciente	Características de la enfermedad
<b>Edad (valoración geriátrica)</b>	Lateralidad del tumor primario (derecho/izquierdo)
<b>Comorbilidad</b>	Carga tumoral (oligo/polimetastásica)
<b>Estado general (<i>fit/unfit</i>)</b>	
<b>Función hepática, renal y medular</b>	
<b>Deseos y expectativas</b>	Resecabilidad potencial
<b>Situación sociosanitaria</b>	Presencia de síntomas y gravedad
	Perfil molecular: RAS, BRAF , MSI

**Tabla 7:** Objetivos del tratamiento en CCRm

El manejo de estos pacientes debe realizarse con un enfoque multidisciplinar para poder ofrecer la mejor estrategia y secuencia de tratamiento

En función de las características del tumor , de la intencionalidad del tratamiento y del paciente *fit o unfit*, la *European Society for Medical Oncology* (ESMO) ha definido diferentes grupos (Van Cutsem y cols., 2016) (figura 10)

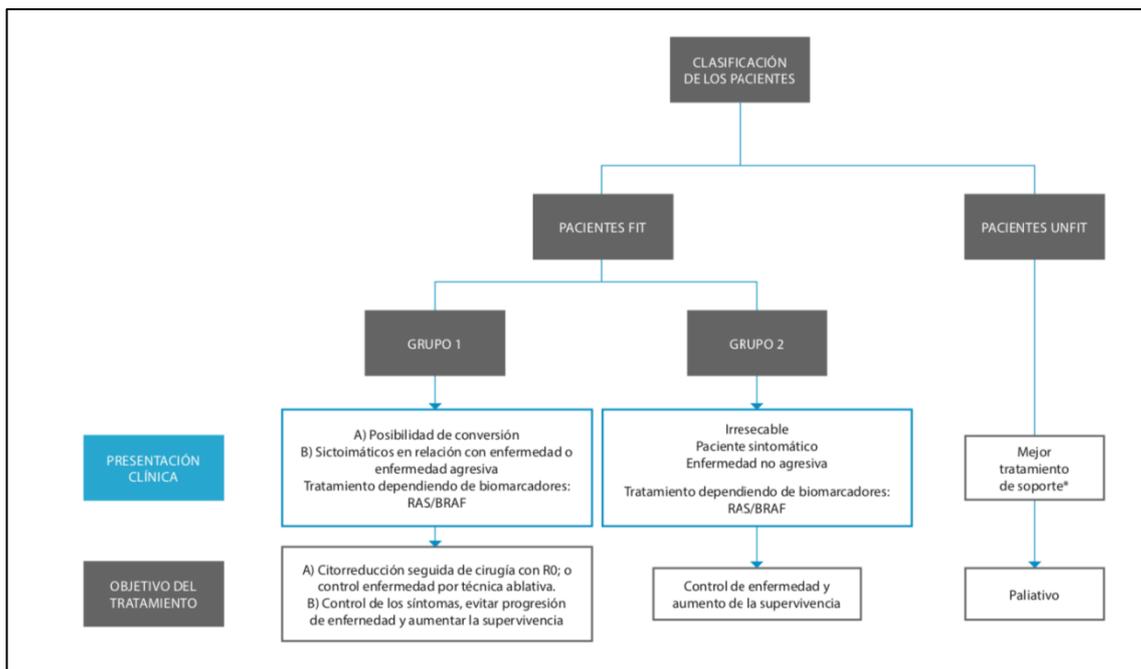
-En el caso de pacientes con enfermedad metastásica resecable, el tratamiento estándar sigue siendo la cirugía, cirugía R0 (sin enfermedad residual), aunque el porcentaje de pacientes en este grupo es escaso, 10-20%, se debe considerar en determinados grupos de pacientes la valoración de tratamiento perioperatorio.

-En los casos de enfermedad no resecable de entrada, pero potencialmente resecable, está indicado tratamiento de conversión, que permite obtener una respuesta que conduzca a la resecabilidad de la enfermedad, y posterior tratamiento

complementario, o bien el control de los síntomas y obtener máxima respuesta en aquellos pacientes sintomáticos o con tumores agresivos

-En los casos de enfermedad irreseccable, el objetivo del tratamiento sería el control de la enfermedad, aumento en el intervalo libre de progresión y de la supervivencia.

-En los pacientes *unfit*, las opciones van desde el tratamiento sintomático a la monoterapia, esquemas de combinación con reducción de dosis o técnicas ablativas



**Figura 10:** GRUPOS ESMO REVISADOS PARA PACIENTES CON CCRm Adaptado de Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, *et al.* ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology.* 2016;27(8):1386-422.

### 1.2.7.3.2 Esquemas de tratamiento en enfermedad metastásica

La estrategia recomendada para la primera línea de tratamiento en CCRm incluye la asociación de doblete de QT (fluoropirimidina con oxaliplatino o irinotecán) en asociación con anticuerpo monoclonal (antiangiogénico o anti-EGFR). Bevacizumab es el único antiangiogénico con indicación de primera línea (independientemente del estado de RAS) y hasta la fecha no se conocen biomarcadores predictores de respuesta a antiangiogénicos. Cetuximab y panitumumab son anti-EGFR aprobados en primera línea, solo para los pacientes RAS *wt* (KRAS y NRAS). El triplete (FOLFOXIRI), con

o sin la asociación con bevacizumab, es otra de las posibles opciones para determinados grupos de pacientes. El triplete en asociación con anti-EGFR sigue estando aún en investigación aunque ya existen estudios que exploran esta combinación. En relación a si utilizar oxaliplatino o irinotecán en primera línea, similares resultados se obtienen en el estudio de Tournigand con FOLFOX o FOLFIRI y cambio de esquema a la progresión, por lo que ambas opciones pueden ser utilizadas en primera línea. (Tournigand y cols., 2004). En cuanto a qué fluoropirimidina utilizar, 5-FU o capecitabina, se han publicado datos de no inferioridad con respecto a la combinación con oxaliplatino. Al contrario que con irinotecán, donde la combinación con capecitabina ha presentado una mayor tasa de toxicidad, por lo que habría que reducir dosis en caso de su combinación. Mayor toxicidad también evidencian las combinaciones de capecitabina y anti-EGFR, incluso en este caso presenta efecto deletéreo con menor supervivencia, por lo que no se recomiendan. La elección de la segunda línea y sucesivas de tratamiento se realiza en base al estado general del paciente, el tratamiento administrado en primera línea, así como la toxicidad evidenciada en esa primera línea y en la determinación de biomarcadores. El objetivo a alcanzar en el paciente con CCRm es poder recibir todas las terapias apropiadas a lo largo de su evolución.

#### **a. Combinación de dobletes de quimioterapia y antiangiogénicos**

El primer estudio que demostró beneficio de la asociación de QT y bevacizumab fue el de Hurwitz y cols. en asociación con IFL (esquema hoy en día no utilizado por su toxicidad) en 2004, donde la combinación fue superior a IFL en SG (objetivo principal), siendo de 20,3 vs. 15,6 m (HR: 0,66;  $p < 0,001$ ), SLP: 10,6 vs. 6,2 m ( $p < 0,001$ ), así como Respuestas objetivas (RO) del 44,8 vs. 34,8% ( $p = 0,04$ ). (Hurwitz y cols., 2006)

El estudio fase III BICC-C demostró que FOLFIRI más bevacizumab fue superior a IFL-bevacizumab, con medianas de SLP de 11,2 vs. 8,3 m y de SG de 28 vs. 19,2 m, respectivamente ( $p = 0,037$ ) (Fuchs CS y cols., 2008).

Posteriormente, se estudió la asociación de bevacizumab con oxaliplatino en un ensayo fase III que comparaba FOLFOX o XELOX  $\pm$  bevacizumab. El objetivo principal del estudio fue la SLP, siendo superior para la adición de bevacizumab, 9,4

vs. 8 m (HR: 0,83; IC del 97,5%: 0,72-0,95;  $p = 0,0023$ ), con tendencia a aumentar la SG, pero no significativa, 21,3 vs. 19,9 m ( $p = 0,077$ ). Las tasas de respuestas fueron similares en ambos brazos; en el análisis por subgrupos el beneficio fue mayor en aquellos en que se mantuvo bevacizumab hasta la progresión. La toxicidad grado 3/4 fue superior en el brazo de bevacizumab, 21 vs. 15%, y relacionada con bevacizumab, 5 vs. 2%. (Saltz LB y cols., 2008).

Los efectos adversos más frecuentemente relacionados con bevacizumab son la hipertensión arterial (HTA), generalmente controlada, eventos trombóticos arteriales con incidencia en torno al 2% y perforaciones intestinales con incidencia en torno al 2%. En relación a la reseccabilidad, se aconseja un margen de seguridad de unas seis semanas de suspensión previas a la intervención quirúrgica.

#### **b. Combinación de dobletes con antiEGFR**

La combinación de quimioterapia y anti-EGFR ha sido explorada en cuatro ensayos clínicos fase III (CRYSTAL, PRIME, NORDIC VII, COIN) y uno fase II aleatorizado (OPUS). El estudio pivotal CRYSTAL (FOLFIRI  $\pm$  cetuximab) confirmó el objetivo primario (SLP), así como mayor tasa de respuestas a favor de FOLFIRI más cetuximab, aunque con aumento en la toxicidad (cutánea, diarrea, reacciones infusionales) y al incluir el análisis de mutación de RAS se mantiene el beneficio en SLP, 11,4 vs. 8,4 m (HR: 0,56; 0,41-0,76;  $p < 0,001$ ), tasa de RO: 66 vs. 38% ( $p < 0,001$ ) y SG: 28,4 vs. 20,2 m (HR: 0,69; 0,54-0,88;  $p = 0,0024$ ) (Van Cutsem y cols., 2015).

En el estudio PRIME con FOLFOX  $\pm$  panitumumab, de nuevo se confirma el beneficio de SLP (10,8 vs. 9,2 m;  $p = 0,002$ ), SG (28,3 vs. 20,9 m;  $p = 0,02$ ) y tasa de respuestas en la población RAS/BRAF *wt*, con la adición de panitumumab a la QT. Se confirma el peor pronóstico (aunque el número de pacientes es escaso) de la presencia de mutación de BRAF (10,5 y 9,2 m). (Douillard JY y cols., 2013). Las toxicidades más frecuentes de panitumumab suelen ser la cutánea, diarrea y menor frecuencia de reacciones infusionales que con cetuximab.

Otra de las toxicidades a tener en cuenta con los anti-EGFR es la hipomagnesemia, que puede estar presente entre el 20-40% de los casos; se requiere monitorización de los niveles durante el tratamiento y en caso necesario aporte de suplementos.

### c. AntiEGFR vs antiangiogénicos

La ausencia de beneficio de la combinación de anti-VEGF y anti-EGFR fue demostrada en dos ensayos clínicos de fase III (PACCE y CAI-RO-2), por lo que su combinación no se recomienda.

Una de las cuestiones en la práctica clínica diaria es qué anticuerpo utilizar en la primera línea de la enfermedad metastásica y RAS *wt*. Intentando responder a esta cuestión, se diseñaron dos ensayos clínicos fase III (FIRE-3, CALGB/SWOG 80405) y uno fase II (PEAK). Dos de los tres estudios no consiguieron demostrar su objetivo principal. En la actualidad, no solo son el estatus de RAS y BRAF los únicos factores a tener en cuenta a la hora de elegir el esquema en primera línea, sino también la localización del tumor primario.

El estudio aleatorizado PEAK comparaba panitumumab frente a bevacizumab más mFOLFOX-6, el objetivo primario fue la SLP; en el subgrupo RAS *wt*, SLP fue superior en el brazo de panitumumab (HR: 0,65; IC del 95%: 0,44-0,96;  $p = 0,029$ ), con tendencia no significativa en SG 41,3 *vs.* 28,9 m. (Schwartzberg y cols., LS 2014). FIRE-3 valoró FOLFIRI más bevacizumab o cetuximab, y el objetivo principal fue la tasa de RO, no encontrando diferencias y sí un aumento en SG a favor de cetuximab, 33,1 *vs.* 25,6 m ( $p = 0,011$ ). (Stintzing y cols., 2016). En un análisis posterior con revisión centralizada de las respuestas se encontraron diferencias significativas en el brazo de cetuximab, 72 *vs.* 56,1% ( $p = 0,0029$ )

En el estudio CALGB/SWOG 80405, los pacientes se aleatorizaron a QT con FOLFOX o FOLFIRI (elección a criterio del investigador, el cual pudo ser factor de confusión en los resultados) más bevacizumab o cetuximab y no obtuvo diferencias en SG, siendo de 29 y 30 m, respectivamente ( $p = 0,08$ ), ni en SLP 10,5 *vs.* 10,6 m, tampoco cuando se realizó RAS extendido, con tasas de respuestas de 54% *vs.* 67% ( $p < 0,01$ ) a favor de cetuximab (Venook A y cols., 2017).

Diferentes comentarios se han extraído de estos ensayos, que pueden ser generadores de hipótesis para futuros estudios, como son que quizás para anti-EGFR el objetivo primario serían mejor las respuestas, mientras que para anti-angiogénicos sería el SLP; por otro lado, parece que la secuencia óptima sería iniciar con anti-EGFR seguido de anti-VEGF.

#### d. Tripletes y sus combinaciones

El grupo italiano GONO comparó triplete FOLFOXIRI frente a FOLFIRI; se aleatorizaron 244 pacientes, el objetivo primario fue la tasa de respuesta siendo superiores para el triplete con diferencias significativas 66 *vs.* 41% ( $p = 0,0002$ ). También de forma significativa se aumentó las reseccabilidad, SLP y SG, que fue de 22,6 *vs.* 16,7 m ( $p = 0,032$ ). La tasa de neutropenia grados 3-4 también fue superior, 50 *vs.* 28%, aunque sin diferencias en las febriles (Falcone A y cols., 2007).

El estudio TRIBE, del grupo italiano, evaluó el triplete FOLFOXIRI + bevacizumab frente a FOLFIRI + bevacizumab en primera línea, 12 ciclos y mantenimiento con 5-FU-bevacizumab, con un aumento en la mediana de SLP y SG, que en la actualización de 2015 fueron de 12,3 *vs.* 9,7 m (HR: 0,77; IC del 95%: 0,65-0,93;  $p = 0,006$ ) y de 29,8 *vs.* 25,8 m (HR: 0,80; IC del 95%: 0,65-0,98;  $p = 0,03$ ), respectivamente, una mayor toxicidad en el grupo del triplete (diarrea, mucositis, neutropenia y neurotoxicidad); en esta actualización también se reportaron datos de supervivencia en función del estatus de RAS y BRAF, que fueron de 37,1 m para RAS y BRAF *wt*, 25,6 m para RAS mutado y 13,4 m para BRAF mutado; las diferencias no fueron significativas en función de los subgrupos moleculares (Cremolini C y cols., 2015).

Recientemente el grupo GONO presenta el metaanálisis de los ensayos randomizados que comparan FOLFOXIRI/Beva vs doblete/Beva (CHARTA (NCT01321957), OLIVIA (NCT00778102), STEAM (NCT01765582), TRIBE (NCT00719797) y TRIBE2 (NCT02339116). El objetivo primario es la SG. El metaanálisis confirma el beneficio en la SG para el triplete vs el doblete. La SG a 5 años fue de 22.3% para triplete vs 10.7% para el doblete ( $p,0.001$ ). También hubo beneficio en SLP y tasa de respuestas, aunque con mayor toxicidad. Sin embargo, el único subgrupo que no se benefició del triplete en supervivencia fueron los pacientes con BRAF mutado. El metaanálisis confirma el beneficio en supervivencia para el triplete/bevacizumab, pero no el beneficio para los pacientes con tumores BRAF mutados. (Cremolini y cols., 2020).

El estudio de fase II (MACBETH) del grupo italiano, en primera línea y RAS/BRAF *wt*, evalúa la combinación de FOLFOXIRI más cetuximab durante 4m y posterior mantenimiento con bevacizumab o cetuximab; el objetivo primario fue la SLP a los

10 m (de un 20% sobre el 50% de FOLFIRI), siendo la SLP a los 10m del 5,8% para el brazo de cetuximab y 40,4% para el de bevacizumab, no consiguiéndose el objetivo en ninguno de los dos brazos; apuntan los autores que quizá pueda deberse al esquema de mantenimiento que puede ser subóptimo. La tasa de respuesta fue de 71,6%, con la tasa de resección del 38%, con un perfil de toxicidad aceptable y con una mediana de SG de 33,2 y 32,2 m. Aunque la tasa de respuesta es elevada, no se consigue el objetivo primario del estudio (Cremolini C y cols., 2018).

Datos preliminares del estudio alemán fase II VOLFI, aleatorizado 2:1 en pacientes con CCRm RAS *wt* en primera línea con FOLFOXIRI modificado  $\pm$  panitumumab, cuyo objetivo primario fue la tasa de RO, resultó superior en el brazo del triplete más panitumumab (85,7 *vs.* 54,5%;  $p = 0,0013$ ) con mayor toxicidad grados 3-5 (32,8 *vs.* 12,1%;  $p = 0,0297$ ). (Geisser M y cols., 2018). En marcha se encuentra un ensayo fase III que compara FOLFOX + panitumumab *vs.* FOLFOXIRI + panitumumab 12 ciclos, seguido de mantenimiento con 5-FU/ LV panitumumab en primera línea en pacientes RAS/BRAF *wt*.

En la actualidad, el triplete se recomienda para aquellos pacientes que presentan buen estado general, a valorar en aquellos pacientes que pretendamos una respuesta rápida y en un tratamiento de conversión.

#### **e. Papel de la lateralidad en la elección del tratamiento**

Recientemente se ha introducido la lateralidad del tumor primario a la hora de elegir la estrategia de tratamiento a seguir. Como hemos dicho anteriormente sabemos que los tumores de colon derecho e izquierdo presentan características clínicas y moleculares diferentes que establecen pronósticos diversos y con posible valoración de estrategias de tratamiento distintas.

Diferentes estudios han analizado la lateralidad y su papel pronóstico y predictivo de respuesta; no obstante, son análisis retrospectivos no preplanificados. Arnold y cols. evalúan de forma conjunta seis ensayos recientes (CRISTAL, FIRE-3, CALGB 80405, PRIME, PEAK, 20050181), cinco de ellos fase III y uno fase II, con un total de 5.670 pacientes, 2.159 (37,6%) de ellos con RAS *wt* y donde se conocía la localización del primario; de ellos, 1.644 localizados en colon izquierdo. La SG y SLP fueron superiores de forma significativa para la QT más anti-EGFR en los tumores localizados en colon izquierdo (HR: 0,75; 0,67- 0,84, y HR: 0,78; 0,70-0,87,

respectivamente), y no para los localizados en colon derecho (HR: 1,12; 0,87-1,45, y HR: 1,12; 0,87-1,44, respectivamente), con  $p < 0,001$  y  $0,002$  para la interacción. Una tendencia a mayor tasa de respuestas en los de localización izquierda, pero sin significación estadística. Los autores concluyen que estos datos refuerzan la utilización de anti-EGFR en el lado izquierdo en RAS *wt*; en lado derecho RAS *wt* se podría recomendar quimioterapia con/sin antiangiogénico, aunque en aquellos donde el objetivo sea la respuesta se podría utilizar anti-EGFR; no hay datos para no utilizar anti-EGFR independientemente de la localización para pacientes en progresión o con contraindicación a anti-VEGF (Arnold D y cols., 2017).

El análisis conjunto de dos ensayos del grupo TTD (PLANET y MACRO 2) con anti-EGFR más quimioterapia de nuevo muestran un aumento en la SLP y SG, así como de las respuestas objetivas de forma significativa en los tumores localizados en colon izquierdo frente a los de localización derecha.

Con respecto al triplete, también se ha realizado un análisis no planificado del estudio TRIBE y lateralidad; nuevamente se observa un peor pronóstico de los tumores localizados en colon derecho, con una SG menor 23,7 frente a 31 m (HR: 1,42; IC del 95%: 1,09-1,84;  $p = 0,010$ ) y menor SLP, 10,2 frente a 11,5 me (HR: 1,24; IC del 95%: 0,98-1,56;  $p = 0,083$ ), que los de lado izquierdo. Por otro lado, los pacientes con tumores del lado derecho lograron un mayor beneficio relativo del triplete más bevacizumab en términos de SLP (HR: 0,59 *versus* 0,89;  $p = 0,099$ ) y SG (HR: 0,56 *versus* 0,99;  $p = 0,030$ ), independientemente del estado de RAS y BRAF (Cremolini C y cols., 2018).

En base a los datos, aunque retrospectivos, se recomienda la utilización de anti-EGFR en los tumores RAS *wt* localizados en colon izquierdo; con respecto al lado derecho, parece que el antiangiogénico sería más adecuado, no obstante, queda por aclarar si utilizar el anti-EGFR cuando el objetivo que se persigue sea la tasa de respuesta.

#### 1.2.7.3.3 Nuevos fármacos

Dentro de las líneas de desarrollo de fármacos anti-VEGF, una nueva molécula, fruqintinib (inhibidor oral anti-VEGF), se ha estudiado frente a placebo en pacientes con CCRm politratados (dos o más líneas de tratamiento previo) en un ensayo fase

III en población china, con aumento en la SG, 9,3 vs. 6,6 meses ( $p < 0,001$ ), y aumento de SLP, siendo de 3,7 vs. 1,8 meses con placebo ( $p < 0,001$ ) (Li J y cols., 2018)

Para aquellos pacientes con CCRm RAS *wt* con resistencias secundarias a anti-EGFR (debidas fundamentalmente a mutaciones del dominio extracelular de EGFR), se ha analizado la actividad de Sym004 (combinación de dos anticuerpos frente al EGFR, futuximab y modotuximab) en un estudio fase II aleatorizado en pacientes KRAS exón 2 *wt* refractarios a anti-EGFR con dos brazos con Sym004 y un tercero con tratamiento a decisión del investigador; el objetivo primario fue la SG, no encontrando diferencias (7,9 vs. 10,3 vs. 9,6 m, respectivamente). El estudio llevaba un análisis preplanificado de biomarcadores en ctADN, y se observó un beneficio en SG de los pacientes refractarios y tratados con Sym004 y que presentaban RAS/BRAF/EGFRwt. (Montagut C y cols., 2018).

Otra línea de investigación ha sido en el grupo de pacientes KRAS *wt* que han progresado a los tratamientos estándar y que presentan amplificación de HER2. Las respuestas objetivas del doble bloqueo de HER2 (trastuzumab más lapatinib) en el estudio fase II HERACLES (KRAS *wt* y HER2 positivos, que han progresado a tratamiento estándar incluido anti-EGFR) son del 30%, con tasa de control de enfermedad del 75% y con una mediana de SLP de 21 semanas y buen perfil de toxicidad; no hubo toxicidad grado 4, 22% de toxicidad grado 3, siendo las más frecuentes astenia, *rash* cutáneo y aumento de bilirrubina. (Sartore-Bianchi y cols., 2016). La combinación de pertuzumab más trastuzumab en el estudio fase II en tumores sólidos *Basket MyPathway* ha dado un 38% de respuestas en pacientes con CCRm HER2 positivos (Hainsworth JD y cols., 2018). T-DXd es un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por anticuerpo anti-HER2, un conector basado en un tetrapéptido escindible y un inhibidor de topoisomerasa I. Los estudios preliminares han demostrado actividad en tumores que expresan HER-2. DESTINY-CRC01 (DS8201-A-J203; NCT03384940) es un estudio fase 2 abierto, multicéntrico en CCRm que expresan HER-2 tratados con T-DXd. Se incluyen pacientes con CCRm con confirmación central de HER2 y, RAS WT que habían progresado a  $\geq 2$  regímenes previos. La tasa de respuestas confirmada fue 45.3%, la mediana de SLP fue 6.9 m y la mediana de SG no se alcanzó. La conclusión de los autores es que T-

DXd a dosis de 6.4 mg/kg cada 3 semanas demostró una actividad marcada en pacientes con CCRm refractario que expresan HER2-con un perfil de seguridad consistente con los resultados previos. (Siena y cols., 2020).

Entre los inhibidores de BRAF en CCRm BRAF mutados, se han estudiado vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, con tasas de respuestas muy escasas en monoterapia, posiblemente debido al mecanismo de escape por la sobreexpresión de EGFR. Mayores tasas de respuestas se han conseguido con la asociación de inhibidor de BRAF y anti-EGFR; con la combinación de dabrafenib más panitumumab sube la tasa de respuestas a un 10%, aunque siguen siendo escasas. Al asociarlos a irinotecán, la tasa de respuestas aumenta, como se observa en el ensayo SWOG 1406 con tasa de control de enfermedad del 67 frente al 22%. (Kopetz S y cols., 2021). Otra combinación en estudio en pacientes BRAF mutado es un inhibidor de BRAF (encorafenib), inhibidor de EGFR (cetuximab) con/sin inhibidor de PI3K (alpelisib), con tasa de respuestas objetivas del 19 vs.18% y SLP de 3,7 vs.4,2 m con la triple terapia en estudio de fase Ib . (Van Geel y cols., 2017).

Por otro lado, podemos actuar mediante el bloqueo de MEK. De nuevo nos encontramos con actividad escasa; esta aumenta cuando lo asociamos a inhibidores de BRAF, con la combinación de dabrafenib (inhibidor de BRAF) más trametinib (inhibidor MEK) la tasa de respuesta es de un 12%, media de SLP de 3,5 me, que son superiores con la triple terapia dabrafenib más trametinib más panitumumab, con un 26% de respuestas y SLP de 4,1 m. (Corconan RB y cols., 2018).

Uno de los hitos en pacientes BRAF mutados son los resultados del estudio BEACON es un estudio randomizado fase III que evalúa el triplete de encorafenib (ENCO) + binimetinib (BINI) + cetuximab (CETUX) y el doblete de ENCO + CETUX vs. Irinotecán + CETUX o FOLFIRI + CETUX (a elección del investigador) en pacientes con CCRm BRAFV600E que habían progresado después de 1-2 regímenes previos. El objetivo primario fue la SG y la tasa de RO para triplete vs control. Los resultados indican una mediana de SG de 9.3 m para triplete y 5.9 m para control. La mediana de SG para el doblete fue de 9.3 m (HR vs. control: 0.61). La tasa de RG confirmadas fue 26.8% para triplete, 19.5% para doblete, y 1.8% para

control. Tanto el triplete como el doblete mejoraron la SG en comparación con el control en todos los subgrupos. La conclusión es que el análisis final del BEACON confirma que encorafenib + cetuximab con o sin binimetinib mejora la SG y la RO en pacientes previamente tratados con BRAF V600E. La opción preferida es el doblete ya que los datos son superponibles a los del triplete con mejor perfil de seguridad. Este esquema ha sido aprobado por le FDA y la EMA recientemente. (Tabernero y cols., 2021).

Los genes de fusión NTRK 1/2/3, ROS1, ALK, RET en CCR tienen una prevalencia por debajo del 1%. Reordenamiento de TRK se suele asociar con mayor frecuencia a CCR inestables que a estables, y con la presencia de una mayor carga mutacional. Estudios con entrectinib (inhibidor TRK, ROS1 y ALK) de fase I han demostrado respuestas tempranas y duraderas en diferentes tumores sólidos, incluidos CCR. Lanotretinib es un inhibidor TRK estudiado en un ensayo Basket de fases I-II, donde se incluyeron cuatro pacientes con CCR y la tasa de respuestas objetivas ha sido del 75%, con medianas de tiempo a la respuesta de 1,8 m y con una mediana de seguimiento de 9,9 m ,no se ha alcanzado la mediana de SLP; (Drilon A y cols., 2018).

Mutaciones de PI3K se encuentran presentes aproximadamente en un 12% de los CCR. Taselisib (inhibidor de PI3K) se ha evaluado en pacientes con tumores sólidos politratados y con presencia de mutaciones de PI3KCA; no se observaron respuestas objetivas (objetivo principal del estudio) y un 27% de los pacientes objetivaron SLP  $\geq 6$  meses.

#### 1.2.7.3.4      Inmunoterapia

La inmunoterapia ha presentado un gran desarrollo en los últimos años, con importantes avances en diferentes tumores sólidos con beneficios en la supervivencia de los pacientes, como en melanoma y cáncer de pulmón, entre otros. En CCRm, la inmunoterapia ha tenido un mayor desarrollo en la población de pacientes, con

presencia de alta inestabilidad de microsatelites (MSI-H) que se encuentra en un 4% de los casos.

Pembrolizumab (anti-PD-1), en el estudio fase II KEYNOTE-016, una reciente actualización , con mayor número de pacientes con CCRm politratado (n = 40), la tasa de respuesta objetiva fue del 52% para pacientes MSI-H y con una mediana de seguimiento de 12,5 m, la SLP estimada es del 53% . (Le DT y cols., 2017). En el estudio KEYNOTE 164, 63 pacientes con CCRm y MSI-H previamente tratados con  $\geq 1$  línea fueron tratados con pembrolizumab; con una mediana de seguimiento de 12,6 m, la tasa de RO es del 32% y una tasa de control de enfermedad del 57%, el 75% con duración de respuesta  $\geq 6$  m; la mediana de SLP es de 4,1m y una SG a los 12m del 72% (Le DT y cols., 2020) ; se demuestra que a diferencia de otros tumores, la expresión de PDL-1 no es factor predictivo de respuesta a pembrolizumab en CCR.

Nivolumab (anti-PD-1) ha sido estudiado en el ensayo CheckMate-142 (fase II) para pacientes previamente tratados y con MSI-H, asociado o no a ipilimumab (anti-CTLA-4) a dos dosis diferentes. En el grupo de nivolumab en monoterapia (n = 74) la tasa de RO, con una media de 21 m de seguimiento, fue del 34% y una supervivencia a los 12 m del 72%; la toxicidad más frecuente fue astenia, diarrea, prurito, *rash* e incremento de lipasa; con una toxicidad grado 3-4 fue del 20%. En el grupo de tratamiento combinado, la tasa de RO es del 55%, con una mediana de 13,4 m de seguimiento, el 51,7% evidenciaban respuesta mantenida. La tasa de SG a los 12m fue del 85% y SLP del 71%. Las toxicidades más frecuentes fueron diarreas, astenia, pirexia, hipo o hipertiroidismo, aumento GOT/GOT, *rash* y náuseas. (Overman MJ y cols., 2017; Overman MJy cols.,2018)

La combinación de atezolizumab (anti-PD-L1) con bevacizumab en CCRm con MSI-H se ha llevado a cabo en un ensayo fase Ib, con un 30% de RO y un 90% de tasa de control de enfermedad; la mediana de duración de respuesta es de 7,8 m y no se ha alcanzado la mediana de SLP ni de SG con mediana de seguimiento de 11,1 m (Huchster HS y cols., 2017).

Recientemente se ha presentado los resultados de Inmunoterapia en primera línea de CCRm: Se presenta el KEYNOTE-177 (NCT02563002) que es un estudio

randomizado fase III, abierto que evalúa la eficacia y seguridad de pembrolizumab versus QT estándar  $\pm$  bevacizumab o cetuximab en primera línea de CCRm con (MSI-H/dMMR). Los resultados demuestran que Pembrolizumab fue superior a QT en SLP (mediana 16.5 m vs 8.2 m. La tasa de RO confirmada fue 43.8% vs 33.1. Los autores concluyen que pembrolizumab obtiene un beneficio clínico y una mejoría en SLP estadísticamente significativa vs QT en 1a línea de CCRm con MSI-H/dMMR con pocos efectos adversos relacionados con el tratamiento por lo que debe ser el nuevo estándar para estos pacientes. (André y cols., 2021)

Se ha estudiado la inmunomodulación a pacientes con CCR e inmonofenotipo estable (MSS). En estudios preclínicos, la combinación de atezolizumab y cobimetinib (inhibidor de MEK) parece presentar un efecto sinérgico que genera respuesta inmune de linfocitos T. Un ensayo de fase Ib con la combinación de ambos en pacientes con CCR y MSS obtiene tasas de respuestas de 8% y mediana de SG de diez m, superiores a las de ambos fármacos por separado. (Bendell J y cols., 2018). En el estudio fase III IMblaze370 (COTEZO) se compara la combinación de atezolizumab más cobimetinib frente a atezolizumab frente a regorafenib en una aleatorización 2:1:1 en pacientes con CCR previamente tratados. El 91,7% MSS, el objetivo principal fue la SG; se han presentado recientemente los resultados, siendo negativos, con mediana de SG de 8,9m para brazo de atezolizumab en monoterapia y 8,5 m para regorafenib. (Bendell J y cols., 2018).

Durvalumab y tremelimumab en combinación con FOLFOX se ha ensayado en pacientes Ras mutados MSS previamente no tratados. El estudio incluye 57 pacientes, que reciben FOLFOX más durvalumab (150mg/cada 2 semanas) y tremelimumab (75mg/cada 4 semanas). La SLP a 6 m (objetivo primario) fue observado en 10/16 pacientes (62,5%). (Ghiringhelli y cols., 2020).

Resultados prometedores se han observado con anticuerpos biespecíficos (CEA-TCB) que se unen tanto a células tumorales que expresan CEA como a linfocitos T

(CD3), en estudios fase I ha demostrado actividad en monoterapia, así como en combinación con atezolizumab en pacientes con MSS (Taberero J y cols., 2017).

En marcha estudios fases I/II con BBI608 (regula negativamente la señalización WNT/ $\beta$  catenina, bloqueando STAT3 fosforilada), en combinación con pembrolizumab en CCRm con MSI-H o MSS (SCOOP study). Otros estudios testan combinaciones de vacunas con anti CTLA4 y anti-PD-L1.

Interés en los últimos años está mostrando el estudio del microbioma y cómo la modulación del microbioma puede afectar a las respuestas a tratamiento sistémico. Se dispone de estudios que avalan cómo la terapia probiótica puede alterar la inmunidad, por lo que se están desarrollando nuevas vías de investigación en este campo.

### 1.3 METABOLÓMICA

#### **1.3.1. DEFINICIÓN**

El término metabolómica (Fiehn y cols., 2001), como rama de las ciencias *-ómicas*, hace referencia al estudio, identificación y cuantificación del conjunto de metabolitos presentes en células, tejidos o fluidos biológicos, productos de las reacciones metabólicas en los seres vivos, cuya cuantificación proporciona un amplio panorama del estatus bioquímico. La ausencia o presencia de alguno de estos metabolitos, así como la concentración relativa entre ellos, puede ser un indicador de estados de enfermedad o de factores de predisposición a ella.

Los metabolitos, por tanto, son moléculas de bajo y medio peso molecular (<1500 Dalton) que intervienen en los procesos celulares y nos revelan cómo está funcionando el metabolismo en un organismo determinado en un ser vivo. Nos referimos a los lípidos, azúcares, aminoácidos, hormonas, metabolitos secundarios, etc, siendo, por tanto, el término “metaboloma”, el utilizado para referirse al conjunto completo de moléculas que se puede encontrar en un sistema biológico.

La metabolómica se ha convertido en los últimos años en una de las ramas más importante de la bioquímica y de la biología molecular, ya que, mientras la genómica y la proteómica nos indican “lo que podría haber pasado”, la metabolómica nos indica “lo que realmente ha pasado y está pasando”. (Wishart y cols.; 2007). La razón es que no tiene necesariamente que existir una relación cuantitativa directa entre la concentración de RNA mensajero y la función enzimática. Esto hace que el impacto que puedan tener estas dos variables sobre la concentración de metabolitos sea inexacto. Sin embargo, en el caso contrario, al ser final de las vías de señalización, la metabolómica puede probar más que los clásicos desórdenes metabólicos, y aparece como el mejor indicador de la monitorización de cambios en el genoma y de la disregularización de genes transcriptores específicos, siendo por tanto, la ciencia que mejor puede caracterizar los fenotipos de los seres vivos.

Los avances en el campo de la metabolómica están siendo utilizados actualmente en una gran variedad de aplicaciones clínicas y farmacológicas dentro de la medicina. Así, se han venido aplicando con éxito en las distintas etapas del desarrollo de nuevos fármacos, ya sea en la detección y selección de nuevas sustancias activas; en la medida de los cambios metabólicos generados por ellas; en la toxicidad del principio activo o en la comprobación de los efectos sobre la salud del medicamento en poblaciones. También tiene un enorme potencial en la monitorización de intervenciones nutricionales, a partir de la medida del cambio provocado por un determinado alimento sobre determinados grupos de metabolitos, especialmente los triglicéridos y el colesterol.

La metabolómica se ha revelado, también, muy eficaz en la monitorización de los trasplantes de órganos sólidos, ya que, a partir de una muestra de orina o suero, permiten analizar la evolución de un conjunto de metabolitos que indican en estadios incipientes, si se producirá o no el rechazo del órgano implantado.

Otro ámbito de aplicación es en la medicina personalizada. Actualmente, cuando se elige un tratamiento para una persona enferma, se conoce muy poco sobre su fenotipo y sobre las probables reacciones frente al tratamiento elegido. El conocimiento de las variables metabolómicas debería servir para predecir la reacción de un ser vivo a la

administración de medicamentos, de tal manera que el tratamiento podría particularizarse para cada individuo.

Una de las contribuciones más importantes de la metabolómica estaría dirigida a la detección de factores de riesgo poblacionales. A partir de un análisis de orina o suero, se pretendería conocer para un determinado individuo, qué factores de riesgo presenta, y a qué tipo de enfermedades está predispuesto.

Y, finalmente, otro ámbito de aplicación emergente es en lo referente al diagnóstico y tratamiento de enfermedades metabólicas, neurológicas, y especialmente oncológicas.

### ***1.3.2. ANÁLISIS METABOLÓMICO. TECNOLOGÍA***

El análisis metabolómico se sustenta fundamentalmente en las técnicas espectroscópicas de alta resolución, junto a los métodos de reconocimiento de patrones que serán necesarios para poder interpretar la información metabólica contenida en las muestras biológicas. En los casos de muestras obtenidas de individuos sanos y afectados por alguna enfermedad, el objetivo del análisis es identificar las diferencias entre las dos clases, mediante el análisis de los metabolitos endógenos encontrados en tejidos o fluidos biológicos. Para ello, a través de técnicas espectroscópicas de alta resolución, se obtendrá una matriz de datos metabólicos que contendrá toda la información bioquímica de una muestra biológica. Debido a su complejidad, la interpretación de esta matriz de datos requerirá del uso de herramientas estadísticas multivariantes que destacarán aquellas diferencias que sean realmente significativas entre las clases y por consiguiente biomarcadores del proceso estudiado.

El análisis metabolómico puede resumirse en los siguientes pasos:

1. CAPTURA DEL ESPECTRO
2. PREPROCESADO

3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE NO SUPERVISADO
4. FILTRO DE DATOS
5. MODELADO POR ANÁLISIS MULTIVARIANTE SUPERVISADO
6. VALIDACIÓN
7. RECONOCIMIENTO DE MARCADORES

#### 1.3.2.1 *Obtención de datos:*

Los datos metabólicos son obtenidos principalmente a través de:

- **Espectroscopia de RMN:** ( Lindon y col., 2007) Es un procedimiento muy robusto y versátil que permite la medida de un gran número de metabolitos de forma fiable y repetitiva, partiendo de un proceso de acondicionamiento de muestra muy sencillo, y con un nivel de automatización muy alto .
  - Espectroscopía bidimensional
  - Espectroscopía de alta resolución por ángulo mágico (HR-MAS)
- **Espectroscopía de masas (MS):** ( Watson y cols., 2007; Wilson y cols., 2007) cuando hablamos de análisis metabólico por espectroscopía de masas, realmente nos estamos refiriendo a la combinación de la espectroscopía de masas con técnicas de separación como son la cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC). Las técnicas de GC-MS y LC-MS permiten analizar una gran cantidad de metabolitos a sensibilidades muy superiores a las de la RMN y, además, eligiendo el método de separación adecuado, se consigue una gran selectividad, proporcionando una comprensión mayor del metaboloma. GC-MS es útil para metabolitos volátiles o aquellos que se hacen volátiles por derivación química como aminoácidos, ácidos grasos y otros ácidos orgánicos, mientras que la LC-MS es más útil para el análisis de metabolitos no volátiles como los compuestos fosforilados (Wen T y cols., 2013). Dentro de esta última está la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC). El uso de HPLC-MS en estudios metabólicos ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años

frente a otras técnicas como la cromatografía gaseosa, al requerir una preparación menos compleja de muestras.

Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta sensibilidad y selectividad en cualquiera de sus métodos utilizados.</li> <li>• Adecuado para la obtención de huellas y perfiles metabolómicos.</li> <li>• Medidas seguras de masa/carga ideales para la identificación de metabolitos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La sensibilidad depende de la eficiencia de la ionización.</li> <li>• Más eficaz cuando se acopla a técnicas de separación.</li> <li>• Protocolo de preparación de muestras más laboriosos.</li> </ul>

**Tabla 8.** Ventajas e inconvenientes de la MS para su uso en metabolómica

### 1.3.2.2. *Análisis de datos*

Los métodos quimiométricos o de reconocimiento de patrones nos permiten extraer la información relevante de la compleja matriz de datos metabólicos. Estos métodos podemos dividirlos en dos vertientes:

- métodos no-supervisados : se encargan de reducir la complejidad de una manera robusta, produciendo representaciones gráficas fácilmente interpretables, destacan diversas técnicas como
  - el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA),
  - el Análisis Lineal Discriminante (LDA)
  - el Análisis por Vecinos Cercanos (KNN)
  - las redes neuronales ( Venables y cols., 2008)
- Métodos supervisados. En estos, un conjunto de muestras de clase conocida son utilizadas para construir y entrenar un modelo matemático que será evaluado con un conjunto independiente de muestras. Entre los métodos no supervisados destaca el Análisis de Componentes Principales (PCA)

### **1.3.3. METABOLÓMICA Y CÁNCER**

La metabolómica aplicada al cáncer permite tener una representación molecular del fenotipo tumoral porque no sólo es útil para el diagnóstico o el pronóstico sino para identificar subgrupos metabólicos que pueden ser relevantes desde un punto de vista clínico. De hecho, se ha definido un metaboloma del cáncer entendido como un conjunto completo de moléculas de bajo peso molecular (<1500 Da) que son específicos de este tipo celular (Aboud y cols., 2013). No obstante, las limitaciones en los grupos de estudio y los diferentes diseños de estudio aplicados hace difícil tener conclusiones.

Las células tumorales adaptan su metabolismo a la nueva situación de proliferación lo que hace que sufran alteraciones metabólicas que se traducen en la síntesis de nuevos metabolitos o en el incremento o disminución de metabolitos ya existentes. En general, su acelerada división y la necesidad de sintetizar grandes cantidades de moléculas obliga a una elevada captación de glucosa y un incremento de la glicólisis aeróbica. Este hecho es de gran relevancia, ya que a diferencia de otros marcadores, los metabolitos muestran un comportamiento muy dinámico, en el que la monitorización puede ser clave para determinar su valor pronóstico (Turano y cols., 2014).

No obstante, son elementos muy sensibles a factores externos como la dieta, actividad física, ritmo circadiano, incluso al tiempo de extracción y tiempo entre recogida y congelado, tratamiento posterior y método de análisis, lo que explica la gran variabilidad observada para un mismo biomarcador en diferentes estudios (Farshidfar y cols., 2016; 2018)

## **1.4. ANÁLISIS GENÓMICO**

### **1.4.1. DEFINICIÓN**

El interés suscitado en la biomedicina por comprender y poder anticipar los cambios en los fenotipos de una enfermedad, ha contribuido en los últimos años, al desarrollo

de instrumentos de detección analítica que se caracterizan por su habilidad para identificar y/o cuantificar miles de moléculas biológicas, abriendo, así, la posibilidad de obtener la información de todo el genoma de un individuo en un corto periodo de tiempo. Sin embargo, si nos conformásemos sólo con este tipo de análisis, únicamente se nos permitiría entender las enfermedades de carácter genético. Esto ha obligado a que las investigaciones biomédicas hayan seguido descendiendo en la cascada de información (genómica → transcriptómica → proteómica → metabonómica → fenotipo) con el fin de poder anticiparse a todas las causas de una enfermedad. De tal forma, se ha posibilitado la oportunidad de conseguir una cantidad significativa de información en lo concerniente a las proteínas y metabolitos que se pueden hallar en los tejidos o en los biofluidos. Este conocimiento nos proporciona las bases para el entendimiento y asimilamiento de los mecanismos que subyacen en gran cantidad de patologías, enfermedades y otro tipo de alteraciones.

De tal forma, el termino “*Ómicas*”, es un neologismo que hace referencia a una visión holística del conjunto de moléculas en la biología. La **genómica** es un campo de la biología molecular. Un genoma es un conjunto completo de ADN dentro de una sola célula de un organismo, y como tal, la genómica se enfoca en la estructura, función, evolución y mapeo de los genomas. La genómica tiene como objetivo la caracterización colectiva y la cuantificación de los genes, que dirigen la producción de proteínas con la ayuda de enzimas y moléculas mensajeras.

La genómica también implica la secuenciación y el análisis de genomas. Los avances en la genómica han desencadenado una revolución en la investigación basada en el descubrimiento para comprender incluso los sistemas biológicos más complejos en la actualidad, En contraste con la genética, que se refiere al estudio de los genes individuales y sus roles en la herencia, la genómica utiliza la secuenciación de ADN de alto rendimiento y la bioinformática para ensamblar y analizar la función y la estructura de genomas completos. Para abordar distintos problemas biológicos las ciencias genómicas se subdividen en distintas áreas de conocimiento: genómica funcional, genómica estructural y genómica comparativa.

#### **1.4.2. ANÁLISIS GENÓMICO Y CÁNCER**

EL estudio de los genomas del cáncer ha revelado anomalías en los genes que impulsan la formación y el crecimiento de muchos tipos de cáncer. Este conocimiento ha mejorado nuestro entendimiento de la biología del cáncer y nos ha llevado a nuevos métodos de diagnosticar y tratar la enfermedad.

El descubrimiento de cambios genéticos y epigenéticos en los tumores ha permitido el desarrollo de terapias que se dirigen a estos cambios así como de exámenes de diagnóstico que identifican a pacientes que pueden beneficiarse con estas terapias. A modo de ejemplo el conocimiento de una mutación específica en el gen *BRAF* en pacientes con CCR ha dado lugar al uso de fármacos dirigidos contra esa mutación con impacto en la supervivencia de los pacientes. (Li y cols; 2020) En la última década, diferentes estudios han revelado semejanzas genéticas en diferentes tipos de tumores; por ejemplo, las mutaciones en el gen *HER2* (distintas de las amplificaciones de este gen,) se han encontrado en algunos cánceres como el cáncer de mama, vejiga , páncreas y ovario. (Alkhezayem y cols; 2020) También se ha investigado que un cierto tipo de cáncer, como el de mama, pulmón o gástrico puede tener varios subtipos moleculares con diferente perfil genómico que le confiere distinto pronóstico y un tratamiento específico para cada subtipo tumoral. (Zelli y cols.; 2020). Los resultados de estos proyectos ilustran el panorama diverso de alteraciones genéticas en el cáncer y proporcionan un fundamento para entender la base molecular de este grupo de enfermedades.

Aunque se han identificado un gran número de alteraciones genéticas que impulsan la formación y el crecimiento de muchos tipos de cáncer, no se han caracterizado con profundidad algunos tipos de tumores. Se podrían usar nuevas tecnologías y conocimientos obtenidos de estudios genómicos previos para definir el conjunto completo de mutaciones y otras alteraciones del ADN y el ARN en muchos cánceres. Estudios que comparan la información genómica de tumores y de tejido normal del mismo paciente nos permiten descubrir cambios genómicos relacionados con el cáncer. Otra oportunidad es extender el uso actual de los métodos genómicos para investigar la base molecular de fenotipos clínicos. Este método podría ayudar a identificar los cambios genéticos que pueden distinguir a los cánceres más agresivos

de los de crecimiento lento, por ejemplo. Métodos semejantes podrían usarse para el estudio de mecanismos de resistencia a tratamiento.

La riqueza de datos que emergen de los estudios del genoma de cáncer se integrarán cada vez más con las características clínicas del paciente y estos resultados integrados podrían usarse para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, así como para mejorar los métodos de screening. Las herramientas genómicas serán también esenciales para analizar resultados de estudios clínicos de medicina de precisión.

Existen aún retos en la investigación de la genómica de cáncer: un análisis completo de los genomas del cáncer ha revelado mucha diversidad en las anomalías genéticas entre los cánceres de un solo tipo. Más aún, las alteraciones genéticas recurrentes dentro de esos cánceres están incluidas en solo un pequeño porcentaje de casos. La identificación de los cambios genéticos que inician la formación de cáncer y el descubrimiento de alteraciones genéticas raras que impulsan los cánceres son, por lo tanto, un reto para la investigación en este campo. Otro reto es la adquisición de muestras biológicas de alta calidad necesarias para estudios genómicos, en particular para tipos de tumores que son poco comunes o raros, o los que no son tratados principalmente con cirugía. La preparación de estirpes celulares y de modelos animales que captan la diversidad del cáncer humano es una necesidad insatisfecha. Los modelos de subtipos raros de cáncer pueden no existir o tener muy poca representación, y no hay modelos para muchas lesiones genéticas recurrentes en el cáncer humano.

El manejo y análisis de grandes cantidades de datos que comprenden los estudios genómicos son desafíos adicionales para este campo. Esta área de investigación requiere una eficiente infraestructura de bioinformática e implica cada vez más contribuciones de datos y pericia de equipos interdisciplinarios.

#### ***1.4.3. ANÁLISIS GENÓMICO EN ONCOLOGÍA. TECNOLOGÍA.***

Las primeras técnicas que se emplearon para analizar alteraciones genéticas en muestras tumorales fueron metodologías que podemos calificar de «dirigidas». Estas técnicas, que se siguen empleando de forma generaliz

ada en la rutina clínica, se caracterizan por detectar alteraciones en un solo gen o proteína (o en un número muy limitado). (Lyman y cols.; 2016, Sheikine y cols.; 2017,)

Están incluidas en estas técnicas dirigidas:

- La hibridación fluorescente in situ (FISH)

- La inmunohistoquímica (IHQ)

- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR): la primera técnica que se utilizó en los laboratorios clínicos fue la PCR, seguida de la visualización de bandas en gel de agarosa y la secuenciación de Sanger que permite determinar la secuencia completa de amplicones seleccionados. Más adelante se desarrolló la PCR a tiempo real o cuantitativa (Q-PCR), que incorpora sondas específicas para mutaciones seleccionadas, que emiten fluorescencia cuando la mutación está presente en la muestra. (Rosell y cols. ; 2009) Las modificaciones de la Q-PCR que permiten ganar sensibilidad son el enriquecimiento mediante ácidos nucleicos peptídicos y ácidos nucleicos bloqueados, el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) o el Scorpion-ARMS. (Molina y cols.; 2008 ) La PCR también se puede utilizar para el análisis de ARN, pero en este caso se debe llevar a cabo primero un paso de RT para convertirlo en ADN copia; por ello, se habla de RT-PCR. (Gonzalez Cao y cols.; 2015). Esta técnica y otras derivadas, como la RT-PCR cuantitativa, se utilizan para la determinación de los niveles de expresión de genes de interés y para el análisis de transcritos de fusión o variantes de *splicing* alternativo de relevancia clínica, a partir de ARN purificado de tejido tumoral o biopsias líquidas

Tipo de técnica	Permite la detección de	Muestras utilizadas	Ejemplos
<b>Técnicas dirigidas</b>			
<b>FISH</b>	Alteraciones cromosómicas	biopsias incluidas en parafina	–
<b>IHQ</b>	Expresión de proteínas	biopsias incluidas en parafina	–
<b>Basadas en la PCR</b>	Mutaciones	biopsias incluidas en parafina	PCR + secuenciación Sanger PCR a tiempo

<b>RT-PCR</b>		ADN purificado a partir de biopsias, citologías, biopsias líquidas	real (Q-PCR) PCR digital
	Genes de fusión, variantes de splicing alternativo, expresión génica	ARN purificado a partir de biopsias, citologías, biopsias líquidas	RT-PCR + secuenciación Sanger Q-RT-PCR
<b>Técnicas multiplexadas</b>			
<b>NGS</b>	Mutaciones, genes de fusión, amplificaciones	ADN purificado a partir de biopsias, citologías, biopsias líquidas	illumina® IonTorrent™ GeneReader®
<b>nCounter®</b>	Niveles de expresión, genes de fusión, variantes de splicing alternativo	ARN purificado a partir de biopsias, citologías, biopsias líquidas	-

**Tabla 9** Técnicas usadas en oncología para determinar marcadores con relevancia clínica

Las técnicas «dirigidas» tienen ventajas, como su coste, normalmente bajo, la relativa facilidad de realización y un tiempo corto hasta la entrega de los resultados. Sin embargo, puesto que solo detectan alteraciones concretas, a menudo hay que emplear de forma secuencial múltiples técnicas para el análisis de una sola muestra, lo cual eleva de forma notable las necesidades de muestra tumoral, el coste total y el tiempo de análisis.

Para superar estas limitaciones, en los últimos años se han desarrollado técnicas multiplexadas, que detectan simultáneamente alteraciones en varios genes con el consiguiente ahorro de material tumoral, tiempo y coste económico. (tabla 9) (Heuckmann y cols.; 2015; Gao y cols.; 2016; Reguart y cols.; 2017). La secuenciación de nueva generación (NGS) o de alto rendimiento es una técnica multiplexada que engloba una serie de metodologías de secuenciación desarrolladas en los últimos años. Tienen en común que realizan en paralelo la amplificación de cientos o miles de fragmentos a partir de una muestra de ADN purificado, para producir una «biblioteca» de amplicones que luego se secuencian, también en paralelo. Finalmente, los millones

de secuencias así producidas se alinean entre sí y con un genoma de referencia para identificar las mutaciones. En muchos casos, la NGS permite también identificar genes de fusión, amplificaciones y otras variaciones en el número de copias

## **1.5. BIOMARCADORES EN CÁNCER**

### **1.5.1. DEFINICIÓN Y GENERALIDADES**

Los biomarcadores tumorales entendidos como una entidad biológica que puede ser determinada en medios orgánicos derivados de pacientes con cáncer, incluyen la determinación de moléculas en cualquier líquido o tejido corporal o en el propio tumor, estos marcadores pueden evaluar el seguimiento de enfermedad mediante monitorización de sus niveles, diagnosticar la enfermedad (lo que incluye los métodos de screening poblacional) o determinar su pronóstico o las actuaciones terapéuticas que deben llevarse a cabo (Chand y cols., 2018). Aunque los screening para detección precoz de CCR ayudan a detectar la enfermedad, sigue siendo necesario encontrar un biomarcador específico y sensible, que sea seguro y de fácil aplicación clínica (Mármol y cols., 2017).

### **1.5.2. BIOMARCADORES EN CCR**

#### **1.5.2.1. Biomarcadores basados en Acido Ribonucleico (ARN)**

##### **1.5.2.1.1. RNA mensajero (ARNm) como marcador en CCR.**

El ARNm, que transfiere la información desde el ADN para la síntesis de productos proteicos, se ha explorado como fuente de biomarcadores en multitud de estudios difíciles de comparar por su variación tanto en los grupos control, en el diseño, en la localización del biomarcador y en la búsqueda de marcadores en diferentes fases de evolución de la patología. Así, la ciclina E, p27<sup>kipl</sup> y ki-67, se han propuesto por Li y cols. (2016) en un estudio retrospectivo por presentar sensibilidades y especificidades de alrededor del 80% , aunque la detección se realizó en el tejido y no en sangre. Por otra parte, el análisis de los niveles de ARNm de SALL4 en 72 muestras de sangre y suero de pacientes con CCR sin tratamiento mostró una

correlación significativa con la profundidad de la infiltración y la diferenciación tumoral y una sensibilidad y especificidad para la detección de CCR de 96 y 95%, respectivamente, según el análisis ROC (Ardalan y cols., 2015). Además, el ARNm de Tetraspanina 8 (TSPAN8) se ha determinado en sangre completa de pacientes con CCR que muestran un área bajo la curva (AUC) de 0.751 con una sensibilidad del 83.6% y una especificidad del 58.2% para diferenciar a los pacientes de donantes sanos (Rodia y cols., 2016). Recientemente, esta proteína de membrana TSPAN8 que promueve la angiogénesis, entre otras funciones, se ha propuesto como un objetivo potencial para la radioinmunoterapia en CCR (Maisonia-Besset y cols., 2017).

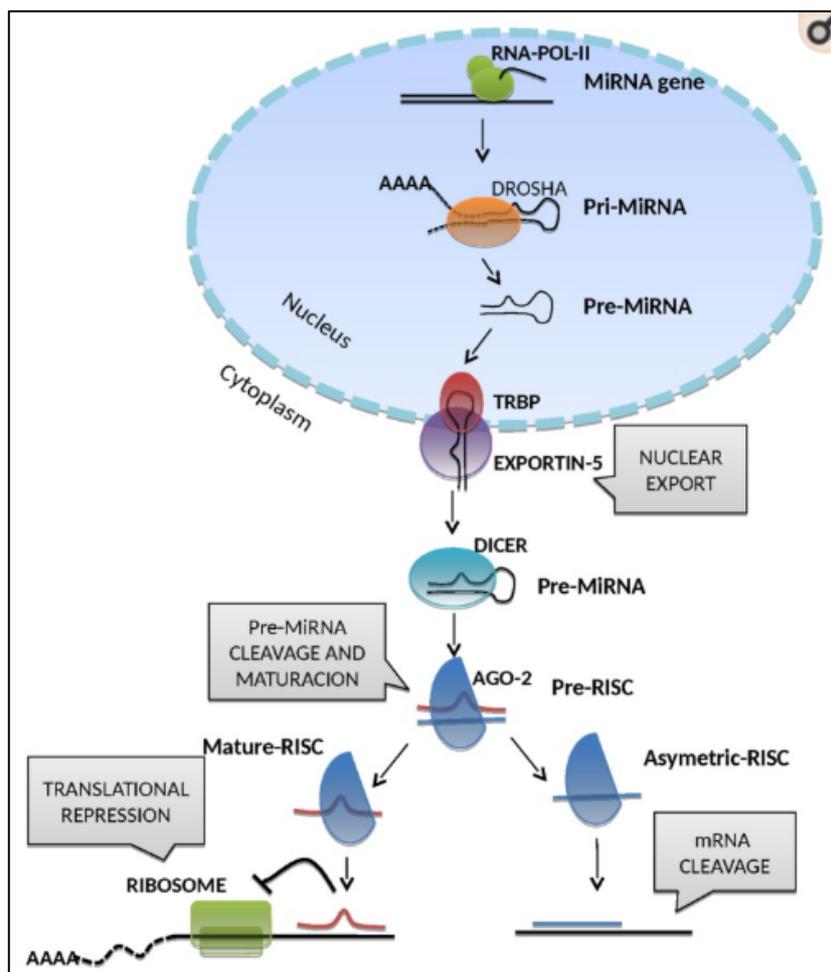
Diferentes mRNA de moléculas relacionadas con el proceso de la angiogénesis también han sido estudiados como biomarcadores en CCR. La sobreexpresión de PTGS2 ha sido también propuesta como marcador de CCR, pero los estudios hasta la fecha se han centrado en el tejido tumoral (Shuji y cols., 2008) estando pendiente su detección en sangre. Recientemente, esta asociación se ha corroborado en un estudio prospectivo con una cohorte más amplia en la que, además se ha demostrado, que la expresión de miR21 empeora la respuesta clínica de los pacientes (Mima y cols, 2016). Por otra parte, El perfil de expresión de ARNm de GUCY2C en tejido ayuda a la estadificación de tumores colorrectales primarios y puede indicar metástasis ocultas (Aka y cols 2017). En un importante estudio prospectivo multicéntrico cegado realizado por Waldman y cols. (2009) que incluyó a 257 pacientes, la RT-PCR (reacción de polimerasa en cadena con transcriptasa inversa) del ARNm de GUCY2C permitió detectar metástasis ocultas en pacientes considerados en estadio II por técnicas histopatológicas tradicionales.

Marshall y cols. (2010) propusieron siete ARNm presentes en sangre (anexina A3, Familia de dominio de lectina tipo C 4 (Miembro D), Lamin B1, Proline Rich Gla, Factor de necrosis tumoral, Vanina 1 e Interleucina 2 Receptor Beta) como un set para la detección de CCR. La determinación de la expresión de ARNm de TSPAN8, lectina galactosida soluble 4 (LGALS4) y colágeno tipo I de la cadena alfa 2 (COL1A2) en sangre tubo éxito para detectar pacientes con CCR con una especificidad de 67.16% y 92.54% sensibilidad. Curiosamente, la reciente inclusión de un nuevo gen en este panel de biomarcadores, la molécula de adhesión celular relacionada con el

antígeno 6 (CEACAM), mejoró el rendimiento de manera que el panel de 4 genes (LGALS4, CEACAM6, TSPAN8 y COL1A2) obtuvieron un AUC de 0,88 (sensibilidad, 75%; especificidad, 87%) comparando sujetos normales y de alto riesgo / CCR y un AUC de 0,91 (sensibilidad, 79%; especificidad, 94%) comparando sujetos normales con sujetos de bajo riesgo / CCR (Rodia y cols. , 2018). En un muy reciente ensayo llevado a cabo por Shou y cols. (2019) se propone la detección en sangre de la expresión de un panel de seis genes (CEA, EpCAM, CK19, MUC1, EGFR y C-Met) para la detección de CCR, obteniéndose una sensibilidad mayor que la de CEA (82% versus 70%). Este novedoso ensayo de seis genes mejora la definición del estado de la enfermedad y se correlaciona con la supervivencia libre de progresión en el CCR recidivante y por lo tanto es prometedor para futuras aplicaciones clínicas.

#### 1.5.2.1.2. MicroRNA y CCR.

Los MicroRNA (miRNA), moléculas de ARN no codificantes de 19 a 23 nucleótidos, intervienen sobre el ARN mensajero en la transducción proteica para incrementar o reducir su expresión. Este hecho, hacen que sean moléculas clave en los procesos de proliferación y la diferenciación celular explicando y por tanto que sean de gran interés en los procesos tumorales (Lizarbe y cols., 2017; Ding L, y cols., 2018; Tume y cols., 2016). Presentan como gran ventaja, su estabilidad tanto a cambios de pH como de temperatura y su posible determinación mediante técnicas no invasivas como son un simple análisis sanguíneo (Thomas y cols., 2015; Ren y cols., 2015). Estos biomarcadores no sólo han sido estudios con fines diagnósticos, sino como posibles indicadores del pronóstico de la enfermedad en respuesta al tratamiento. Aunque son muchos los miRNA analizados en CCR, pasamos a destacar algunos de los más relevantes. (figura 11 y 12)



**Figura 11.** Esquema sobre la formación y función de los microARN a nivel núcleo celular. Los microARNs son transcritos por la polimerasa II en transcritos primarios (pri-miARNs) los cuales son fragmentados por la enzima Drosha. Este proceso lleva a la formación del precursor en forma tallo-asa (pre-microARNs). La exportina 5 transporta los pre-ARNs del núcleo al citoplasma, donde la ribonucleasa Dicer los procesa en dobles microARNs, concluyendo la maduración de los microARNs. Una de las dos cadenas (microARNs maduros) es incorporada en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), y se une al extremo 3'-UTR del ARN objetivo, resultando en su degradación o supresión. (Hernández R et al. 2018. miRNAs: characteristics and biogenesis. Recuperado de BMB Rep. 2018; 51(11):563-571)

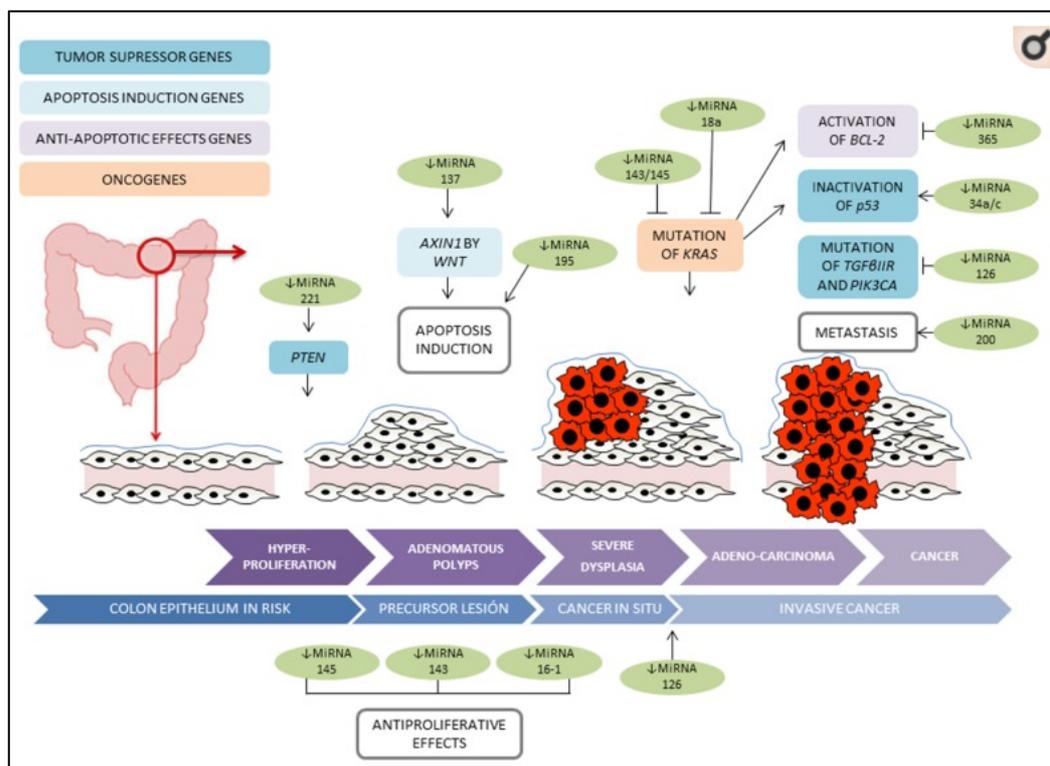
El miR-21, el miARN más ampliamente estudiado en CCR, ha demostrado una especificidad de un 85% y una sensibilidad de un 64% como biomarcador de diagnóstico precoz en este tipo de tumor Peng y cols. (2017). Su expresión también se ha relacionado con la resistencia al uso de 5-FU, a través de la modulación de la proteína Sprouty2 que aumenta la toxicidad del citostático (Lin y cols., 2017) y con la respuesta a la quimioterapia (Tsukamoto y cols., 2017; Feng y cols. 2012).

Otros dos miRNA intensamente investigados en CCR han sido miR-143 y miR-145. El primero, posee una función supresora tumoral por lo que la reducción de la expresión en células tumorales favorece la proliferación celular (Yan y cols. 2015) habiendo sido detectados niveles muy bajos en pacientes metastásicos. Además, algunos autores lo han relacionado con la actividad del oxaliplatino en el tratamiento (Qian y cols 2013). El segundo, miR-145, considerado otro supresor tumoral, se ha observado aumentado en tejido neoplásico postratamiento por lo que ha sido propuesto como biomarcador pronóstico (Drebber y cols, 2011). En sangre, este miRNA ha sido analizado junto a los niveles de PVT1, considerado un oncogen, demostrándose una relación inversamente proporcional entre ambos.

El miR-31, considerado como un oncogen que puede activarse por diferentes mutaciones, se ha asociado con la mutación del gen BRAF y el desarrollo adenocarcinoma de colon (Nosho y cols., 2014). Esta molécula se ha propuesto como biomarcador diagnóstico en CCR e incluso como posible diana terapéutica, habiéndose desarrollado estrategias con fármacos antimir-31 que han conseguido una mejora de la SG de los pacientes afectos de la enfermedad (Tateishi y cols. 2015;)

Por otra parte, moléculas como miR-106A y Let-7A también han sido investigadas en CCR. Algunos estudios determinan que los niveles elevados de miR-106A son capaces de silenciar genes supresores de tumores (como el gen retinoblastoma), lo que podría estar relacionado con la aparición de CCR y que podrían inactivar ciertas fosfatasas (DUSP2) modulando la del agente 5-FU (Hao y cols. 2017).

Recientemente, Sabry y cols. (2019) analizan la relevancia de **miR-210**, **miR-21**, **miR-126** como biomarcadores de CCR debido a su papel en la vía de señalización HIF-1 $\alpha$ -VEGF y su esencial papel en el proceso de neoangiogénesis. Sus resultados demostraron que tanto la sobre regulación de miR-210 como la de miR-21 estuvieron asociados con un posible papel diagnóstico de CCR con una sensibilidad y especificidad del 88.6%/90.1% y 91.4%/95.0% respectivamente. Además, la presencia de otros miRNAs como **miR-141**, **miR-200b** y **miR-200c** se correlacionaron con la presencia de metástasis hepáticas y los altos niveles de suero **miR-203** se asociaron con una menor supervivencia.



**Figura 12** Esquema de las interacciones del miRNA en el cáncer de colon. MACC1, metástasis asociado con cáncer de colon-1; Erk5, kinasa extracelular 5; TGFβII, factor de crecimiento-β tipo-II; PIK3CA, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatasa kinasa-3 subunidad catalítica alfa; y PTEN, fosfatasa y tensina homólogas (Hernández R et al. 2018. Interactions of the miRNAs downregulated in the colorectal cancer with the intracellular signaling networks. Recuperado de BMB Rep. 2018; 51(11):563-571).

### 1.5.2.1.3. Los ARNs no codificantes largos (LncRNA) y CCR.

LncRNAs son ARNs que desempeñan funciones en la regulación de la transcripción génica, la postranscripción, la traducción y la modificación epigenética. La alteración en su expresión o la disfunción de lncRNA se ha correlacionado con diversas patologías incluyendo el cáncer. (Ming-Chun y cols 2019). Así, determinados lncRNA se sabe que intervienen en el control de la proliferación celular, la apoptosis, la migración, la capacidad de invasión durante el desarrollo del cáncer. Estudios recientes han demostrado que los lncRNA también pueden participar en el desarrollo de las metástasis tumorales, así como en la remodelación del microambiente tumoral (Jiang y cols 2014).

Los patrones de expresión de lncRNA, ya sea en tejidos o en circulación, tienen gran potencial como marcadores de diagnóstico de CCR de aplicación clínica. Tanaka y cols (2001) demostraron que el lncRNA “QT intronic transcript-1” (LIT1 / KCNQ1OT1) se detectó en el tejido de CCR siendo negativo en los tejidos peritumorales. Pedersen y cols (2014) también informaron de la hipermetilación del lncRNA denominado adenocarcinoma colorrectal hipermetilado (CAHM) en el 81% de los adenomas y 71% de los CCR mientras que tan sólo en un 8% de los controles (tejido normal) apareció hipometilado. Además, este marcador también pudo ser detectado en el plasma del 55% del CCR analizados en comparación con el 4% de los adenomas y el 7% de los sujetos sin neoplasia. CRNDE47, es otro lncRNA potencialmente diagnóstico, habiendo sido detectado en niveles elevados en el 90% de los tejidos de adenomas y adenocarcinomas colorrectales. Su presencia en sangre ha demostrado una sensibilidad y especificidad del 87% y 93% (Graham y cols. 2011). Recientemente, los lncRNA de sangre periférica circulante se han propuesto como una prueba mínimamente invasiva para el diagnóstico de CCR (Galamb et al., 2019).

#### **1.5.2.2. ADN como biomarcador de CCR. Marcadores epigenéticos.**

Otro ácido nucleico, el ADN, también ha sido propuesto como biomarcador en CCR. Su presencia libre en la sangre tras los procesos de apoptosis celular o su detección en células vivas circulantes ha demostrado ser una potente herramienta para la detección del adenocarcinoma de colon. Las mutaciones genéticas y las modificaciones epigenéticas del ADN en sangre son analizadas con el fin de conseguir un diagnóstico más precoz de la enfermedad ( Hauptman y cols. 2017).

Los genes **APC**, **KRAS** y **BRAF** han sido los más ampliamente estudiados como biomarcadores de CCR. En el gen supresor de tumores **APC** se han descrito hasta tres polimorfismos considerados relevantes para CCR (D1822V, E1317Q, I1307K). Algunos autores detectan hasta en un 90% de pacientes con CC, una mutación de este gen, lo que apoya su carácter diagnóstico (Gelsomino y cols., 2016). Sin embargo, su mutación también ha sido relacionada con la sensibilidad o resistencia de las células tumorales a determinados fármacos (inhibidores de la enzima tankirasa) (Tanaka y cols. 2017). Por otra parte, las mutaciones en el gen KRAS, unas de las

más estudiadas en CCR, permite una activación mantenida de la importante vía para el control de proliferación y diferenciación celular, la vía EGFR, siendo especialmente relevante que este efecto ha sido detectado en las fases iniciales del proceso de tumorigénesis. Así, Lu y cols. (2017) describen K-RAS como un biomarcador de diagnóstico pretumoral especialmente en pacientes con lesiones benignas. No obstante, también se le ha otorgado un valor pronóstico en relación a la respuesta al tratamiento o al desarrollo de metástasis o recidivas. Por último, las mutaciones en el **gen BRAF**, menos frecuentes (Coppedè y cols., 2014), parecen tener un especial valor como marcador pronóstico de la enfermedad. Así, la mutación V600E está relacionada con un pronóstico más desfavorable (Nakaji y cols., 2017) y se ha propuesto como un método para clasificar distintos subtipos moleculares (Barras y cols., 2017) independientes de la clasificación actual.

Por otra parte, la IMS, repeticiones de 1-6 bases diseminadas por todo el genoma, es ampliamente conocida como marcador de CCR. Estas secuencias, especialmente susceptibles a errores durante el emparejamiento del ADN, presentan inserciones o deleciones denominadas IMS. En 1998 se acordó un panel de 5 marcadores microsatélites (tabla 10) y los criterios para definir la inestabilidad de forma que la inestabilidad en 2 o más marcadores se considera una IMS alta y es baja si sólo aparece en un marcador. BAT 25 Y BAT 26 son mononucleótidos y D2S123, D5S346, D17S250 dinucleótidos de forma que los mononucleótidos sólo presentan deleciones, mientras que los dinucleótidos presentan inserciones o deleciones. Debemos destacar el papel de BAT-26, ya que su detección en más del 95% de los pacientes con IMS, indica su relevante función como biomarcador diagnóstico tanto en estadios precoces como avanzados de la enfermedad (Goel y cols; 2018). Su análisis se plantea en la población de alto riesgo con familiares de primer grado afectados por esta enfermedad. La muestra es de sangre ya que se obtienen mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad.

**Tabla 10** Marcadores microsatélites

Marcador	Tipo	Localización
BAT-25	Mononucleótido	4q12
BAT-26	Mononucleótido	2p16
D2S123	Dinucleótido	2p21-2p16
D5S346	Dinucleótido	5q21-5q22
D17S250	Dinucleótido	17q11,2-17q12

La modulación en la metilación de los genes, lo que se denomina **marcadores epigenéticos**, también están siendo estudiados con gran interés en CCR dado que se han relacionado con el propio proceso de transición desde una mucosa normal a una mucosa neoplásica (Coppedè y cols., 2014). Esta tecnología posee la ventaja de poder realizarse en sangre o incluso en heces por lo que se presenta como un posible sustituto de los test actuales de sangre oculta en heces (Kadiyska y cols., 2015; Pack y cols., 2013; Hashimoto y cols 2016)

Los estudios sobre el gen **Septicina 9** son los más avanzados. La sensibilidad de este gen para detectar CCR se ha situado en un 65% (Li Dong y cols., 2018) aunque algunos estudios la sitúan en un 90% (Warren y cols. 2011; Yan y cols., 2016). En cualquier caso, septicina 9 se presenta como un marcador que será necesario considerar para el desarrollo de screening de CCR (Zhang y cols., 2017). Aunque otros biomarcadores epigenéticos como SFRP2 y vimentina han sido testados en muestras de heces, los resultados son muy preliminares. Diferentes estudios sobre la **vimentina** demuestran una enorme variabilidad en cuanto a sus resultados, siendo otro de los biomarcadores con implicaciones en el diagnóstico de CCR. Así, se describe una sensibilidad para estadios I-III de CCR de un 97% mientras que otros autores la sitúa en un 57% en estadios tempranos, disminuyendo en estadios avanzados (Wang y cols., 2014; Shirahata y cols., 2014).

**SFRP2**, ha mostrado una sensibilidad en CCR de un 67%-88% con variaciones dependiendo del tipo de muestra en el que se analiza. Sin embargo, los estudios sobre adenomas benignos parecen demostrar su alta sensibilidad para diferenciarlo de una

patología maligna (Park y cols. 2016). Su utilidad como factor pronóstico y predictivo está por demostrar (Wang y cols. 2014).

En general, la reproducibilidad de los resultados con un marcador han sido problemáticos por lo que se han combinado múltiples genes metilados en paneles. Así se ha conseguido una alta detección de CRC combinando la metilación de BMP3 y NDRG4 o vimentina y SFRP2 genes, pero estos resultados deben ser corroborados (Liu y cols., 2019; Xiao y cols., 2014)

### **1.5.2 3. Metabolitos como marcadores en CCR**

Desde hace tiempo, se han intentado caracterizar los cambios metabólicos asociados con el CCR (Ma et al, 2012; Mal y cols., 2012; Nishiumi y cols., 2012).

En CCR, se ha estudiado la presencia de aminoácidos en sangre y nucleósidos en orina como marcadores de la enfermedad sin resultados concluyentes (Erben y cols., 2018). Algunos metabolitos concretos como el ácido betahidroxibutirato, la cistamina y el ácido aspártico han sido propuestos para el diagnóstico de CCR por poseer una sensibilidad más alta que el mostrado por los clásicos marcadores CEA o CA-19.9 (Manne y cols., 2017). Panel de metabolitos (como la asociación de piruvato, ácido glicólico, triptófano, ácido fumarico, ornitina, ácido palmitoleico, lisina y ácido 3-hidroxiisovalérico) presentan una sensibilidad entre el 70-90% para la detección de CCR (Nishiumi y cols., 2017). Otros autores, apuestan por determinación de la oxidación de ácidos grasos para identificar precozmente un adenocarcinoma de colon (Zhang y cols., 2014). La mayoría de los metabolitos son detectados en sangre, pero cada vez hay más estudios que emplean las heces y o la orina (Farshidfar y cols. 2018) aunque estos últimos parecen ser lo más afectados por el ritmo circadiano, la dieta y el tiempo de la recogida. En cualquier caso, y aunque muchos metabolitos poseen una sensibilidad y especificidad superiores al 90% para la detección de CCR (Lin y cols., 2016; Crotti et al., 2016), los problemas de costo y complejidad hacen en la actualidad complejo introducirlos en la práctica clínica habitual.

Por último, algunos de los metabolitos utilizados para detectar tumores malignos son compuestos orgánicos volátiles (VOC-s) que están presentes en la fase gaseosa de varios materiales biológicos excretados incluido el CCR (Di Lena y cols., 2016). No obstante, las dificultades técnicas limitan el uso generalizado del análisis de VOC en el entorno clínico, a pesar de los éxitos que se han conseguido en relación al diagnóstico de la enfermedad. No obstante, recientes resultados publicados por Zonta y cols. (2019) detectando metabolitos VOCs derivados del proceso de peroxidación de membrana y alteraciones metabólicas de las células tumorales, demuestran una sensibilidad para reconocer el CCR y los adenomas de alto riesgo superior a la de las pruebas de sangre oculta en heces y la colonoscopia.

#### **1.5.2.4. Biomarcadores basados en proteínas circulantes**

A pesar de la intensa investigación en relación a nuevas proteínas marcadoras de CCR, en la actualidad CEA y CA-19-9 siguen siendo las más utilizadas y los únicos con cierta eficacia para el seguimiento de CCR (Lech y cols. 2016). No obstante, su baja sensibilidad y especificidad, especialmente la de CA 19-9 las hacen inapropiadas para ser usadas como prueba diagnóstica o para su aplicación en screening. En este contexto, son muchas las proteínas bajo evaluación clínica para determinar su eficacia. Así, la **Ciclooxigenasa-2 (Cox-2)** aparece elevada entre un 70-90% de CCR. Tupá y cols. (2019), concluyen la asociación de este biomarcador con estadios avanzados del CCR corroborando el papel de Cox-2 en la angiogénesis, invasión y metástasis tumoral. Además, Cox-2 se ha postulado como posible biomarcador predictivo o pronóstico de la enfermedad (Das y cols., 2017). Ciertas **citoquinas**, entre las que destaca la CXCL 1,2,3,6,8,10 se han postulado como nuevos marcadores de CCR dada su elevada expresión en estos pacientes (Heras y cols. 2018), en los que se ha relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad. También la **Integrina alpha E (ITGAE)** ha sido utilizada como biomarcador pronóstico habiéndose relacionado con una mayor supervivencia al ser un indicador de la presencia de linfocitos CD8 activos frente al tejido tumoral (Hu y cols. 2018). Dentro de este tipo de moléculas, los recientes estudios realizados por Bengs y cols., 2019, revelan que la determinación en suero de la **integrina  $\beta 6$**  puede ser un nuevo marcador tumoral para CCR.

Como marcadores de la evolución de la enfermedad se han postulado la **osteoprotegerina y la ezrina**. La primera, fue seleccionada de un ensayo que incluyó a 92 proteínas en plasma como un posible marcador en CCR en estadio II y III. (Birgisson y cols. 2018). La segunda, es una proteína que actúa en el citoesqueleto, y que aparece aumentada en el CCR cuando aumenta su agresividad y empeora su pronóstico (Fathi et al., 2017).

Por otra parte, la **proteína SATB2** ha sido detectada mediante inmunohistoquímica (IHQ) como marcador pronóstico que se correlaciona con la presencia de metástasis hepáticas procedentes de CCR (Zhang y cols. 2018), siendo bastante selectivo de este tipo de tumor y la **proteína S100 A2**, relacionada con el ciclo celular, ha sido propuesto como biomarcador de mal pronóstico y de mayor riesgo de recidiva al haberse correlacionado con la expansión tumoral sobre todo en estadios II y III de la enfermedad. Una alta sensibilidad y especificidad (98.7% y 94.8%, respectivamente) se ha obtenido con la combinación de la detección en sangre de las lectinas DCSIGN y DC-SIGNR, aunque estos resultados no han sido validados en otros grupos de pacientes con CCR (Jiang et al., 214). Finalmente, la **proteína rica en cisteína (uCYR61)**, una proteína de la matriz celular, ha sido detectada en la orina de pacientes con CCR donde se le ha dado un valor diagnóstico aunque no pronóstico (Shimura y cols. 2019).

#### ***1.5.2.5. Células tumorales circulantes( CTCs) y exosomas***

Los niveles de **CTCs** están muy correlacionados con la determinación de ADN libre tumoral y se ha propuesto como biomarcador para CCR. El conocimiento de la presencia de subfamilias de células tumorales que viajan por la sangre y que pueden anidar en diferentes tejidos para generar macrometástasis, ha llevado a intentar detectarlas con el objetivo de predecir el desarrollo de dichas metástasis o de monitorizar su evolución. La biología del proceso de expansión tumoral incluye una continua liberación de células al torrente sanguíneo que en parte se eliminan, pero que finalmente consiguen proliferar a distancia (Burz y cols. 2018). Diferentes estudios han validado la teoría que propone que los altos niveles de CTCs en sangre

se correlacionan con un pronóstico desfavorable y el aumento de metástasis a distancia (Tsai y cols. 2016) Además, en estadios avanzados, parece ser un marcador que permite establecer recomendaciones terapéuticas.. Así, estudios en CCR tratados con cetuximab o panitumumab demostraron como la monitorización de los cambios moleculares de las células circulantes y especialmente la aparición de mutaciones secundarias, se correlacionó con la supervivencia de los pacientes (Su y cols., 2018).

En pacientes con CCR tratados con Regorafenib (anti-angiogénico utilizado en CCR metastásico), la combinación análisis de imagen y análisis de CTCs demostró mejorar la monitorización de los pacientes y su pronóstico (Khan y cols., 2018). En el estudio MACRO se demostró que los niveles basales de CTCs no eran predictores de respuesta a la quimioterapia, pero sí las variaciones al 3er ciclo de tratamiento, tanto para la SLP como para SG: la mediana de SG para pacientes con CTC <3 fue de 25m vs 16 m para pacientes con CTC>3 (p=0,0095). (Sastre y cols.; 2012) Diferentes estudios también investigan el papel de las CTCs para selección de tratamientos en pacientes con CCRm. El estudio de (Krebs y cols.; 2015) identifica aquellos pacientes con CTCs >3 que se benefician más de un tratamiento intensivo. Recientemente se han presentado los resultados de los estudios VISNU1 y VISNU 2 en los que se explora el papel de las CTCs como factor de mal pronóstico y su utilidad para la selección del tratamiento concluyendo que aquellos pacientes con CTCs>3 se benefician de un tratamiento más intensivo (Aranda y cols.; 2020) y que, en los pacientes de bajo riesgo según las CTCs, la mutación de BRAF y/o PIK3CA tiene un impacto negativo en la SG y tendencia a peor SLP. (Sastre y cols.; 2021) Diferentes estudios como el de Linuma y cols. (2011) y Bork y cols. (2015) ponen de relieve el potencial factor pronóstico de las CTCs analizadas de forma preoperatoria, aunque con resultados contradictorios. La posibilidad de que este biomarcador pueda ser usado como método de screening y /o que sustituya a la biopsia de tejido necesitará de estudios más amplios en relación a su estandarización para su posible aplicación clínica.

Por último, **los exosomas**, pequeñas vesículas envueltas por una bicapa lipídica que están implicados en la transferencia de miRNAs, mRNA y proteínas a una célula

diana, son intercomunicadores extracelulares que parecen jugar un papel importante en los procesos tumorales (Ruiz-lópez y cols., 2018). En CCR, los exosomas promueven la tumorigénesis, la angiogénesis y las metástasis hepáticas (Huang y cols., 2016; Wang y cols. 2015). Además, pueden reorganizar la matriz extracelular y alterar el nicho metastático en donde generan un microambiente inmunosupresor al dañar las células inmunitarias e inducir la apoptosis de las células T (Yu y cols. 2015). Algunos autores han destacado el papel de exosomas que contienen ciertos miARNs con la respuesta a drogas e incluso con el desarrollo de quimiorresistencia (Zhou y cols., 2017) pudiendo ser marcadores de respuesta a tratamiento. Así, la detección de exosomas circulantes con microARN 17-5p y 92a-3p parece relacionarse con un mal pronóstico en CCR (Fu y cols. 2018).



# *O*bjtivos



1. Identificar potenciales biomarcadores génicos de CCRm relacionados con el proceso de angiogénesis en muestras de suero y sangre de pacientes utilizando PCR digital.
2. Determinar la capacidad discriminativa de estos biomarcadores entre pacientes con CCRm y casos control, incluyendo estudios individuales y estudios de combinación.
3. Determinar la correlación de estos biomarcadores con los datos clínicos de los pacientes incluyendo su posible vinculación con la respuesta al tratamiento.
4. Identificar potenciales biomarcadores de CCRm mediante el uso de un enfoque metabolómico no dirigido en muestras de suero de pacientes.
5. Determinar la capacidad discriminativa de estos biomarcadores entre pacientes con CCR y casos control, tanto de forma individual como en combinación (“huella metabolómica”).



# **M**aterial y métodos



### 3.MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

##### **3.1.1. PACIENTES Y TOMA DE MUESTRA**

En el estudio de **RNA** se incluyeron un total de 66 pacientes con CCRm y un grupo de 47 controles sanos emparejados por edad y sexo que fueron obtenidos del Biobanco del Sistema de Salud de Andalucía (Granada, España).

El estudio de **metabolómica** incluyó 65 pacientes con CCRm (grupo CCR) y 60 controles sanos (grupo HC) que fueron obtenidos del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. La media de edad fue de 59,9 años en el grupo CCR (36 hombres y 29 mujeres) y de 56,1 años en el grupo HC (29 hombres y 31 mujeres).

Todos los pacientes presentaban confirmación histopatológica de CC y el diagnóstico de enfermedad metastásica se realizó a través de estudios de imagen. Las muestras fueron obtenidas de pacientes atendidos en la Unidad de Oncología Médica del Hospital Virgen de las Nieves de Granada.

Se incluyeron 64 pacientes en el análisis de respuesta al tratamiento, de los cuales 21 pacientes fueron tratados con QT combinada con terapia antiangiogénica y 43 con QT exclusiva. La respuesta a la terapia de evaluación se basó en respondedores/no respondedores

##### **3.1.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

- **Criterios de inclusión:** En el caso de los pacientes, los criterios de inclusión aplicados para su selección fueron los siguientes:
  1. Pacientes diagnosticados de CCR invasivo confirmado mediante biopsia excisional o incisional.
  2. Pacientes diagnosticados de CCRm
  3. Pacientes que firmen consentimiento informado.
  4. Edad mínima de 18 años y sin edad máxima de participación
  5. Estadio funcional de 0 a 2 en la escala de ECOG.

6. Presentar, como mínimo, una lesión medible según se define en los criterios para la evaluación de la respuesta de los tumores sólidos
7. Ausencia de tratamiento previo para CCRm.
8. Pacientes candidatos a recibir tratamiento de primera línea para enfermedad avanzada con QT exclusiva o con QT en combinación con Bevacizumab.
9. Esperanza de vida de al menos 6 meses
10. Función orgánica adecuada.
11. Cumplimiento terapéutico y proximidad geográfica que faciliten un seguimiento adecuado.

• **Criterios de exclusión** Fueron excluidas del estudio aquellos pacientes que cumplieron alguno de los siguientes criterios:

1. Pacientes que hayan recibido tratamiento previo con QT para enfermedad metastásica.
2. Pacientes cuyo tratamiento para enfermedad avanzada incluya terapias antiEGFR como cetuximab y panitumumab.
3. No se excluían pacientes que hubieran recibido tratamiento QT adyuvante
4. Enfermedad general grave asociada que, en opinión del oncólogo médico responsable, ponga en peligro la salud de la paciente o su capacidad para completar el estudio o cualquier otra enfermedad que pueda empeorar con la QT o los posibles tratamientos de apoyo
5. Antecedentes de hipersensibilidad a los fármacos quimioterápicos o de reacciones alérgicas a alguno de sus componentes.
6. Pacientes gestantes.
7. Segunda neoplasia maligna primaria, a excepción de carcinoma *in situ* del cuello uterino o de un cáncer de piel no melanoma, tratado correctamente.

### **3.1.3. VARIABLES CLÍNICAS**

Los datos obtenidos de cada uno de los pacientes fueron registrados en una base de datos creada para ello (SPSS), partiendo de los datos obtenidos de las historias clínicas, en la que se incluyeron:

#### **3.1.3.1 Datos de filiación del paciente.**

### 3.1.3.2 *Datos clínicos:*

Entre las variables clínicas recogidas, se consensuó recopilar parámetros relativos a la edad y sexo en el grupo de tratamiento y en el de controles sanos así como otras variables clínicas en el grupo de pacientes con cáncer que podrían tener impacto en la respuesta al tratamiento oncológico como la existencia o no de hipertensión arterial previa.

Se recogieron también otras variables clínicas con impacto pronóstico y predictivo de respuesta como la localización de enfermedad metastásica, metástasis hepáticas exclusivas y enfermedad metastásica sincrónica o metacrónica

EDAD	NUMÉRICO
HTA PREVIA	SI/ NO
SEXO	M/F
FECHA DIAGNOSTICO CANCER COLORRECTAL	NUMÉRICO
TIEMPO DESDE DIAGNOSTICO HASTA ENFERMEDAD METASTASICA	<6MESES/ 6-12 MESES/>12 MESES
FECHA DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD METASTASICA	NUMÉRICO
TIPO DE ENFERMEDAD METASTASICA	SINCRÓNICA/ METACRÓNICA
LOCALIZACION DE ENFERMEDAD METASTASICA	HEPÁTICA/ PULMONAR/ PERITONEAL/ GANGLIONAR/ OTRAS
ENFERMEDAD METASTASICA HEPATICA EXCLUSIVA	SI / NO

**Tabla 11** Características de los pacientes I

### 3.1.3.3 *Datos del tumor:*

Los datos relativos al tumor fueron recogidos en la base de datos elaborada para el bloque de análisis clínico e histopatológico. Se recogió la localización del tumor primario como parámetro clínico que ha demostrado su papel pronóstico y predictivo de respuesta. Para el estadiaje de las pacientes, se utilizó el sistema TNM de la sexta edición del Cancer Staging Manual de la AJCC (American Joint Cancer

Committee). Se recogieron datos anatomopatológicos con valor pronóstico así como el perfil molecular de Ras y la presencia o no de inestabilidad de microsatélites determinada por IHQ.

LOCALIZACIÓN TUMOR PRIMARIO	DERECHO/ TRANVERSO-IZQUIERDO-RECTO
ESTADIO AL DIAGNÓSTICO	T1/ T2/T3/T4/ N0/N1/N2/N3/ MO/M1
Nº DE GANGLIOS AISLADOS AL DIAGNÓSTICO	<12/ >12
GRADO DE DIFERENCIACIÓN	GRADO1/ GRADO 2/ GRADO3
INVASIÓN VASCULAR	NO/SI
INVASIÓN LINFÁTICA	NO/SI
INVASIÓN PERINEURAL	NO/SI
OBSTRUCCIÓN AL DIAGNOSTICO	NO/ SI
PERFORACIÓN AL DIAGNOSTICO	NO/SI
RAS NATIVO	NO/SI/ND
MUTACION DE KRAS	NO/SI/ND
MUTACION DE NRAS	NO/ SI/ND
MUTACION DE BRAF	NO/SI/ ND
MSI	NO/SI

Tabla 12: Características de los pacientes II

#### 3.1.3.4 *Datos del tratamiento:*

En relación al tratamiento se recogieron los tratamientos locorregionales que recibieron los pacientes, fundamentalmente cirugía del tumor primario o de la enfermedad metastásica y tratamiento con radioterapia. En relación al tratamiento sistémico se recogió el uso o no de QT adyuvante y el esquema de QT para enfermedad avanzada en primera línea que incluía combinación de oxaliplatino y fluoropirimidinas con o sin bevacizumab, combinaciones de irinotecan y fluoropirimidinas con o sin bevacizumab, fluoropirimidinas en monoterapia u otros esquemas menos frecuentes. Se recogió también el número de líneas posteriores para la enfermedad avanzada

CIRUGÍA TUMOR PRIMARIO	NO/ SI
TRATAMIENTO QT ADYUVANTE	NO/SI
ESQUEMA DE TTO ADYUVANTE	FOLFOX/XELOX/ CAPECITABINA/ OTROS
RT ADYUVANTE	NO/SI
CIRUGÍA DE MSTÁSTASIS HEPÁTICAS	NO/SI
OTROS TTOS LOCALREGIONALES	RADIOFRECUENCIA/ QUMIOEMBOLIZACION/ OTROS
FECHA INICIO TTO PARA ENFERMEDAD METASTÁSICA	NUMÉRICO
ESQUEMA DE PRIMERA LÍNEA	FOLFOX/ XELOX/ FOLFOX+ B/ XELOX+B/ FOLFIRI/CPT11/ CAPECITABINA/OTROS
NÚMERO DE CICLOS	NUMÉRICO
NÚMERO DE LINEAS POSTERIORES	1/ 2/3 Ó MAS

**Tabla 13:** Características de los pacientes III

### 3.1.3.5 *Datos de respuesta:*

Los pacientes se clasificaron en repondedores o no a primera línea de tratamiento para enfermedad avanzada y se cuantificó la respuesta como respuesta completa, parcial o estabilización (según RECIST 2.0). Se analizó aquellos pacientes con respuesta precoz como parámetro de importancia pronóstica y se recogió la fecha de progresión para análisis posterior de supervivencia

<b>RESPONDEDORES</b>	<b>SI/NO</b>
<b>MEJOR RESPUESTA OBTENIDA</b>	<b>R COMPLETA</b>
	<b>RESPUESTA PARCIAL</b>
	<b>ESTABILIZACIÓN</b>
	<b>PROGRESIÓN</b>
<b>RESPUESTA PRECOZ (&lt;8 SEMANAS)</b>	<b>SI/NO</b>
<b>FECHA DE PROGRESIÓN A PRIMERA LÍNEA</b>	<b>NUMÉRICO</b>

**Tabla 14:** Características de los pacientes IV

### **3.1.3.6 Datos de toxicidad al tratamiento**

En relación a la toxicidad se recogió la hipertensión como toxicidad de clase asociada al tratamiento antiangiogénico y las principales toxicidades grado 3-4 asociadas a QT

<b>HIPERTENSION</b>	<b>SI/ NO</b>
<b>TOXICIDAD GRADO 3-4</b>	<b>DIARREA</b>
	<b>MUCOSITIS</b>
	<b>VOMITOS</b>
	<b>SMP</b>
	<b>NEUROTOXICIDAD</b>
	<b>NEUTROPENIA</b>
	<b>ANEMIA</b>
	<b>TROMBOPENIA</b>
	<b>OTROS</b>

**Tabla 15:** Características de los pacientes V

### **3.1.4. SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES**

Se realizó un seguimiento de todos los sujetos del estudio, tomando como fecha inicial, en el caso de los controles, la de la extracción, y en el de los enfermos, la del inicio del tratamiento. Como fecha de fin de estudio, se hizo coincidir la de las controles, con el final la de la última revisión de los enfermos, que en todos las pacientes fue, cuando menos, una en los 6 últimos meses anteriores al cierre de la base de datos para el estudio. Se objetivó que ninguno de los sujetos sanos había desarrollado ninguna enfermedad neoplásica, y en el caso de los pacientes que sufrieron una recaída, se tomó la fecha de ésta. Se recogió el estado de la enfermedad

al cierre del estudio y si el paciente se encontraba vivo o no: VIVO CON ENFERMEDAD Y VIVO SIN ENFERMEDAD, así como la fecha de exitus

### ***3.1.5. ASPECTOS ÉTICOS***

En ambos estudios, metabólica y RNA, todos los pacientes dieron su consentimiento informado para participar en el estudio. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España) y todas las investigaciones clínicas se realizaron de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki (“Principios éticos para la investigación médica en seres humanos”).

## **3.2. ESTUDIOS GÉNICOS**

### ***3.2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SÁNGRE***

Los pacientes con CCR fueron sometidos a una extracción de sangre (6ml) antes de recibir cualquier tratamiento oncológico para la enfermedad metastásica (quimioterapia +/- agentes dirigidos) en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, España). Las muestras de sangre completa fueron recolectadas en tubos Tempus Blood ARN (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA; CAT: 4342792).

### ***3.2.2. AISLAMIENTO DE ARN DE MUESTRAS DE SÁNGRE***

Para extraer el ARN de las células sanguíneas, las muestras de sangre completa recolectadas (6 ml) en tubos Tempus Blood ARN (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA; CAT: 4342792) se mezclaron vigorosamente (10 segundos) después de la recolección, se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h y se aisló el ARN mediante kit Tempus Spin RNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.; REF: 4378926) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

Por otra parte, para obtener el ARN circulante en suero, nuevas muestras de sangre periférica (8,5 ml) de pacientes con CCR en tubos BD Vacutainer SSTII (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) se dejaron coagular (30 min). La fracción de suero se obtuvo por centrifugación a 1400 g durante 10 min y luego se almacenó a -80°C hasta

su procesamiento. Para el aislamiento del ARN total, se concentraron 300  $\mu$ l de suero hasta un volumen de 200  $\mu$ l utilizando un concentrador de vacío (Vacufuge plus Vacuum Concentrator, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 4°C. El ARN total libre circulante se purificó mediante kit de suero/plasma miRNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de sangre total y suero de los controles sanos se recolectaron y procesaron de la misma forma. La concentración y calidad del ARN se determinaron mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) y un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), respectivamente. Solo se utilizaron muestras con RIN  $\geq$  9 para experimentos posteriores.

### **3.2.3. SÍNTESIS DE ADNc Y PCR DIGITAL**

El ARN total (150 ng) obtenido de células sanguíneas y de suero fue sometido a transcripción inversa en un volumen de 20  $\mu$ l mediante kit de síntesis de ADNc SuperScript™ VILO™ (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR digital se realizó con el sistema de PCR digital QuantStudio™ 3D (Life Technologies, CA, EE. UU.). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 18  $\mu$ l que contenía Quantstudio 3D Digital MasterMix v2 (9  $\mu$ l), TaqMan-FAM (0,6  $\mu$ l), TaqMan-VIC (0,6  $\mu$ l), agua libre de nucleasas (2,8  $\mu$ l) y 7,5 ng de ADNc molde (5  $\mu$ l). Las muestras (16  $\mu$ l) se cargaron en chips utilizando el cargador digital de chips QuantStudio 3D (Life Technologies, CA, EE. UU.). Los ciclos usados fueron: 96 °C/10 min, 20 ciclos a 59 °C/2 min y 98 °C/30 segundos, 25 ciclos a 57 °C/2 minutos y 98 °C/30 segundos. La elongación se hizo a 57 °C/7 minutos y luego a 10°C. Todas las muestras se procesaron por duplicado. Las sondas TaqMan (Life Technologies, CA, EE. UU.) utilizadas fueron GUCY2C (Hs00990120\_m1), MMP7 (Hs01042796\_m1), JAG1 (Hs01070032\_m1), PGF (Hs00182176\_m1) y PTGS2 (Hs0015313). El gen MTR (Hs01090026\_m1), cuya expresión se mostró de forma estable mediante qPCR, se seleccionó entre cinco genes endógenos comúnmente utilizados para la normalización de la expresión. Después del termociclado, se utilizaron el PCR digital QuantStudio™ 3D (Life Technologies, CA, EE. UU.) y el software QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ (Life Technologies, CA, EE. UU.) para recopilar y analizar datos de fluorescencia de punto final de cada chip según las

instrucciones del fabricante. A partir del análisis de los archivos “eds”, se obtuvo la concentración absoluta del gen diana por  $\mu\text{l}$  de ADN de entrada (copias /  $\mu\text{l}$ ) y luego se normalizó utilizando MTR. Finalmente, se calculó el  $\Delta\text{Ct}$  para cada muestra ( $\Delta\text{Ct} = \text{no. FAM} / \text{no. VIC}$ ).

### **3.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN ESTUDIOS GÉNICOS**

Los niveles de expresión génica entre los dos grupos se compararon mediante pruebas t de Student para datos no apareados (la corrección de Welch se aplicó para grupos de datos con variaciones desiguales) o las pruebas de pares emparejados de Mann-Whitney o Wilcoxon. Los valores atípicos se identificaron aplicando la prueba ROUT. Para establecer el punto de corte con la mejor capacidad predictiva para cada biomarcador (RNA) y también su combinación, se calculó el índice de Youden a partir de los valores de sensibilidad y especificidad de cada una de las coordenadas obtenidas en la curva ROC. Una vez establecido el punto de corte para cada biomarcador, se calcularon la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN), así como el área bajo la curva ROC (AUC). Se consideró un nivel de significancia de 0.05 para la prueba de hipótesis. Además, la relación entre cada biomarcador y la respuesta al tratamiento se analizó mediante la prueba de chi-cuadrado de Pearson o, en los casos en que no se cumplieron las condiciones de aplicabilidad, la prueba exacta de Fisher. Las curvas de supervivencia se estimaron con el método de Kaplan-Meier (intervalos de confianza (IC) del 95%) y las diferencias entre subgrupos se compararon mediante la prueba de rangos logarítmicos. Los datos se analizaron con el software IBM SPSS Statistics 19 y GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, EE. UU.).

## **3.3. ESTUDIOS DE METABOLÓMICA**

### **3.3.1. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA**

Los pacientes fueron sometidos a extracción de muestras de sangre (8,5 ml) en ayunas entre las 8 am y las 9 am, antes del inicio de cualquier tratamiento. Las muestras se recogieron en tubos vacutainer BD SSTII (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Después de la centrifugación durante 10 min a 2450 rpm, el sobrenadante se aspiró y

se almacenó inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis. Se minimizó la variación de los diferentes parámetros en cuanto a pacientes y muestreo (estado de ayuno, hora del día de muestreo, etc.) para obtener la máxima reproducibilidad en nuestro estudio.

### **3.3.2. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS**

Las muestras de suero se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante todo su análisis. Las proteínas se eliminaron usando acetonitrilo (AcN) (muestra 1:8/AcN) con agitación durante 2 min y posterior centrifugación a 15200 rpm durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se transfirió el sobrenadante a viales analíticos de HPLC y se evaporó en un evaporador GeneVac HT-8 (Savant, Holbrook, NY). Los residuos secos se reconstituyeron en AcN/agua [50:50] con ácido fórmico al 0,1% seguido de agitación durante 1 min.

### **3.3.3. ANÁLISIS DE METABOLITOS MEDIANTE LC-HRMS**

Las muestras de suero extraídas se analizaron utilizando un sistema LC Agilent 1290 acoplado a un espectrómetro de masas Q-TOF 5600 (AB SCIEX, Concord, ON) utilizando ionización por electropulverización en modo positivo. La separación cromatográfica se realizó con una columna de HPLC Atlantis T3 (C18: 2,1 mm x 150 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) (Waters Corporation, Milford, MA) mantenida a  $25^{\circ}\text{C}$ . Se inyectaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra para el análisis. La fase móvil era ácido fórmico al 0,1% -90:10 agua/AcN (eluyente A) y ácido fórmico al 0,1% -90: 10 AcN/agua (eluyente B). El gradiente de elución fue: 0,00–0,50 min 1% de eluyente B, 0,50–11,00 min 99% de eluyente B, 11,00–15,50 min 99% de eluyente B, 15,50–15,60 min 1% de eluyente B y 15,60–20,00 min 1% de eluyente B. El caudal fue de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . El Q-TOF 5600, proporcionó una selección masiva con alta resolución que fue combinada con la adquisición de información dependiente (IDA). Esto permitió la fragmentación de los ocho iones más intensos y la obtención simultánea de datos de HRMS y MS/MS de barrido completo. Los parámetros de la fuente de iones y las condiciones de IDA fueron: fuente de gas 1:50,00; fuente de gas 2: 50,00; gas de cortina: 45,00; temperatura: 500,00  $^{\circ}\text{C}$ ; Voltaje de pulverización de iones flotante: 4500,00; Masas TOF: Min = 80.0000 Da Max = 1600.0000 Da; tiempo de acumulación: 0,2500 seg, tiempo de acumulación IDA: 0,1000 seg.

Se realizó una calibración automáticamente de masa cada 10 inyecciones. Se analizaron muestras de solventes orgánicos (OS) y muestras de control de calidad (QC) durante la secuencia de ejecución. Las muestras de control de calidad se prepararon agrupando un volumen igual de todas las muestras de suero utilizadas en este estudio y se procesaron cada 10 inyecciones para evaluar la estabilidad y el rendimiento del sistema. Las muestras de OS se analizaron junto con las muestras de control de calidad para identificar cualquier impureza de los solventes orgánicos o del procedimiento de extracción y para descartar la contaminación por arrastre.

#### ***3.3.4. GENERACIÓN DE CONJUNTOS DE DATOS Y PRETRAMIENTO***

Se usó el software PeakView (versión 1.0 con el complemento Formula Finder versión 1.0, AB SCIEX, Concord, ON) para evaluar el tiempo de retención (RT) y la variabilidad de masa/carga (m/z) del experimento. Se utilizó el software MarkerView (versión 1.2.1, AB SCIEX, Concord, ON) para procesar datos de LC-HRMS, realizar detección de picos, alineación y filtrado de datos y determinar la relación m/z, RT y área de pico de iones para cada muestra. La extracción de datos se realizó mediante el algoritmo del programa en el rango de RT de 1-18 min, y el límite de intensidad máxima se estableció en 200 cps. La alineación de los picos se logró utilizando RT y tolerancias m/z de 0,10 min y 10 ppm, respectivamente. Un filtro por "presencia" fue utilizado con el objeto de retener sólo masas presentes en al menos 10 muestras. Finalmente, las señales de masa (expresadas diferencialmente por la SG) y las muestras de los estudios de caso (HC y CRC) se identificaron aplicando un procedimiento de filtrado adicional con cambio de veces ( $<1,5$ ) y prueba t ( $p > 0,05$ ). Este procedimiento eliminó el fondo y los contaminantes y conservó las verdaderas señales de masa biológica de los datos de LC-HRMS. Los siguientes pasos se llevaron a cabo utilizando el servidor web Metaboanalyst 3.0. Finalmente, el pretratamiento de datos consistió en la normalización utilizando sumas de área total, escala de centrado medio y transformación logarítmica para transformar la matriz de datos en una distribución de tipo más gaussiana.

### ***3.3.5. PRETRATAMIENTO DE DATOS, VALIDACIÓN ANALÍTICA Y DETECCIÓN DE VALORES ATÍPICOS***

La normalización de los datos se realizó utilizando sumas de área total, escala de centrado medio y transformación de log para transformar la matriz de datos en una distribución de tipo más gaussiano. Se evaluó la calidad del rendimiento del sistema analítico y se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para detectar posibles valores atípicos. Las muestras de CC se exhibieron en un gráfico de PCA para evaluar la estabilidad del sistema analítico. Las variables se eliminaron de la matriz de datos cuando su reproducibilidad fue inadecuada (desviación estándar relativa [RSD]> 30% en muestras de CC) o si se observó en <50% de las muestras de CC. Se probaron la bondad de ajuste (R<sup>2</sup>) y la bondad de predicción (Q<sup>2</sup>) del modelo. En paralelo, se identificó un valor atípico en CRC y cuatro en HC a partir de las elipses T<sub>2</sub> de Hotelling en el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) a pesar de los intentos de modificar el método de estandarización (datos no mostrados). La eliminación de valores atípicos no produjo un aumento en los valores de R<sup>2</sup> o Q<sup>2</sup>.

### ***3.3.6. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES***

Para la identificación de biomarcadores se utilizó el software PeakView (versión 1.0 con el complemento Formula Finder versión 1.0, AB SCIEX, Concord, ON) que permitió aproximarse a la fórmula elemental de compuestos seleccionados a partir de patrones precisos de masa, agrupamiento isotópico y fragmentación. A continuación, para precisar los compuestos, se realizaron consultas en las bases de datos Metlin, Human Metabolome Database, Lipid Maps, PubChem, ChemSpider y se buscaron patrones de fragmentación en las bases de datos espectrales como MassBank, NIST2014, con el objetivo de identificar la estructura de la fórmula molecular. La identificación final de los candidatos seleccionados se confirmó mediante su comparación con el patrón exacto de masa, RT y fragmentación obtenido a partir del estudio de los estándares analíticos auténticos.

### ***3.3.7. VALORACIÓN DE BIOMARCADORES***

El capacidad predictiva de los biomarcadores seleccionados se evaluó mediante análisis ROC univariados y multivariados ya sea individualmente o en combinación.

### ***3.3.8. ANALÍISIS ESTADÍSTICO EN ESTUDIOS DE METABOLOMICA***

La capacidad predictiva de las variables seleccionadas se evaluó calculando el área bajo la curva de característica operativa del receptor (ROC). Se realizaron análisis ROC univariados y multivariados para determinar el valor clínico de los biomarcadores tanto de forma individual como en combinación. Por otra parte, para determinar la correlación con el tiempo de supervivencia de los pacientes se utilizó la curva de Kaplan-Meier utilizando el software SPSS 19.0. Se utilizó la prueba t de Student para comparar entre los grupos HC y CRC, seguida de la aplicación de la corrección de la tasa de falso descubrimiento (FDR) de Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples para minimizar los falsos positivos. Un valor de p corregido por FDR de 0,05 se consideró el umbral de corte para la prueba t. A continuación, se realizó un análisis multivariado para identificar las variables que discriminaban entre el grupo, combinando PCA con PLS-DA. La selección de las características con mayor poder discriminatorio se basó en su importancia variable en la puntuación de proyección (VIP), que debía ser  $> 1$ , y en su cambio de pliegue, que debía ser  $< 0,6 \rightarrow 1,5$ .



# ***R****esultados*



#### 4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Los parámetros clínicos de los pacientes con CCRm que se incluyeron en el estudio de marcadores génicos se resumen en la Tabla 16. De los 64 pacientes que finalmente fueron estudiados, 35 eran hombres y 29 fueron mujeres. La edad media fue de 60,12 ± 11,16 años. Se utilizaron dos grupos de control, uno para el análisis en sangre total (n = 28; 14 (50%) hombres y 14 (50%) mujeres; edad media, 57,77 ± 5,48 años) y otro para el análisis de suero (n = 19; 14 (73,68%) hombres y 5 (26,32%) mujeres; edad media, 65,50 ± 6,83 años). El gen RAS mostró mutación en 33 (51,5%) pacientes y 32 (50%) pacientes presentaron metástasis en más de 1 órgano. En cuanto a la terapia, 21(32,9%) de los pacientes recibieron QT con tratamiento antiangiogénico mientras que 43 (67,1%) no recibieron ningún fármaco antiangiogénico.

Características	N (%)
N	64
Edad( años+/-SD)	60,12+/-11,16
Sexo( M/F)	35/29
<b>RAS</b>	
Mutado	33(51,5%)
WT	31(48,5%)
<b>BRAF</b>	
Mutado	<b>2(3,3%)</b>
WT	52(81,2%)
Nd	10(15,6%)
MSI	2(3,1%)
<b>ENFERMEDAD METASTÁSICA</b>	
Sincrónica	54(84,3%)
Metacrónica	10(15,6%)
<b>TIPO DE ENFERMEDAD METASTASICA</b>	
1 sólo órgano	32(50%)
>1 órgano	32(50%)
<b>LOCALIZACIÓN METÁSTASIS</b>	
Pulmón	16(25%)
Hígado	<b>40(62,5%)</b>
Peritoneo	15(23,4%)
Gálgliionar	1(15,6%)
Otros	5(7,8%)
<b>SÓLO METÁSTASIS HEPÁTICA</b>	18(28,1%)

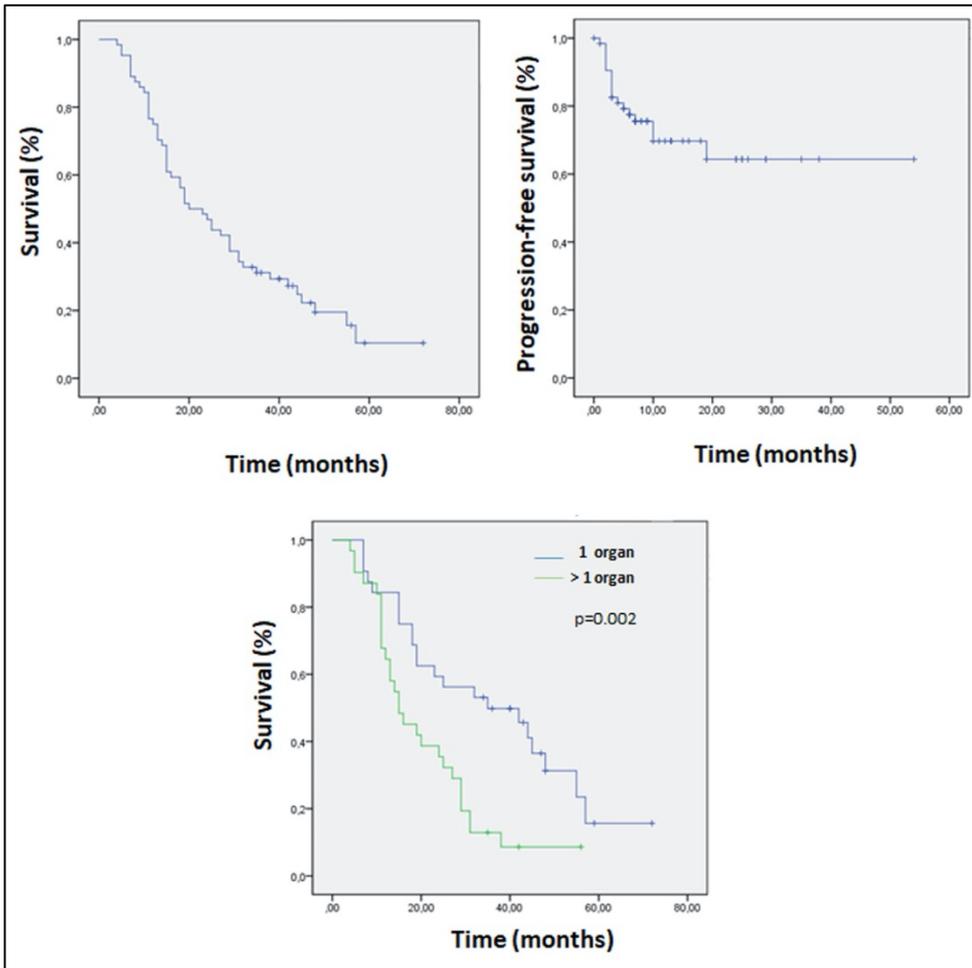
<b>TUMOR PRIMARIO</b>	
Derecho	13(20,4%)
Izquierdo	<b>51(79,6%)</b>
<b>TRATAMIENTO</b>	
QT exclusiva	43(67,1%)
QT + Antiangiogénico	21(32,9%)
<b>TIPO DE QT</b>	
FOLFOX/ XELOX	<b>49(76,5%)</b>
FOLFIRI	4(6,2%)
Capecitabina	5(7,8%)
Otros	68(9,5%)

**Tabla 16:** Características de los pacientes con CC

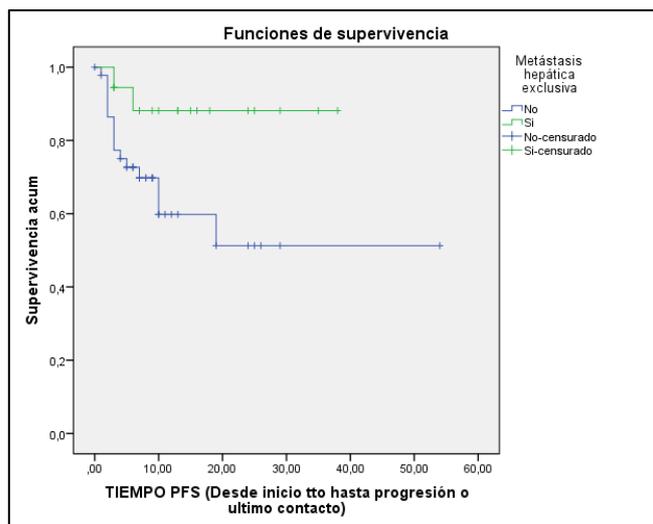
#### **4.2 CORRELACION DE SUPERVIVENCIA Y PARÁMETROS CLÍNICOS**

En nuestra población de estudio, las tasas de SG fueron del 95,3% a los 6 meses, del 75% al año y del 31,2% a los 3 años. Las probabilidades de SLP a los 6 meses, 1 año y 3 años fueron 77,5%, 69,7% y 64,4%, respectivamente. Solo se observó una relación significativa entre la SG y el tipo de metástasis. Concretamente, los pacientes con metástasis de un solo órgano tienen mayores tasas de supervivencia ( $p = 0,002$ ) (Figura 13).

Los pacientes con metástasis hepáticas exclusivas presentaron SG a 3 años de 49,4% vs 22,2% para el resto (diferencias no significativas), sin embargo si se observaron diferencias significativas en SLP a favor de los pacientes con metástasis hepáticas exclusivas ( 88,1% vs 51,3% de SLP a 3 años,  $p=0.04$ ) ( figura 14)



**Figura 13.** Supervivencia de pacientes con CCR metastásico. Supervivencia global general (A), supervivencia libre de progresión (B) y supervivencia global según tipo de metástasis (C).



**Figura 14:** Supervivencia libre de progresión de pacientes con metástasis hepáticas exclusivas

En relación al tratamiento recibido no se observaron diferencias significativas en la supervivencia ni en la tasa de respuestas/beneficio clínico entre pacientes que recibieron bevacizumab mas QT en primera línea vs QT exclusiva (beneficio clínico de 76,2% vs 74,4% respectivamente). De los pacientes que recibieron Bevacizumab, 17 tenían mutación RAS (81%), frente al 19% de los que recibieron solo Qt exclusiva

Respecto a la lateralidad, no hubo diferencias significativas en SG a 3 años ( 31,4 % lado izquierdo vs 30,8% lado derecho); la SLP a 3 ños fue numéricamente superior para el lado izquierdo aunque sin diferencias significativas (67,5% vs 52,7%: p=0,53)

Tampoco se onservaron diferencias significativas en supervivencia en relación al estado mutacional de RAS ( tabla 17)

	<b>Mutación RAS</b>	
	<b>NO</b>	<b>SI</b>
Supervivencia global 6 meses	96.8%	93.9%
Supervivencia global 1 año	77.4%	72.7%
Supervivencia global 2 años	51.6%	42.4%
Supervivencia global 3 años	35.5%	27.3%
	<b>Mutación RAS</b>	
	<b>NO</b>	<b>SI</b>
Supervivencia LP 6 meses	87.2%	68.3%
Supervivencia LP 1 año	76.3%	63.4%
Supervivencia LP 2 años	76.3%	54.4%
Supervivencia LP 3 años	76.3%	54.4%

**Tabla 17:** SG y SLP en función de las mutaciones de RAS

## **4.3 RESULTADOS DEL ANLLISIS ESTUDIO GENÓMICO**

### **4.3.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN PACIENTES CON CCR<sub>m</sub>**

Los estudios de las muestras de sangre de pacientes con CCR (n=59) se realizó mediante dPCR. Tres de los cinco biomarcadores candidatos asociados a la angiogénesis demostraron diferencias estadísticamente significativas de expresión entre los pacientes con CCR y los controles sanos (Figura 15). Se observó un

significativo aumento de la expresión de los genes JAG1 ( $p < 0,0001$ ), PTGS2 ( $p < 0,0001$ ) y GUCY2C ( $p = 0,0349$ ) en las células sanguíneas de pacientes con CCR en comparación con los controles (Figura 15, A-C). Por el contrario, aunque la expresión de MMP7 y PGF también fue mayor en los pacientes con CCR, esta no alcanzó significación estadística (Figura 15, D y E).

En base a estos resultados, seleccionamos los genes sobreexpresados (JAG1, PTGS2 y GUCY2C) en las células sanguíneas de pacientes con CCR para analizar la presencia de ARNm circulante. Como se muestra en la Figura 16, tres genes mostraron una clara sobreexpresión que fue estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) en el suero de los pacientes (Figura 16, A-C) en relación con los controles. Además, aunque PGF no se incrementó significativamente en las células sanguíneas de los pacientes con CCR, también se analizó, debido a su papel como un ligando proangiogénico alternativo al VEGF-A en la vía del VEGF. En este caso, PGF también mostró una clara sobreexpresión ( $p < 0,01$ ) en nuestro cohorte de pacientes (Figura 16, D).

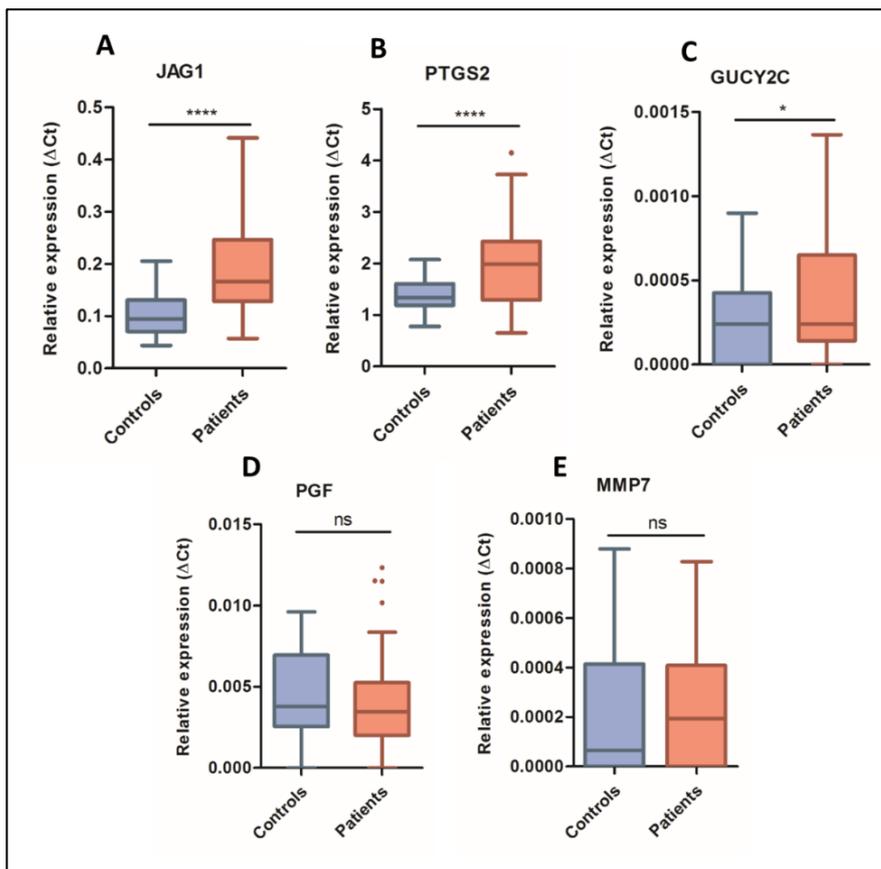
#### ***4.3.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN SANGRE Y SUERO DE PACIENTES CON CCR***

Para analizar las diferencias de los niveles de ARNm presentes en ambos tipos de muestras, se comparó la expresión de cada gen individual obtenido por dPCR en ambos fluidos en el grupo de pacientes con CCR. Nuestros resultados mostraron que los niveles de ARNm circulante en el suero de todos los genes eran significativamente mayores que en las células sanguíneas ( $p < 0,0001$ ; Figura 17), siendo GUCY2C y PGF especialmente bajos en sangre en comparación con las muestras de suero (Figura 17C y D). Este resultado revela que el suero es una fuente confiable de biomarcadores circulantes basados en ARNm.

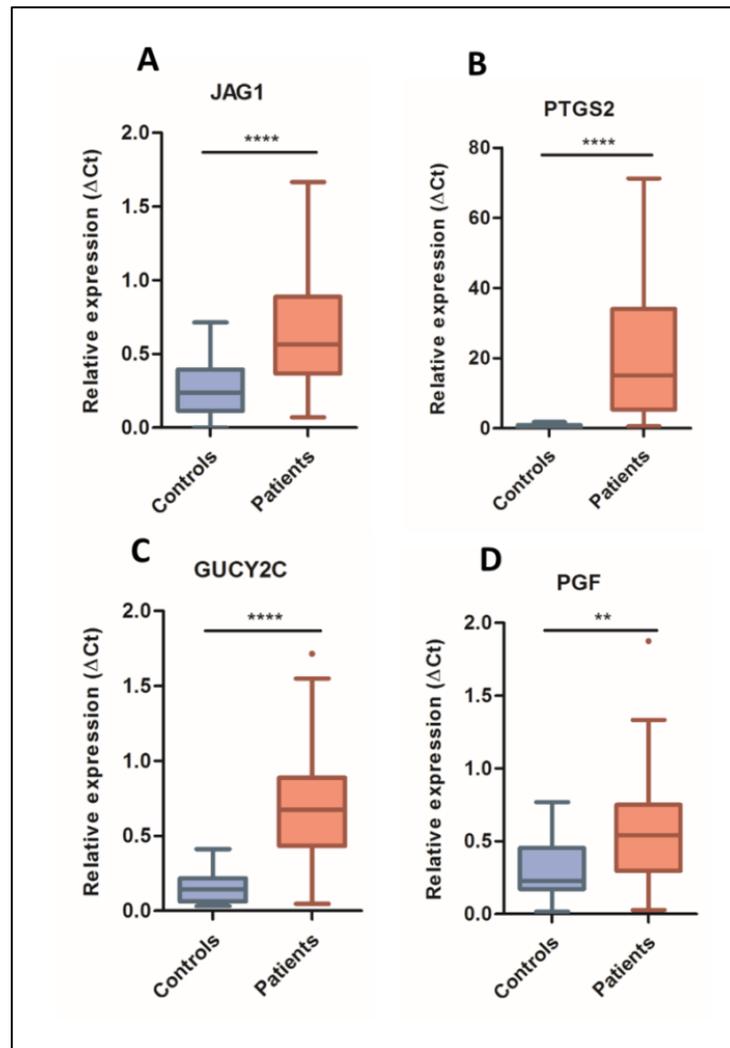
#### ***4.3.3. ESTUDIO DE CORRELACIÓN DE BIOMARCADORES SÉRICOS Y ANGIOGÉNESIS***

El análisis de la posible correlación entre los biomarcadores relacionados con eventos de angiogénesis que fueron analizados mostró un coeficiente de correlación bajo. Así, los niveles de ARNm de JAG1, GUCY2C y PTGS2 en suero mostraron correlaciones

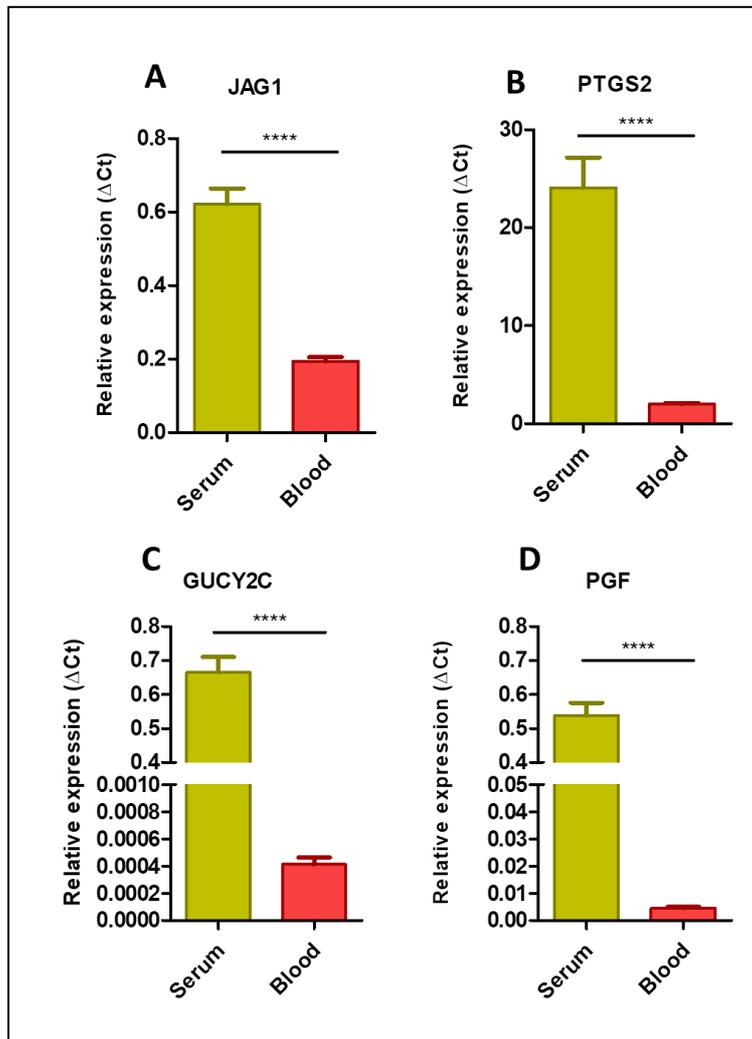
modestas o irrelevantes entre sí ( $r = 0.26-0.42$ ;  $p < 0.05$ ). Por otro lado, solo se detectó una correlación moderada entre la expresión de JAG1 y GUCY2C en los estudios con células sanguíneas ( $r = 0,55$ ;  $p < 0,0001$ ). Además, evaluamos posibles asociaciones para cada biomarcador individual en suero y células sanguíneas, pero no se encontraron correlaciones significativas en nuestra población de estudio, lo que sugiere que la sangre completa y el suero pueden considerarse fuentes de medición independientes.



**Figura 15.** Cuantificación relativa mediante PCR digital de los niveles de expresión génica en muestras de sangre total. Los niveles de expresión de los genes JAG1 (A), PTGS2 (B), GUCY2C (C), PGF (D) y MMP7 (E) se determinaron en muestras de sangre total de pacientes con CCR metastásico (rojo) y controles sanos (azul). normalizado mediante la expresión MTR y calculado por el método  $\Delta Ct$ . En los diagramas, las cajas muestran el rango intercuartil (IQR), los bigotes indican los valores  $Q1-1.5IQR$  y  $Q3 + 1.5IQR$ , las líneas internas indican medianas. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ ; (ns) no significativo.



**Figura 16.** Cuantificación relativa mediante PCR digital de los niveles de expresión génica en muestras de suero. Los niveles de expresión de los genes JAG1 (A), PTGS2 (B), GUCY2C (C) y PGF (C) se determinaron en suero de pacientes con CCR metastásico (rojo) y controles sanos (azul), normalizados por la expresión de MTR y calculados por el Método  $\Delta$ Ct. En los diagramas, las cajas muestran el rango intercuartil (IQR), los bigotes indican los valores  $Q1-1.5 \times IQR$  y  $Q3 + 1.5 \times IQR$ , las líneas internas indican medianas. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ ; (ns) no significativo.



**Figura 17.** Comparación de los niveles de expresión génica obtenidos por PCR digital en muestras de suero y células sanguíneas de pacientes con CCR metastásico. Los niveles de expresión de los genes JAG1 (A), PTGS2 (B), GUCY2C (C) y PGF (D) se normalizaron mediante la expresión de MTR y se calcularon mediante el método  $\Delta$ Ct (los datos representan la media  $\pm$  SEM). (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

#### 4.3.4. ESTUDIO DE CORRELACIÓN DE LOS BIOMARCADORES SÉRICOS EN COMBINACION

Dada la alta expresión de los genes JAG1, GUCY2C, PTGS2 y PGF en el CCR, realizamos un análisis de ROC y calculamos el AUC para investigar su capacidad individual para discriminar entre pacientes con CCR y sujetos sanos. También combinamos estos genes en diferentes paneles (firma génica) para examinar su

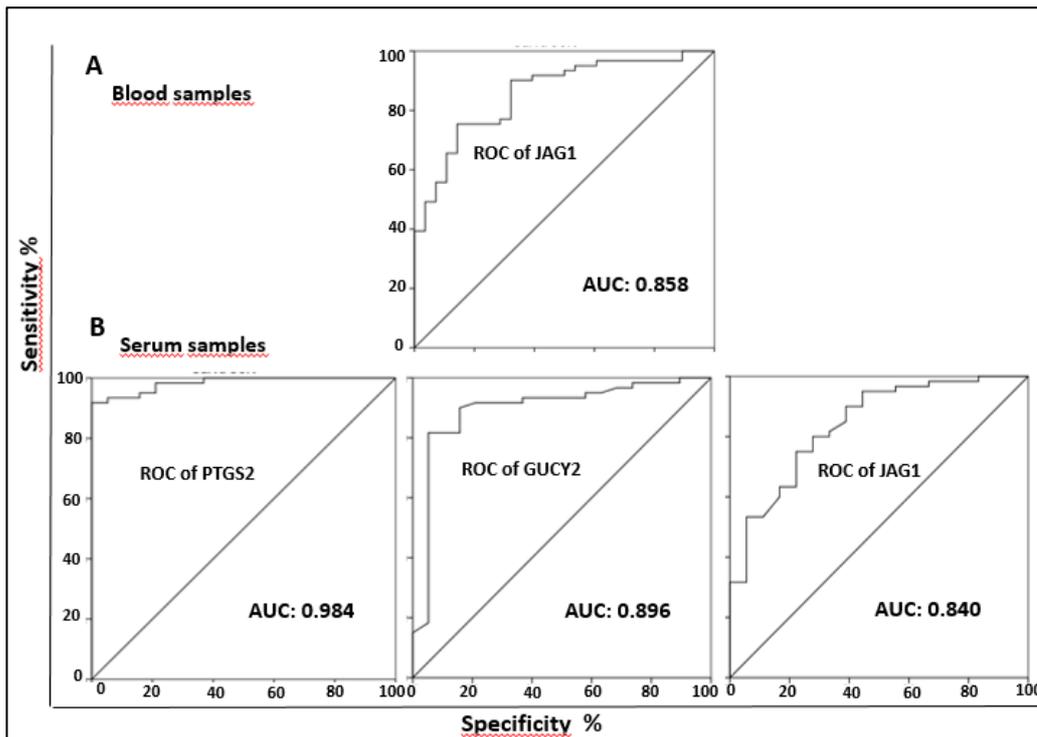
capacidad diagnóstica. En general, los resultados derivados de la sangre mostraron que JAG1 fue el biomarcador con el mejor rendimiento, con un valor de AUC de 0,858 (IC del 95%, 0,778-0,937) (Figura 18). El análisis de los demás genes no mostró una gran capacidad discriminatoria (AUC <0,80). Además, las diferentes combinaciones de los genes analizados en sangre no aportaron beneficios adicionales. Sorprendentemente, los análisis ROC del ARNm circulante en suero mostraron valores de AUC más altos que en las células sanguíneas para casi todos los biomarcadores individuales. Estos resultados fueron más notablemente en PTGS2 con un AUC de 0,984 (IC del 95%, 0,963-1,000) y GUCY2C con un AUC de 0,896 (95% CI, 0,803-0,988). En este tipo de muestras, JAG1 mostró un comportamiento similar al encontrado en sangre (AUC, 0,840, IC 95% 0,737-0,943).

En cuanto a las combinaciones, JAG1-GUCY2C y JAG1-PTGS2 mostraron un AUC de 0,819 (0,728-0,910) y 0,831 (0,743-0,743), respectivamente, que no mejoraron la capacidad discriminatoria de JAG1 solo. De igual forma, la combinación del gen PTGS2 con otros como GUCY2C y PFG (PTGS2-GUCY2C y PTGS2-PFG) mostró un valor de AUC de 0.879 (0.805-0.953) y 0.852 (0.772-0.933), respectivamente, por lo que esta asociación tampoco mejoró la capacidad discriminatoria de los biomarcadores individuales. Finalmente, solo el uso de tres biomarcadores (GUCY2C -PTGS2 y PFG) mostró un valor de AUC superior a 0,8 (0,802; IC 95%, 0,707-0,897) (Tabla 18).

	AUC	95% CI	PPV	NPV	Sensitivity (%)	Specificity (%)
<b>JAG1-GUCY2</b>	0.819	0.728-0.910	100	46,2	63,8	100
<b>JAG1-PTGS2</b>	0.831	0.743-0.918	100	47,4	66.1	100
<b>GUCY2-PTGS</b>	0.879	0.805-0.953	100	57,6	75.9	100
<b>PFG-PTGS2</b>	0.852	0.772-0.933	100	51,4	70.5	100
<b>GUCY2-PFG- PTGS2</b>	0.802	0.707-0.897	100	45,2	60.3	100

PPV, valor predictive positivo; NPV, valor predictive mnegativo

**Tabla 18.** Parámetros ROC para el diagnóstico de pacientes con CCR con metástasis utilizando combinaciones de biomarcadores séricos.



**Figura 18.** Análisis de las curvas ROC. El área bajo la curva ROC (AUC) con el 95% de los intervalos de confianza (IC) se obtuvo para evaluar la precisión diagnóstica de los ARNm circulantes (A) derivados de sangre individuales de JAG1 y los ARNm circulantes derivados de suero individuales de PTGS2, GUCY2 y JAG1.

#### ***4.3.5. CORRELACIÓN DE LOS BIOMARCADORES SÉRICOS Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO***

El análisis de biomarcadores para determinar su correlación con la respuesta al tratamiento mostró que solo la expresión de GUCY2C en el suero de los pacientes podía correlacionarse con la respuesta terapéutica utilizando el agente antiangiogénico. De hecho, el 76,9% de los pacientes con expresión alta de GUCY2C en suero tuvieron un mejor curso de la enfermedad, mientras que se observó progresión en solo el 20% de los pacientes con expresión alta de GUCY2C ( $p = 0,047$ ). Este resultado significativo también se observó para la combinación de GUCY2C-PTGS2 en el suero de pacientes tratados con agente antiangiogénico ( $p = 0,047$ ). Además, el suero de los pacientes tratados sin agentes antiangiogénicos mostró

una expresión baja de GUCY2C-PGF que fue estadísticamente significativa para predecir la respuesta al tratamiento ( $p = 0,043$ ).

#### ***4.3.6. CORRELACIÓN DE LOS BIOMARCADORES SÉRICOS CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD***

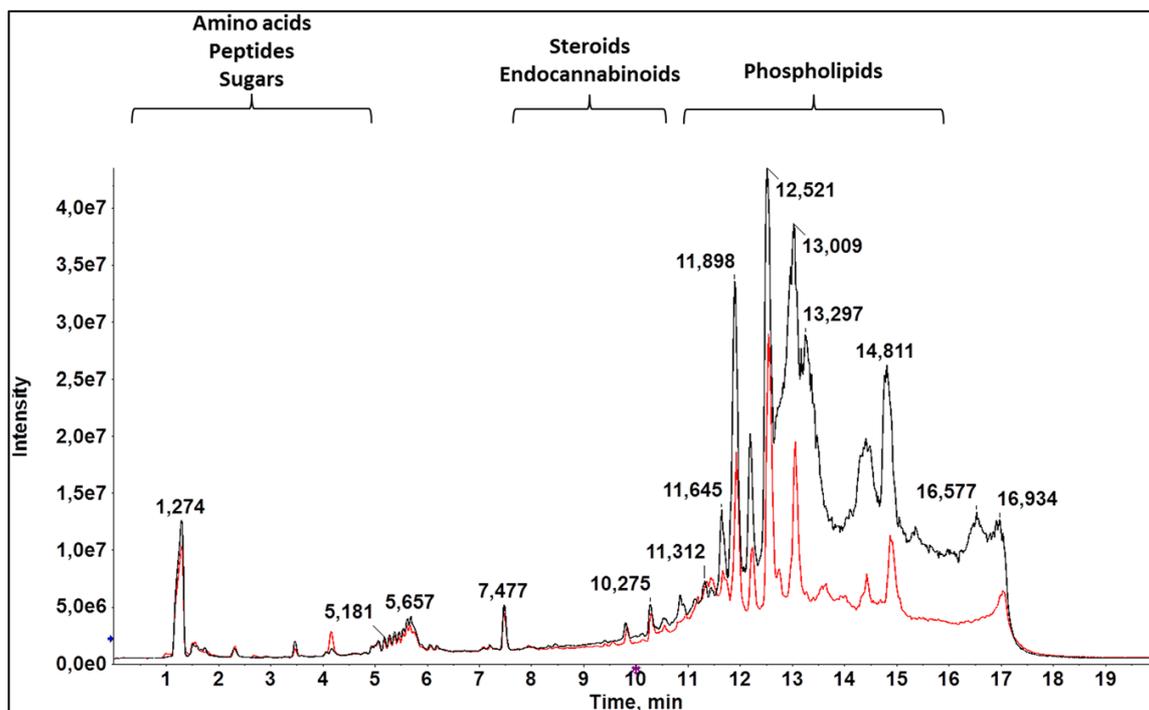
Tanto para la muerte como para la progresión de la enfermedad, todas las combinaciones de biomarcadores mostraron valores de especificidad razonables pero baja sensibilidad. El valor más notable fue la alta expresión sanguínea de JAG1 y PGF, con valores de sensibilidad y especificidad del 60% para predecir la progresión de la enfermedad.

No se observó correlación entre la expresión de los biomarcadores y la lateralidad del tumor primario.

### **4.4 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE METABOLÓMICA**

#### ***4.4.1. RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE LOS PACIENTES CON CCR MEDIANTE LC-HRMS.***

Para realizar este estudio se utilizó acetonitrilo para la extracción, ya que la desproteinización es un paso crítico en la metabolómica no dirigida, y se seleccionó el modo cromatográfico de fase inversa. Como se puede observar en la Figura 19, la comparación entre los cromatogramas de iones totales (TIC) de HC y los obtenidos de las muestras de CCR revelaron una clara separación entre i) metabolitos polares medios (por ejemplo, fosfolípidos, lisofosfolípidos y esteroides), eluidos entre los minutos 6 y 14, ii) metabolitos muy polares (por ejemplo, algunos aminoácidos y azúcares), eluidos en los primeros 5 minutos y que se separaron mejor usando una columna HILIC17 y iii) metabolitos no polares que eluyeron entre los minutos 14 y 17. De acuerdo con estos hallazgos, el proceso cromatográfico fue satisfactorio y se observó una diferencia significativa entre los TIC de HC y CRC entre los minutos 8 y 15.

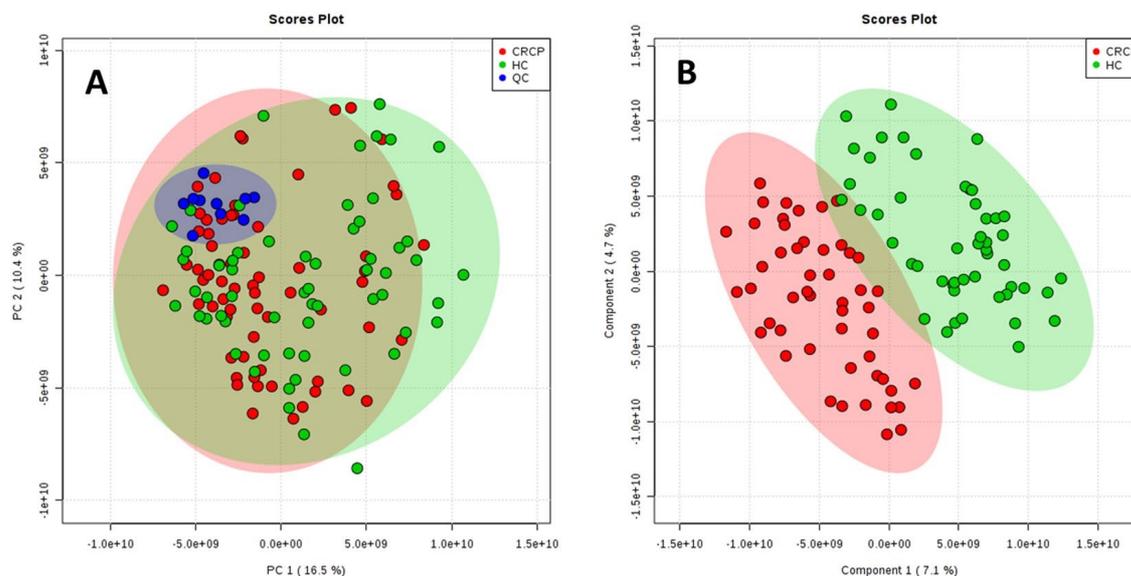


**Figura 19.** TIC LC-HRMS representativo de la muestra de suero de un control sano (HC: negro) y un paciente con CRC (CRC: rojo). Existe una clara separación entre metabolitos de polaridad media, como fosfolípidos, endocannabinoides o esteroides (6 a 14 min), metabolitos muy polares, incluidos algunos aminoácidos o azúcares (1-5 min) y metabolitos no polares. Se puede observar una diferencia significativa entre las TIC de HC y CRC en 8 a 15 minutos, momento en el que se eluyen la mayoría de los lípidos.

#### 4.4.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

Después de los procedimientos de alineación y filtrado necesarios, se obtuvo una matriz con 4301 metabolitos incluyendo 1868 picos monoisotópicos. Un estudio más profundo determinó que 1265 se expresaron diferencialmente en muestras de estudio (HC y CRC) y muestras de solvente orgánico. Después de la normalización, se excluyeron 99 por presentar una variabilidad inaceptable (desviación estándar relativa >30%) y se evaluaron 1166 variables en el PCA. Como se observó en el análisis por PCA (Figura 20A), existe una gran agrupación de las muestras del control de calidad, lo que indica que la separación observada entre CRC y HC fue debida esencialmente a factores biológicos. Además, la gráfica de puntuación PLS-DA (Figura 20B) sugirió una posible discriminación entre CRC y HC. En base a este hecho, se evaluó la capacidad predictiva del modelo PLS-DA para discriminar entre CRC y HC, adoptando los criterios de éxito de  $R^2 \geq 0,7$  y  $Q^2 \geq 0,4$ , sin variación >

0,2-0,321. Este modelo obtuvo un R2 de 0,74 y Q2 de 0,54, lo que demuestra su idoneidad para discriminar entre ambos tipos de muestras. De hecho, cinco variables cumplieron con los criterios establecidos para posibles biomarcadores de CCR metastásico ( $p < 0.05$ , VIP  $> 1$ , y cambio de veces  $> 1.5$ ) (Tabla 19).



**Figura 20.** Gráficos de puntuación 2D del PCA (A) y el PLS-DA (B) del grupo HC (verde) y el grupo CCR (rojo). La gráfica de puntuación de PCA reveló una agrupación cercana de muestras de control de calidad (QC) (azul). El gráfico de puntuación PLS-DA sugiere que es posible discriminar entre CRC y HC.

m/z	RT (min)	Fórmula molecular	Error masa (ppm)	p valor	FDR	CV*	VIP	AUC	Identificación
302.3042 <sup>a</sup>	10.12	C18H39NO2	0.5	4.00E-03	2.48E-02	1.81	1.01	0.61	Esfinganina
376.2571 <sup>a</sup>	10.89	C24H41NO2	4.2	4.00E-04	4.14E-03	10.68	2.25	0.77	Endocannabinoide
398.2424	10.90	C58H107NO22	1.2	7.00E-04	7.02E-03	6.63	1.86	0.73	Gal $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2) Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ - Cer(d18:1/16:0)
500.2724	11.56	C23H44NO7P	0.5	9.43E-10	3.05E-07	0.49	1.12	0.61	PE(18:2(9Z,12Z)/0:0)**
522.3451 <sup>a</sup>	11.61	C26H52NO7P	0.6	6.00E-08	2.60E-06	0.58	1.22	0.64	PC (18:1(9Z)/0:0)**

**Tabla 19.** Información detallada sobre los posibles biomarcadores del CCR metastásico

Se seleccionaron biomarcadores según la prueba t (corrección FDR;  $p < 0,05$ ), el cambio de veces (fold change) ( $< 0,6 \rightarrow 1,5$ ) y los resultados de VIP ( $> 1$ ). Su potencial como biomarcadores clínicos se evaluaron utilizando AUC. Se utilizó software PeakView para estimar fórmulas moleculares. Los patrones precisos de masa y MS / MS permitieron la identificación de la fórmula molecular. \* CV: Cambio de veces expresado como la relación de los dos promedios (HC/CRC). \*\* PE (18: 2 (9Z, 12Z) / 0: 0): 1- (9Z, 12Z-Octadecadienoil) -glicero-3-fosfoetanolamina; PC (18: 1 (9Z) / 0: 0): 1- (9Z) -Octadecenoil-sn-glicero-3-fosfocolina. <sup>a</sup> Confrmado con estándares de referencia

#### **4.4.3 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES POTENCIALES**

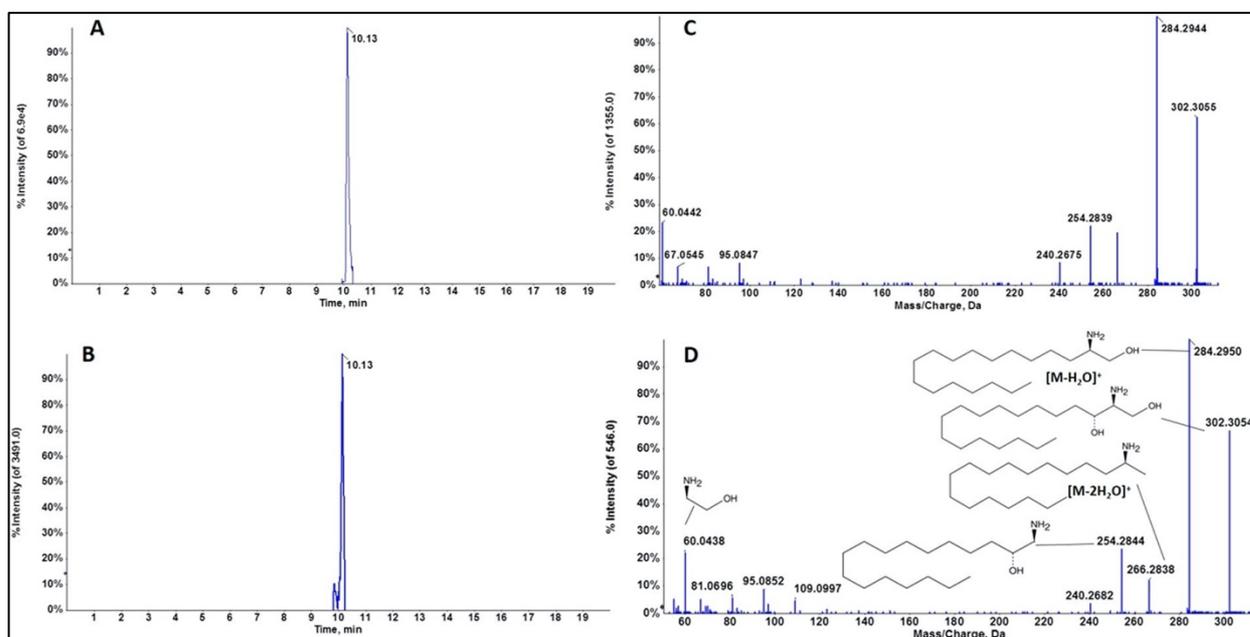
Las consultas realizadas para los valores de masa obtenidos en bases de datos compuestas de uso habitual (Metlin, NIST, LipidMaps y Human Metabolome Database) proporcionaron varias coincidencias estando siempre el error de masa por debajo de 5 ppm. La evaluación de la fórmula molecular a partir de la masa precisa y la agrupación isotópica proporcionó una identificación tentativa de cada biomarcador potencial (Tabla 19). Además, la interpretación del espectro de fragmentación experimental y las comparaciones en bases de datos espectrales permitieron reconocer los iones característicos de ciertos compuestos. De esta forma, se pudieron identificar cinco compuestos en tres clases de lípidos: esfingolípidos (esfinganina, Gal $\alpha$ 1-3 (Fuc $\alpha$ 1-2) Gal $\beta$ 1- 4Glc $\beta$ -Cer (d18: 1/16: 0)), endocannabinoides (docosatetraenoiletanolamida [DEA]) y glicerofosfolípidos (PE 18: 2 (9Z, 12Z) / 0: 0) y PC (18: 1 (9Z) / 0: 0)).

Para comprobar la identificación, se compararon los espectros de RT y MS / MS de los biomarcadores candidatos con sus correspondientes estándares comerciales en muestras biológicas en las mismas condiciones analíticas. La RT y el patrón de fragmentación fueron virtualmente idénticos entre el marcador y el estándar en los casos de esfinganina (Figura 21) y PC (18: 1) (Fig. 22), lo que confirma la identificación tentativa de estos metabolitos. Una leve diferencia fue observada entre la RT entre DEA y el estándar correspondiente, aunque los patrones de fragmentación fueron similares, lo que sugiere que este metabolito podría pertenecer a la familia de los endocannabinoides (Figura 23). Por último, la no existencia de estándares comerciales

de Gal $\alpha$ 1-3 (Fuc $\alpha$ 1-2) Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -Cer (d18: 1/16: 0) o PE (18: 2 (9Z, 12Z) / 0: 0 impidio su identificación definitiva.

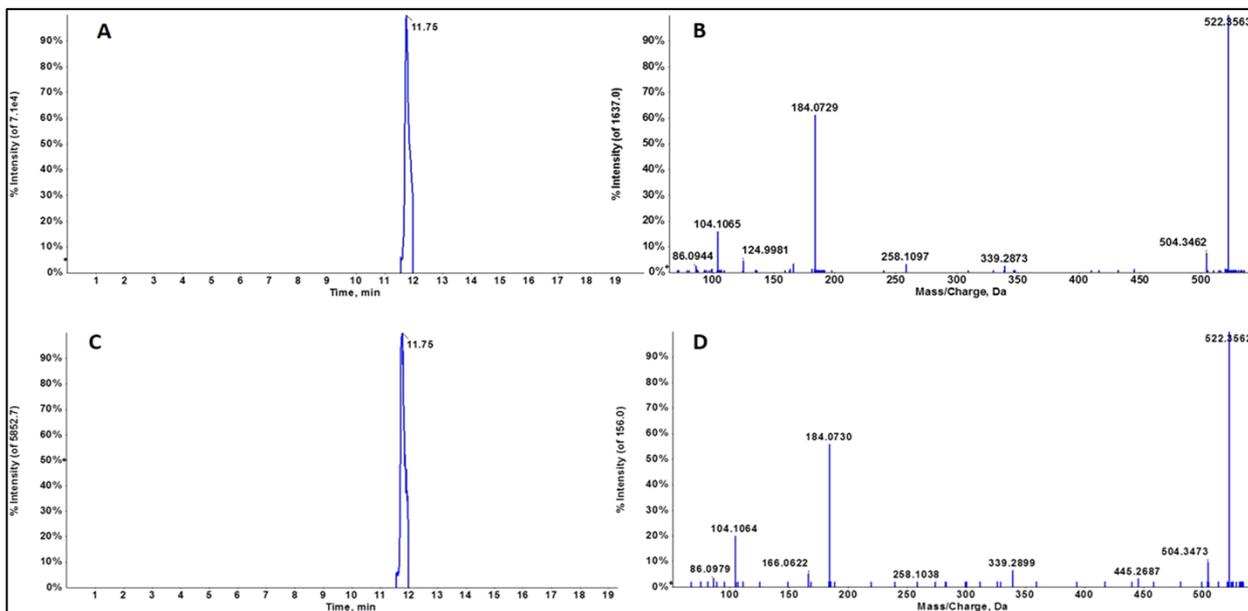
#### 4.4.4. EVALUACIÓN DE LOS BIOMARCADORES POTENCIALES

Las AUC obtenidas mediante los análisis ROC (Tabla 19) sugieren que los cinco metabolitos candidatos podrían servir como potenciales biomarcadores de CCR metastásico. Para determinar si varios metabolitos podían constituir una firma diagnóstica de esta patología, se llevaron a cabo estudios de combinación. Se utilizó un modelo multivariado para desarrollar un algoritmo más fiable. Para el modelo de metabolitos combinados propuesto (Fig.24A) se obtuvo una AUC de 0,857 (IC del 95%: 0,757-0,940) lo que indica su fuerte poder discriminativo y respalda el valor de estos metabolitos en el cribado de CCR. Así, la matriz de confusión desarrollada (Figura 24B) muestra como de las muestras de HC, 45 se clasificaron correctamente y 15 incorrectamente, mientras que de las muestras de CRC, 52 se clasificaron correctamente y 13 incorrectamente.

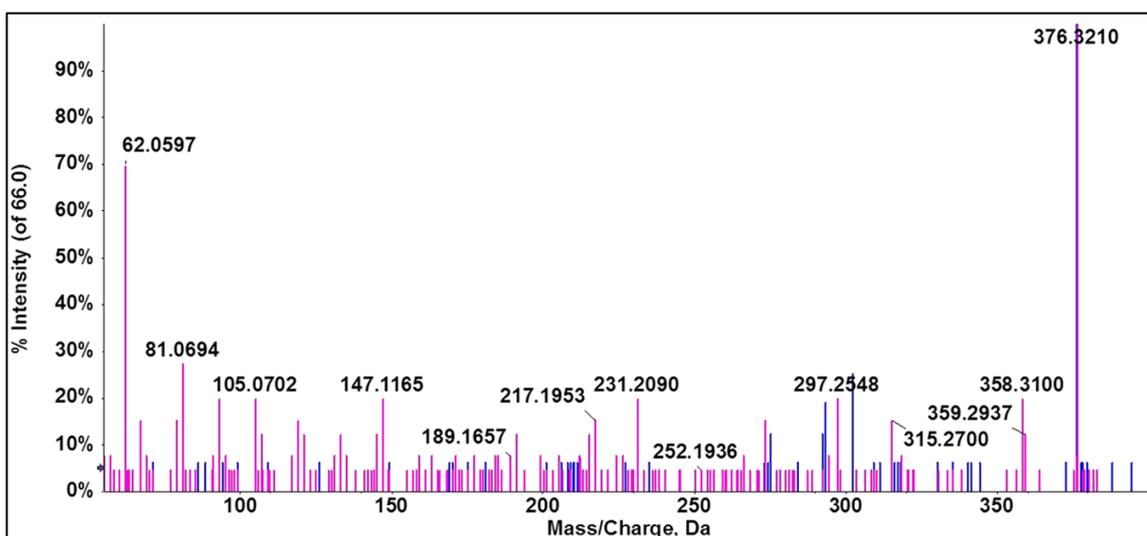


**Figura 21.** Cromatograma representativo de m/z 302.3042 en una muestra biológica (A) y estándar de esfinganina (B) a los 10,13 min. Espectros característicos de EM/EM de m / z 302.3042 en una muestra biológica (C) y esfinganina estándar a 10,13 min e interpretación de

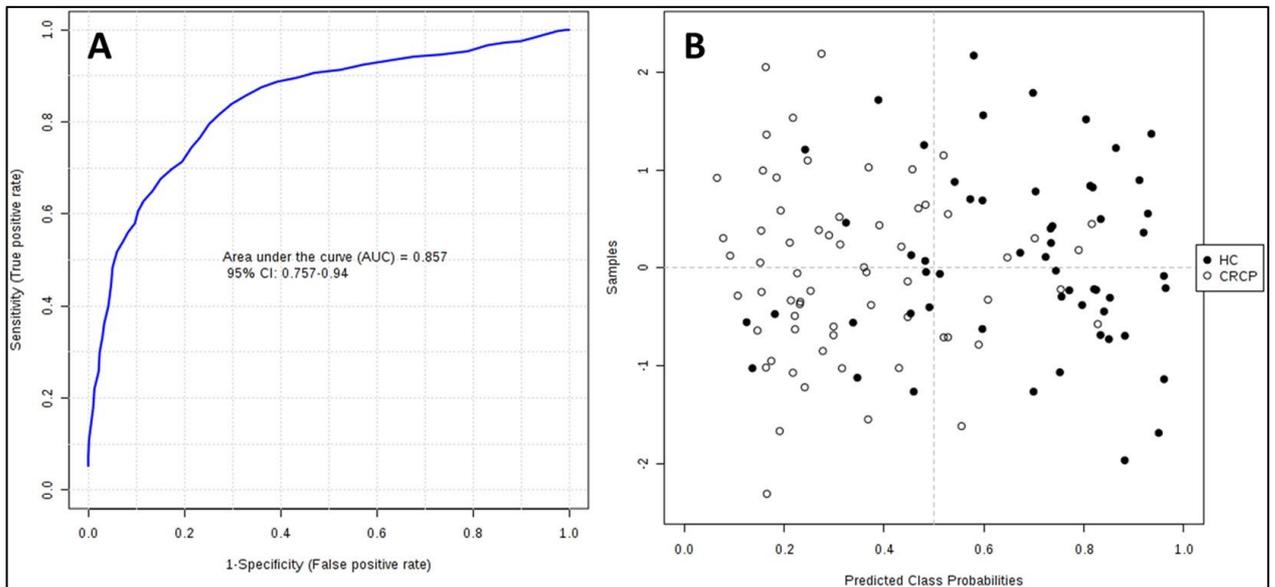
fragmentos (D). Los espectros MS/MS revelan el patrón de fragmentación característico de la esfinganina.



**Figura 22.** Cromatograma representativo de  $m/z$  522.3451 en una muestra biológica (A) y patrón de PC (18: 1) (B) a los 11,75min. Espectros característicos MS / MS de  $m / z$  522.3451 en una muestra biológica (C) y PC (18: 1 (9Z) / 0: 0) estándar (D) a 11,75 min. La interpretación de los fragmentos reveló iones característicos de fosfatidilcolinas, como  $m / z$  104 y 184.



**Figura 23.** Representación superpuesta de los espectros de fragmentación de  $m/z$  376.2571 en una muestra biológica (trazo azul) y una muestra estándar (trazo rosa).



**Figura 24.** (A) Representación gráfica de la curva COR de la combinación de los biomarcadores obtenidos. (B) Matriz de confusión correspondiente.



# *D* *iscusión*



En la actualidad, no disponemos de marcadores eficaces para predecir de forma temprana la recaída de CCR, con objeto de implementar el tratamiento más adecuado que mejore el pronóstico de estos pacientes. Hasta la fecha, los biomarcadores en biopsia tisular, se han utilizado ampliamente como factores pronósticos o predictivos de respuesta pero la limitación que representa la invasividad del procedimiento así como la demostrada baja especificidad de la mayoría de ellos, ha llevado a priorizar la búsqueda de nuevos marcadores más accesibles, detectables en sangre periférica u otros fluidos, para reducir la invasividad de la metodología y aumentar la capacidad de detectar la heterogeneidad dinámica de la mayoría de los tumores (Jamal-Hanjani y cols., 2015; Ma y cols., 2015; Quandt y cols., 2017). Así, recientemente, la detección de lncRNA o el ctDNA que circulan en sangre periférica, entre otros, se ha propuesto como marcadores mínimamente invasivos de CCR (Galamb, y cols., 2019). Por tanto, la búsqueda de marcadores en sangre periférica es una vía de investigación prometedora para la detección y seguimiento de los pacientes con cáncer en general (Cheung y cols., 2018), y para el CCR en particular, en donde ya hay indicios de su utilidad clínica tanto en la detección precoz (Bedin y cols., 2017; Cohe y cols., 2018; Phallen y cols., 2017), la recaída (Scholer y cols., 2016), el pronóstico (Maiertaler y cols., 2017), la respuesta al tratamiento (Barault y cols., 2018) e incluso la supervivencia (Tsukamoto y cols., 2017).

### **5.1 La angiogénesis y los factores relacionados como un fenómeno esencial en la progresión del CCR.**

La *angiogénesis* es un fenómeno decisivo en el desarrollo, la proliferación y la producción de metástasis en CCR. De hecho, entre los agentes más destacados para el tratamiento de este tumor se encuentran los antiangiogénicos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos y entre los que destaca bevacizumab, ramucirumab, aflibercept y regorafenib (Mody y cols., 2018). En concreto, bevacizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra VEGF, se ha convertido en tratamiento de primera línea para pacientes con CCRm en combinación con QT (Morano y cols., 2018; Van Cutsem y cols., 2016; Liu, y cols., 2018),

mejorando significativamente su tasa de respuesta y supervivencia (Ilic y cols., 2016; Pinto y cols., 2017). No obstante, los resultados obtenidos con estas terapias, especialmente en los estudios preclínicos, no se han trasladado del todo a la práctica clínica en donde, el desarrollo de resistencias primarias o adquiridas, entre otros factores, han hecho que los resultados no hayan sido del todo favorables (Hopirtean y cols., 2018; Hsu y cols., 2018; Itatani y cols., 2018). Esto indica la necesidad de seguir avanzando en el conocimiento del complejo mecanismo molecular que regula el proceso angiogénico, los factores que influyen sobre su desarrollo y lo modulan en el proceso tumoral y las posibles nuevas dianas terapéuticas que puedan surgir de dicho conocimiento.

Son diversos los genes que, a través de diferentes rutas, han sido implicados en el proceso de angiogénesis. Así, durante la progresión y metastatización del CCR, la expresión de determinados genes aumenta, lo que los ha llevado a ser testados como posibles biomarcadores especialmente para predecir el pronóstico y la respuesta a la terapia antiangiogénica (Angelucci y cols., 2018; Ding y cols., 2017). Entre estos genes se encuentran la angiopoyetina-2, CD73 soluble, el receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano, el factor de crecimiento de hepatocitos, la interleucina-6, el factor 1 derivado de células estromales y el factor de crecimiento endotelial vascular-D (VEGF-D), este último testado en relación al tratamiento antiangiogénico administrado a los pacientes con CCR. De hecho, se ha descubierto que una expresión baja de VEGF-D mejora la respuesta de bevacizumab en pacientes con CCR (Nixon, y cols., 2016; Weickhardt y cols., 2015). Sin embargo, la mayoría de estos estudios requerirán validación en cohortes más grandes de pacientes (Maida y cols., 2015).

En los últimos años una gran multitud de genes se han incorporado a la compleja red que parece regular el proceso de angiogénesis y, por tanto, a la posibilidad de ser testados como posibles marcadores. La interferencia entre VEGF y otras vías de señalización dentro de dicho proceso, ha dado lugar a estudios que llevan a analizar los factores esenciales en vías alternativas dependientes e independientes de VEGF (Akil y cols., 2021). En el contexto de la angiogénesis tumoral, las vías de señalización

VEGF y Notch parece demostrado que son esenciales. De hecho, el factor de crecimiento placentario (PGF), un ligando de la familia VEGF, induce la angiogénesis tanto de forma independiente como dependiente de VEGF (Haibe y cols., 2020). Curiosamente, el aumento de los niveles de PGF en tumores resistentes al tratamiento anti-VEGF sugiere un posible papel compensador de PGF en la inducción de la angiogénesis (Gacche y cols., 2020). Por otra parte, Jagged-1 (JAG1) es un ligando que activa la señalización de Notch que, según se ha informado, está sobreexpresado en diferentes cánceres, incluido el CCR. En estos tumores, Jagged-1 parece que promueve la progresión tumoral, la angiogénesis y la recurrencia (Sugiyama y cols., 2016; Xiu y cols., 2020).

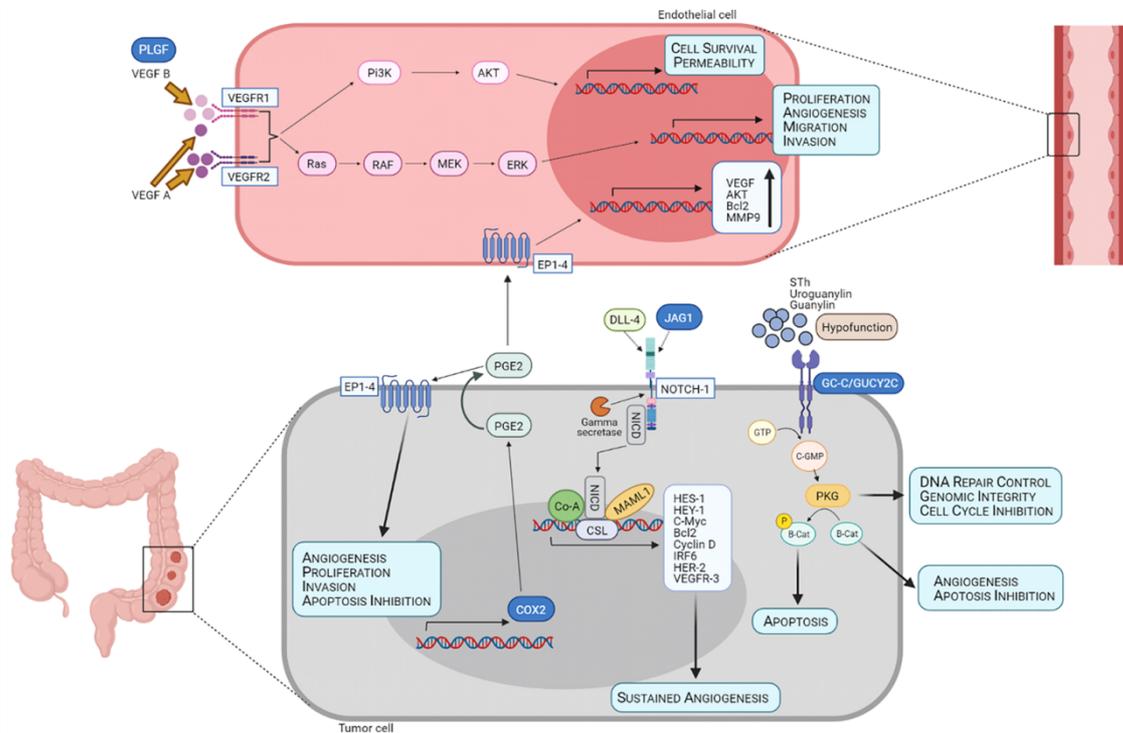
Por otra parte, se conoce desde hace mucho tiempo que guanilil ciclasa C (GUCY2C), un receptor miembro de la familia de las guanil ciclasas, desempeña un papel importante en la regulación de los niveles intracelulares de GMPc, la homeostasis de electrolitos y la proliferación celular en el intestino (Carrithers y cols., 1996). En relación a CCR, se ha observado que la desregulación de la señalización de cGMP implica una modulación de GUCY2C (Li y cols., 2007). Diferentes estudios han demostrado un vínculo entre el silenciamiento de GUCY2C y la disfunción intestinal, incluida la tumorigénesis (Pattison y cols., 2016). El papel de GUCY2C como supresor de tumores ha llevado a hipotetizar sobre la prevención del CCR mediante la terapia de reemplazo hormonal con análogos de hormonas sintéticas, como el ligando oral GUCY2C linaclotide (Linzess <sup>TM</sup>) (Lin y cols., 2016; Weinberg y cols., 2017). Además, la prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (PTGS2) (también conocida como COX2), una enzima inducible involucrada en la síntesis de prostaglandinas y que, por tanto, contribuye a la inflamación, angiogénesis, evasión inmune y resistencia a la terapia, también se ha investigado ampliamente en el contexto tumoral (Liu y cols., 2015). Su sobreexpresión se ha asociado con metástasis y mal pronóstico en pacientes con CCR (Wu y cols., 2015). De hecho, numerosas investigaciones básicas y clínicas parecen apuntar a que la inhibición de la síntesis de PGE2 por inhibidores específicos de la COX-2 (i.e. fármacos antiinflamatorios no esteroideos) podría disminuir el riesgo de varios tipos de cáncer, incluido el CCR (Sheng y cols., 2020). Por lo tanto, debemos esforzarnos por elaborar un protocolo para el uso exitoso de inhibidores de

COX-2 en aplicaciones clínicas para cánceres colorrectales y otros tipos de cáncer. Finalmente, la metaloproteinasa de matriz-7 (MMP7), un miembro de la familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc, degrada la matriz extracelular favoreciendo la invasión tumoral, metástasis y angiogénesis mediante la liberación de VEGF unido a la matriz (Li y cols., 2006). Los niveles elevados de esta enzima también se han relacionado con un mal pronóstico en el CCR avanzado (Maurel y cols., 2007). Recientemente, estudios basados en microarrays de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO), han corroborado la relación entre la alta expresión de MMP7 y la carcinogénesis, invasión o recurrencia del CCR (Chen y cols., 2021). Dado el complejo mapa de alteraciones genéticas que pueden subyacer a los mecanismos angiogénicos, nuestro trabajo se centró en un grupo de genes implicados fuertemente y relevantes en el proceso angiogénico como fueron *PGF*, *JAG1*, *PTGS2*, *GUCY2C* y *MMP7*.

## **5.2 Modulación de la expresión de genes relacionados con la angiogénesis en CCRm.**

La expresión de los genes *PGF*, *JAG1*, *PTGS2*, *GUCY2C* y *MMP7* fue determinada en sangre y suero de pacientes con CCRm. En general, podemos decir que el comportamiento de estos genes como marcadores de enfermedad fue mejor en suero que en sangre. Así, tres genes, *JAG1*, *PTGS2* y *GUCY2C*, mostraron una expresión diferencial estadísticamente significativa en las células sanguíneas de los pacientes con CCR en comparación con los controles sanos. Sin embargo, los niveles séricos de ARNm de *JAG1*, *PTGS2* y *GUCY2C* mostraron mayores diferencias entre los pacientes con CCR y los controles sanos que los detectados en las células sanguíneas, lo que indica que la utilización del suero puede representar una ventaja importante a la hora de su utilidad en la práctica clínica. Curiosamente, en el caso de *PGF* se detectó una sobreexpresión en suero de pacientes con CCR que no pudo ser detectada en su sangre. Todos estos resultados previos, soportan la hipótesis de que la sobreactivación de la angiogénesis en la enfermedad del CCRm (Giampieri y cols., 2020) conduce a una clara progresión de la enfermedad que puede estar mediada por la modulación, no de uno, sino de varios factores proangiogénicos que son regulados positivamente. Estos factores pueden detectarse como ARNm circulante y por tanto

abre la posibilidad para su uso como marcadores efectivos de la enfermedad (Figura 25).



**Figura 25.** Esquema representativo del papel de JAG1, PTGS2, GUCY2C y PLGF en la angiogénesis tumoral. PLGF (también denominado PGF) puede promover la angiogénesis en las células endoteliales vasculares al unirse al receptor de VEGF (VEGFR1), aumentando así la disponibilidad de VEGF A para la activación de VEGFR2. Esta molécula exhibe una mayor actividad quínasa para inducir la señalización que promueve la angiogénesis y otros procesos que favorecen el crecimiento tumoral. La vía Notch se activa mediante la unión de JAG1, entre otros ligandos, al receptor en la superficie de la célula tumoral, liberando el dominio intracelular de la membrana que se transloca al núcleo, donde forma un complejo para inducir la transcripción de varios genes diana. Estos genes diana favorecen la angiogénesis sostenida durante el desarrollo tumoral. La transcripción de PTGS2 (también denominado COX2) induce la producción de prostaglandina E2 (PGE2) por las células tumorales, que pueden actuar de forma paracrina uniéndose a los receptores de prostaglandinas (EP1, EP2, EP3 o EP4) en la célula endotelial (provoca proliferación y angiogénesis) o de forma autocrina (aumenta la angiogénesis y la promoción de tumores). En el CCR, el gen supresor de tumores GUCY2C (también denominado GC-C) se sobrexpresta pero también puede mantenerse en un estado hipoactivado debido a la falta de ligandos. Su alteración modula la apoptosis y angiogénesis.

### 5.3 Biomarcadores en sangre periférica para CCRm: comparación de resultados

Son muchos los biomarcadores que han sido ensayados en CCR para determinar su capacidad predictiva, pronóstica o de respuesta al tratamiento incluyendo moléculas ADN, ARN, proteínas, compuestos orgánicos volátiles, metabolitos y bacterias fecales. Las determinaciones han sido realizadas en diferente medios o fluidos, pero

es de gran relevancia que la determinación pueda ser llevada a una práctica clínica de uso habitual. En este contexto y siguiendo un concepto amplio, la "biopsia líquida" se está convirtiendo en una metodología esencial para el desarrollo de nuevos marcadores (Yamada y cols., 2019). El ARN en sangre o suero ha mostrado un buen rendimiento diagnóstico y una alta sensibilidad para distinguir las diferentes etapas de la enfermedad. Así, en cáncer de ovario, estudios recientes llevados a cabo mediante RT-qPCR y dPCR de las moléculas MACC1 y S100A4 en suero (proteína asociada a metástasis en CCR y proteína de unión a calcio S100 A4, respectivamente) han conseguido demostrar su correlación con el diagnóstico, la SLP y la SG de este tumor (Link y cols., 2029). En lo que concierne al CCR, la qPCR del ARNm de la proteína oncofetal HMGA2 sérica se pudo correlacionar significativamente con la enfermedad habiendo sido propuesta como un nuevo marcador diagnóstico (Sahengbieke y cols., 2018). Otros estudios previos han demostrado que los niveles séricos de ARNm de SALL4 en pacientes con CCR se correlacionaron significativamente con el grado de invasión y diferenciación tumoral con alta sensibilidad y especificidad (96% y 95%, respectivamente) (Ardalan y cols., 2015). De manera similar, el ARNm de la proteína de membrana de tetraspanina 8 (TSPAN8) en sangre total de pacientes con CCR mostró una sensibilidad (83,6%) y una especificidad (58,2%) (AUC 0,751) notables pudiendo diferenciar pacientes de donantes sanos (Rodia y cols., 2016). Esta proteína, que entre otras funciones promueve la angiogénesis, se ha propuesto recientemente como un objetivo potencial para la radioinmunoterapia de CCR (Maisonial-Besset y cols., 2017).

En nuestro caso, como se ha comentado, los mejores resultados fueron obtenidos con las muestras de suero de los pacientes con CCR. No obstante, es cierto que la presencia de JAG1 en sangre mostró una notable capacidad discriminadora (AUC 0,858) entre sujetos enfermos y sanos. Sin embargo, el rendimiento de la determinación de factores angiogénicos en suero fue mucho mayor. Así, la determinación de PTGS2, GUCY2C y JAG1 mostraron valores de capacidad discriminadora notables. Encontramos particularmente relevante los estudios con PTGS2 que mostró una AUC de 0,984 y los realizados con GUCY2C con los que se obtuvo una AUC de 0,896. Pocos estudios similares a este han sido realizados hasta

la fecha. Hasta donde sabemos, la alta expresión de PTGS2 en el tejido tumoral del CCR fue correlacionada con un aumento de la mortalidad (Ogino y cols., 2008). De hecho, recientemente, la sobreexpresión de PTGS2 en tejido tumoral de 30 pacientes con CCR, determinada mediante un inmunohistoquímica y qPCR, se asoció estrechamente con los datos clínico-patológicos de los pacientes, mostrando además una expresión más pronunciada en hombres que en mujeres (Negi, y cols., 2019). Además, la expresión tisular de PTGS2 parece estar asociada a una mayor mortalidad en tumores con mutación BRAF, lo que respaldaría las funciones interactivas de la expresión de PTGS2 y los estados de mutación BRAF en el pronóstico de pacientes con CCR (Kosumi y cols., 2019)

Por otro lado, el gran estudio prospectivo multicéntrico ciego realizado por Waldman y cols. (2009), que incluyó a 257 pacientes, demostró que la determinación del ARNm de GUCY2C en suero se correlacionaba con la presencia de metástasis en pacientes en estadio TNM II. Un importante estudio llevado a cabo por Wilson y cols. (2014) determinando el ARNm (y la proteína) de GUCY2C en tejido tumoral y epitelios normales de pacientes con CCR mediante RT-PCR (e inmunohistoquímica) determinó una reducción de 100 a 1000 veces de su expresión en el 85% de los tumores en comparación con la mucosa adyacente normal. Este hecho sugiere que el CCR podría iniciarse a través de la pérdida de la expresión de GUCY2C y alterando los mecanismos homeostáticos que regulan las células del epitelio colorrectal. Recientemente, el perfil de expresión de ARNm de GUCY2C en tejido ha ayudado a estadificar los tumores primarios de CCR y detectar metástasis ocultas (Aka y cols., 2017).

Por último, nuestros resultados muestran como JAG1 fue el único biomarcador que dio resultados positivos en sangre y suero. Así, la determinación del ARNm de JAG1 en ambas muestras, sangre y suero de CCR, arrojó resultados similares (AUC de 0,858 y 0,840, respectivamente) en comparación con los controles. Este interesante marcador, ya conocido por su estrecha relación con la regulación de la angiogénesis, ejerce importantes funciones pro-oncogénicas (Li y cols., 2014). De hecho, los anticuerpos anti-JAG1 se han propuesto como una terapia avanzada para pacientes

con cáncer con una alta expresión tisular de JAG1 (Lopez-Arribillaga y cols., 2019). En una cohorte de 158 pacientes con CCR y mediante detección inmunohistoquímica, Sugiyama y cols. (2016) llegaron a demostrar que los niveles altos de expresión de JAG1 se asociaban a un mal pronóstico a través de la promoción de la transición epitelial a mesenquimal y la proliferación celular. Además, la expresión de ARNm de JAG1 analizada en tejido tumoral de 20 pacientes con carcinoma de células escamosas (SCC), demostró que el aumento de su transcripción se correlacionó significativamente con una deficiente supervivencia general (Chang y cols., 2016). Todavía queda por dilucidar numerosos aspectos las conexiones de Notch con otras vías en la progresión del CCR. Sin embargo, un estudio reciente en las primeras etapas de la carcinogénesis de colon asociada a la inflamación demostró un aumento de la expresión del receptor Notch1/Notch2 y del ligando Jagged (Afaloniati y cols., 2020).

#### **5.4 Asociación de biomarcadores génicos en la detección del CCR metastásico:**

La posibilidad de *combinar biomarcadores de ARNm* para mejorar el rendimiento en el diagnóstico de CCR ha sido ensayada utilizando diferentes marcadores. Así, estudios en sangre de pacientes con CCR en los que se asociaron siete ARNm (anexina A3, familia de dominios de lectina tipo C 4 (miembro D), lamina B1, gla rico en prolina, factor de necrosis tumoral, receptor beta de vanina 1 e interleucina 2) fueron utilizados por Rodia y cols (2016) para detectar pacientes con CCR, aunque no con resultados muy favorables. Previamente Marshall y cols. (2010), realizaron un estudio con un panel de biomarcadores de ARNm (TSPAN8, lectina galactósida de unión (cadena alfa 2 soluble 4 y colágeno tipo I), obteniendo una especificidad/sensibilidad del 67,16/92,54%, en la detección del CCR. Curiosamente, la reciente inclusión del gen CEACAM (molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno 6) en este panel de biomarcadores ha mejorado notablemente el rendimiento, obteniéndose un AUC de 0,88 y del 0,91 en diferentes grupos de pacientes (Rodia y cols., 2018). Sorprendentemente, las diferentes combinaciones ensayadas con nuestros biomarcadores tanto en suero como en sangre no proporcionaron ningún beneficio adicional en cuanto a su capacidad discriminativa. La falta de correlación entre cada biomarcador individual en el suero y las células sanguíneas en nuestra población de

estudio apoya la idea de que la sangre completa y el suero pueden considerarse fuentes de medición independientes. Además, el resultado negativo al combinar nuestros biomarcadores para mejorar su valor predictivo apoya la idea reciente que sugiere que se deben configurar paneles con biomarcadores no correlacionados para intentar obtener la máxima información sobre los pacientes (Kim y cols. 2021).

### **5.5 Biomarcadores génicos en CCR metastásico: correlaciones clínicas**

La determinación de los diferentes biomarcadores en CCR fue analizada con el objeto de establecer posible correlaciones con parámetros clínicos de interés que pudieran ser aplicados en la práctica clínica. Previamente, estudios *in vitro* mostraron que el silenciamiento de JAG1 es capaz de reducir la capacidad de invasión de las células de CRC, su tasa de crecimiento y la expresión de algunos marcadores de metástasis como MMP-2 y MMP-9 (Dai y cols., 2014). Por el contrario, los pocos estudios *in vivo* llevados a cabo sobre este marcador parecen indicar que una alta expresión de JAG1 se correlaciona con una escasa supervivencia en los pacientes con CCR (Arcaroli y cols., 2016). Además, el aumento del número de copias del gen Notch (ligando de Jagged-1) parece ser un factor de pronóstico negativo para la supervivencia y se ha asociado con un pronóstico desfavorable después de la cirugía de CCR (Sugiyama y cols., 2016). En nuestro caso, el estudio de la relación entre biomarcadores y parámetros clínicos en pacientes con CCR mostró que solo la determinación de JAG1-PGF en sangre mostró valores significativos para predecir la progresión de la enfermedad.

En cuanto a la predicción de la respuesta al tratamiento, la expresión del gen GUCY2C en suero fue el que arrojó los mejores resultados como biomarcador, siendo útil para predecir dicha respuesta tanto en los tratados con antiangiogénicos como en aquellos tratados sin antiangiogénicos. Este mismo enfoque también ha sido estudiado por Giampieri y cols. (2020) en un análisis prospectivo usando terapia con antiangiogénicos como de primera línea de tratamiento. Estos autores propusieron el aumento temprano de los niveles circulantes de FGF-2 como un biomarcador para los pacientes con más probabilidades de beneficiarse de este tipo de tratamiento. El aumento de los niveles séricos de sTRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado

con TNF soluble en suero) también ha sido propuesto en CCR como un biomarcador para evaluar precozmente la respuesta de pacientes tratados con agentes antiangiogénicos (Bisgin y cols., 2012).

Finalmente, nuestro estudio refleja una supervivencia más larga en pacientes CCR metastásicos cuando la metástasis estaba presente en un solo órgano, lo que concuerda con estudios previos que informaron que los pacientes con un solo sitio metastásico tenían un mejor pronóstico que los pacientes con afectación de múltiples órganos (Luo y cols., 2018).

## **5.6 Metabolitos como marcadores en CCR**

El conocimiento cada vez más profundo de la etiopatogenia del CCR y de cómo las modulaciones genéticas y epigenéticas que acontecen en el tumor son esenciales para su progresión, están arrojando luz sobre el complejo fenómeno de reprogramación metabólica celular que es necesario para soportar una proliferación celular continua. Esta reprogramación es la base de las modificaciones metabólicas que acontecen en los pacientes y que provocan la aparición, aumento o descenso de ciertos metabolitos en diferentes fluidos biológicos que pueden ser usados como biomarcadores (Hanahan y cols., 2011). De hecho, es conocida la alteración en la actividad de ciertas enzimas cuando, por ejemplo, genes como RAS, PTEN, p53, HIF, se ven afectados por mutaciones. La modulación de la actividad de estos y otros genes provoca una cadena de eventos metabólicos que puede afectar el flujo glucolítico, las fuentes de ATP, el ciclo de Krebs y el metabolismo de los lípidos (Armitage y cols., 2017). Precisamente y en relación al metabolismo de los lípidos, hay notables evidencias que lo relaciona con la presencia de un CRC (Shen y cols., 2017). Estos resultados, entre otros muchos, soportan la hipótesis de que la detección de metabolitos y su uso como biomarcadores será un elemento esencial para el diagnóstico y seguimiento de diferentes tipos de cáncer.

La metabolómica se presenta como una poderosa herramienta que es capaz de detectar concentraciones mínimas de moléculas de bajo peso molecular en fluidos de pacientes y generar "huellas digitales metabólicas" que determine la enfermedad. La sensibilidad y la cobertura metabólica de este proceso se ha incrementado al combinar

la metabolómica con la espectrometría de masas de alta resolución (Zhang y cols., 2014). De hecho, diferentes estudios ya demostraron un metabolismo alterado en los tejidos del CCR en comparación con la mucosa normal (Denkert y cols., 2008, Bi y cols., 2006).

Los primeros análisis, se centraron en el *tejido tumoral*. Así, Denkert y cols., (2008) fue capaz de identificar un panel de 82 metabolitos, 25 de la síntesis de aminoácidos y purinas y 57 del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), que mostraban un comportamiento diferencial entre el CCR y la mucosa normal, mientras que Chan y cols., (2009) consiguió identificar metabolitos pertenecientes a fenómenos relacionados con la tumorigénesis (hipoxia tisular, glucólisis, biosíntesis de nucleótidos, metabolismo de lípidos/esteroides e inflamación) capaces de diagnosticar tumores e colorectales, diferenciar entre tumores de colon y recto, aunque no de distinguir entre los diferentes estadios de Dukes. Los estudios de Hirayama y cols., (2009), realizados sobre tejido tumoral, determinaron 94 metabolitos expresados diferencialmente en relación al tejido normal. Su análisis permitió concluir que este tejido tumoral poseía una glucólisis activada, una fosforilación oxidativa reducida y un aumento del catabolismo de proteínas (degradación autofágica) que provocaba una acumulación significativa de todos los aminoácidos (excepto la glutamina). Curiosamente, no se observaron diferencias en los metabolitos derivados de la síntesis de nucleótidos. Autores como Williams y cols., (2013, 2015) determinaron que vías metabólicas tan relevantes como las de biosíntesis de ácidos grasos y poliaminas oxidativas y las glicolíticas se encontraban alteradas en este tipo tumoral. Más recientemente, los estudios de Loke y cols. (2018) en tejido tumoral mediante metabolómica de LC-MS y secuenciación de rRNA 16S no sólo encuentra que un metabolito, el S-adenosil-1-homocisteína (SAH), está presente en alta concentración en estos tumores, sino que hipotetiza sobre la posibilidad de que la disbiosis microbioma puede ser una causa esencial en la variación en la localización del CCR.

Sin embargo, han sido los estudios de *metabolómica en sangre y/o suero* de los pacientes con CCR los más profusos en un intento de encontrar biomarcadores

fácilmente accesibles para esta enfermedad. Nishiumi y cols., (2012) estudiaron el metaboloma sérico mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) de 60 pacientes con CCR y 60 voluntarios sanos, desarrollando un modelo de predicción basado en la determinación de 4 biomarcadores (2-hidroxitirato, ácido aspártico, quinurenina y cistamina). Este modelo presentó una AUC, sensibilidad, especificidad y precisión del 0.9097, 85.0%, 85.0% y 85.0%, respectivamente, superando con creces la sensibilidad, especificidad y precisión de CEA fueron (35,0%, 96,7% y 65,8% respectivamente) y las de CA19-9 (16,7%, 100% y 58,3%, respectivamente). Por otra parte, Uchiyama y cols. (2017) informaron que el suero de los pacientes con CCR presentaba unos niveles muy elevados de ácido benzoico que se propuso como un posible biomarcador diagnóstico de la enfermedad. Recientemente, un estudio de metabolómica sérica de pacientes con CCR utilizando RMN proporcionó una poderosa firma de CCR para predecir la SG de los pacientes con CCR (Gu y cols., 2019). El estudio se llevó a cabo en 40 sueros de pacientes con CCR, 32 pacientes con pólipos colorrectales y 38 controles sanos, determinando una profunda activación del metabolismo del piruvato y el metabolismo de los glicerolípidos en los pólipos colorrectales y de la glucólisis y el metabolismo de la glicina, la serina y la treonina en el CCR. Estos autores determinaron la asociación de acetato y glicerol como una marca para distinguir pólipos colorrectales de otros tipos de lesiones. Así, frente a CCR la AUC fue de 0,713. Por otra parte, establecieron los niveles de lactato y citrato como la firma discriminativa para distinguir estos pólipos colorrectales, CCR y controles (pólipo colorrectal frente a control: AUC 0,821; pólipo colorrectal frente a CCR: AUC 0,772; CCR frente a control; AUC 0,821). Previamente, autores como Long y cols., (2017) habían validado la detección de niveles circulantes de xantina, hipoxantina y D-manosa como biomarcadores para distinguir a los pacientes con pólipos colorrectales y CCR de aquellos sin cáncer. Algunos autores han diseñado con éxito paneles de metabolitos que son capaces de determinar el pronóstico de la enfermedad en estadio II (Farshidfar y cols., 2016), hecho relevante, ya que se sabe que los CCR en este estadio reaparecen de forma temprana (Salazar y cols. 2011), y por tanto podría servir para identificar un subgrupo que podría beneficiarse de una QT adyuvante. Cómo ha demostrado Liu y cols., (2019) recientemente, tanto la detección de miARN sérico (combinación miR-21,

miR-29a, miR-92a y miR-125b; AUC 0,952) como el análisis metabolómico mediante GC/MS (AUC 1,0) presentaron una alta eficiencia para el diagnóstico del CCR en comparación con los biomarcadores clásicos CEA y CA19-9 (0,808 y 0,705, respectivamente).

No están dilucidados los mecanismos por los que una célula tumoral de CCR altera su metabolismo dando lugar a la aparición de diferentes biomarcadores. Sabemos que la tumorigénesis conlleva una reprogramación que implica aumento de la glucólisis, el ciclo del TCA, de la cisteína y el metabolismo de la metionina y que estos cambios podrían estar mediados por la vía de señalización Wnt, una vía frecuentemente alterada en este tipo tumoral (Pate y cols., 2014). Además de esta vía, en la etapa de adenoma, existe una sobreexpresión de MYC (probablemente inducido por Wnt) que modula la síntesis de nucleótidos y ácidos grasos y reduce la expresión de genes relacionados con el metabolismo mitocondrial (como PGC-1 $\alpha$ ) (Sato y cols., 2017). La alteración en el metabolismo de los lípidos parece ser una constante en los estudios de CCR, incluyendo una mayor síntesis de ácidos grasos, mayor elongación de los ácidos grasos saturados, y procesos de desaturación y polinsaturación (Pakiet y cols., 2019). Las mutaciones de KRAS también parecen mejorar la supervivencia de las células ante una depleción de glucosa (Miyo y cols., 2016). Por último, investigaciones recientes apuntan hacia la relevancia del microbioma en las vías metabólicas que son alterados en las células que inician el cáncer (Garza y cols., 2020).

### **5.7 Determinación de una nueva huella metabolómica en CCRm**

Diferentes investigadores han realizado estudios para caracterizar las alteraciones metabolómicas del CCR. En general estos estudios están influenciados por numerosos factores, incluido el tipo de muestra, el procedimiento analítico, el tratamiento de datos, la composición de la cohorte y las técnicas instrumentales y de separación utilizadas. Esto explicaría los resultados tan variables que se han obtenido en CCR (Moco y cols., 2007). Además, pocos son los estudios que han explorado este tipo de biomarcadores en CCRm. Todo ello habla de la necesidad de seguir avanzando en el diseño de novedosos enfoques metabolómicos que permitan identificar nuevos marcadores para CCRm.

En nuestro caso, se seleccionó *LC-MS* como plataforma analítica por haberse convertido en los últimos años en la técnica de elección en los estudios de metabolómica. Esta tecnología posee una mayor sensibilidad y amplía la gama de metabolitos detectables en comparación con la RMN, la primera plataforma analítica utilizada para la medición de metabolitos en una muestra biológica (Nicholson y cols., 1999). La selección del modo cromatográfico (fase inversa o HILIC) determinó la clase de compuestos susceptibles de separación, y se eligió una columna de fase inversa para lograr la separación de metabolitos medio polares y apolares (Cajka y cols., 2016). Así, los hallazgos del proceso cromatográfico fueron satisfactorios tanto del grupo control como de los pacientes afectados de CCR, ya que permitieron obtener una clara separación entre metabolitos con polaridad media (fosfolípidos, lisofosfolípidos y esteroides) de aquellos que presentaban una alta polaridad (algunos aminoácidos y azúcares) o los que no presentaron polaridad alguna.

Los posteriores *análisis quimométricos* realizados a las muestras obtenidas dieron como resultado la selección de cinco variables (metabolitos) que en principio cumplieron los criterios establecidos para poder ser considerados como posibles biomarcadores de CCRm. El complejo proceso de identificación de estos biomarcadores (bases de datos, fórmula molecular, interpretación del espectro de fragmentación experimental, bases de datos espectrales, estándares comerciales) permitieron una identificación precisa de la esfinganina (esfingolípido), PC (glicerofosfolípido) y DEA (endocannabinoide) y una identificación muy avanzada de Gal $\alpha$ 1-3 (Fuc $\alpha$ 1-2) Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -Cer (esfingolípido) y PE (glicerofosfolípido) a falta de la existencia de un estándares comercial para su comparación. Los estudios que intentaron relacionar los biomarcadores obtenidos mediante metabolómica y los datos clínicos (análisis ROC) demostraron una asociación significativa de los mismos con la presencia de CCRm, sugiriendo su posible uso como biomarcadores diagnósticos. Sin embargo, fue la combinación de los cinco marcadores (huella metabolómica) la que mostró el mayor poder discriminativo para este estadio de la enfermedad en relación a los pacientes control. Recientemente, otros autores, como Zhang y cols., 2020, han realizado un estudio similar al nuestro mediante

cromatografía de gases y espectrometría de masas aunque sólo en el suero de 22 pacientes de CCR, 23 pacientes cáncer rectal y 45 voluntarios sanos. Sus resultados determinaron que la combinación de los metabolitos d-glucosa y d-manosa fue eficaz para el diagnóstico de CCR (AUC 0,805), mientras que la asociación de ácido 2-aminobutanoico, 3-hidroxipiridina, d-glucosa, d-manosa, isoleucina, l-triptófano, urea y ácido úrico (AUC 0,889) lo fueron para el diagnóstico de cáncer rectal.

Hoy, estamos todavía muy lejos de comprender la relación existente entre los *hallazgos metabolómicos* en el suero en pacientes con CCR y el desarrollo del *proceso metastásico*. Entre los pocos estudios existentes, Satoh y cols., (2017), compararon el metabolismo del tumor primario con el del metastásico, encontrando modificaciones en la expresión de enzimas que actúan sobre ácidos grasos de cadena larga (como la CoA ligasa) y relacionándolos con las características invasoras y migratorias de la células tumorales. Recientemente, Kuo y cols., 2019, han demostrado una mayor expresión de GLUT3 y PKM2 en células de CCRm a través de la vía YAP, vía que está asociada a las metástasis en ganglios linfáticos a través de la regulación positiva de la oxidación de ácidos grasos (Lee, y cols., 2019). Parece que el metabolismo de la oxidación de los ácidos grasos está muy relacionado con las CTC colorrectales que sobreexpresan enzimas de esta vía, como CPT1A, esenciales para su supervivencia (Wang y cols., 2018). Además, se ha descubierto que el metabolismo del folato y la cistina son esenciales para las líneas celulares de CCRm de los ganglios linfáticos y del hígado (Tarragó-Celada y cols., 2021). Por último, algunos autores han intentado establecer patrones metabólicos en células metastásicas de CCR localizadas en el hígado (Loo y cols., 2015). En este sentido, se ha observado cómo estas células inducen la fosforilación de la creatina mediante la secreción de creatina quinasa B (CKB) e importan la fosfocreatina resultante a través de transportadores (como SLC6A8) usándola para generar ATP y, por tanto, energía para el mantenimiento de su proliferación. Serán necesarias nuevas y más profundas investigaciones para una comprensión acertada de las modificaciones metabólicas que acontecen en las células metastásicas de CCR.

## **5.8 Presencia de endocannabinoides en la huella metabolómica de CCRm**

Aunque la presencia del endocannabinoide DEA en la “huella metabolómica” encontrada para CCRm pueda sorprender, se ha informado previamente de la amplia funcionalidad que estas moléculas poseen en determinadas zonas del tracto gastrointestinal y especialmente, en las diferentes regiones del colon. Curiosamente, en un reciente estudio sobre la metabolómica del tejido colónico de colon ascendente y descendente se identificaron diferencias para los metabolitos de la vía endocannabinoide de ambas zonas. Los endocannabinoides específicos, como la oleoiletanolamida monoinsaturada, la palmitoiletanolamida saturada y la linoleoiletanolamida poliinsaturada mostraron una mayor abundancia relativa en colon ascendente en comparación con el colon descendente (Baxter y cols., 2020).

Así, algunos autores han podido demostrar que estas moléculas provocan una significativa inhibición de la capacidad de proliferación de células epiteliales de estas regiones intestinales a través de la actuación sobre receptores CB1 (Ligresti y cols 2003). En nuestro estudio, los niveles de endocannabinoides se mostraron más reducidos en las muestras de CCR que en las muestras control. Esto podría hacer pensar que la sobreexpresión de la serina hidrolasa monoacilglicerol lipasa (MAGL) en CCR, una enzima clave en el metabolismo endocannabinoide, podría estar implicada en este hallazgo. De hecho, se ha demostrado que una reducción de la expresión de MAGL produce una reducción del crecimiento tumoral a través de la ciclina D1 y/o inhibición de la expresión de Bcl-2 (Ye y cols., 2011).

### **5.9 Esfingolípidos y glicerofosfolípidos: potenciales marcadores de CCR**

Los esfingolípidos son componentes clave de las membranas biológicas y están involucrados en numerosos procesos relacionados con la progresión tumoral (Gault, y cols., 2010; Hannun y cols., 2017), incluida la inhibición del crecimiento de células tumorales y la inducción de apoptosis (Reichlin y cols., 1969). Así, Ahn y cols. (2006, 2010) ya mostraron como la esfinganina es capaz de inducir apoptosis en las células de CCR mediante la parada del ciclo celular en la fase G2/M. Además, esta clase de lípidos están estrechamente relacionados con la vía WNT/ $\beta$ -catenina, una de las vías que se ha demostrado, puede estar alterada en CCR (García-Barros y cols., 2014). Estos hallazgos soportarían la hipótesis de que una inhibición (regulación negativa)

de las vías antes mencionadas, resultaría en una baja concentración de los esfingolípidos que podría favorecer la progresión de la enfermedad incluyendo el desarrollo de metástasis. De hecho, esfingolípidos del tipo SphK1 juegan un papel relevante en la progresión del CCR y la supervivencia del paciente. De hecho, algunas estrategias terapéuticas proponen combinar la inhibición de SphK1 con agentes quimioterapéuticos actuales para mejorar los resultados de su tratamiento (Tan y cols., 2014).

Nuestros resultados determinan una modulación de dos esfingolípidos que están N-acilados por la ceramida sintasa (CerS) (Gault y cols., 2010) y que ya han mostrado concentraciones aumentadas en CCR (Sridevi y cols., 2009; Chen y cols., 2015). En este contexto, algunos estudios apuntan hacia la posibilidad de que la inhibición de CerS o la aplicación de análogos de ceramida promueve la apoptosis de células de CCR humano (Selzner y cols., 2001). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que una disminución de las concentraciones de esfinganina podrían estar relacionado con el aumento de las concentraciones de CerS (Tanaka y cols., 2014). Además, la interacción entre las ceramidas y los endocannabinoides también parece ser crucial para la progresión del cáncer, dado que los cannabinoides regulan las vías metabólicas de los esfingolípidos al promover el agotamiento de la esfingomielina y aumentar notablemente las concentraciones de ceramida.

Por último, el metabolismo desregulado de la colina se ha asociado con la oncogénesis y la progresión tumoral (Glunde y cols., 2011). Varias enzimas están involucradas en la alteración de las vías de la colina, incluidas las glicerofosfocolina fosfodiesterasas (GDPD) (Glunde y cols., 2015). Estas enzimas escinden la glicerofosfocolina (GPC) para formar glicerol-3-fosfato y colina, y su sobreexpresión se ha relacionado con la migración de las células tumorales y con la producción de metástasis (Marchan y cols., 2012; Stewart y cols., 2012; Cao y cols., 2012). Además, el silenciamiento de GDPD puede aumentar las concentraciones de GPC y PE (Wijnen y cols., 2018). Por tanto, niveles elevados de GDPD en CCR metastásico podrían estar asociados a niveles reducidos de GPC y PE. De hecho, alteraciones de ambas moléculas han sido previamente descritas en CCR (Shen y cols., 2017). Debemos destacar que ninguno

de los marcadores identificados en nuestro estudio se ha relacionado previamente con este tumor (Erben y cols., 2018) con excepción de LPC (18:1). Curiosamente, se ha descrito una disminución significativa en LPC (18:1) en CCR no avanzado (Zhao y col., 2007) mientras que nuestros resultados demuestran su aumento en pacientes con CCRm, lo que sugiere que este metabolito es un candidato potencial para ser analizado con mayor profundidad como marcador de progresión de la enfermedad.

### **5.10 Metabolómica en otros fluidos corporales: nuevas posibilidades de diagnóstico de CCR**

A pesar de que los principales estudios para la búsqueda de biomarcadores a través de metabolitos se han realizado en suero de pacientes CCR, otros fluidos han sido también utilizados, no pudiéndose descartar que sean estos los que quizás lleguen a su aplicación en la práctica clínica. Así, el perfil de metabolómica de la orina puede ser una herramienta muy valiosa para detección de adenoma colorrectal avanzado y el CCR en estadio temprano. Un primer estudio piloto de metabolómica en orina de pacientes con CCR reveló un mayor nivel de compuestos de bajo peso molecular (283 y 234) (Ma y cols., 2009). Más recientemente, Wang y cols., (2017) demostró mediante RMN como 16 biomarcadores podían servir para detectar un estadio precoz de CCR, estadio en el que se encontraron concentraciones crecientes de un grupo de metabolitos (acetoacetato, cis-aconitato, glutamina, trans-aconitato, guanidoacetato y homocisteína) y decrecientes de otro grupo de metabolitos (colina, creatinina, asparagina, alanina, dimetilsulfona, isocitrato/hipurato/cisteína/fenilalanina y metilamina). Otros perfiles de metabolómica en orina también se han propuesto para diagnosticar pacientes con CCR, incluyendo la determinación de los grupos de metabolitos alanina, valina, 3-aminoisobutirato y taurina, por una parte, y glicerol, treonina, ascorbato, hipurato, citrato y creatinina, por otra, grupos que se encontraron en concentraciones elevadas y reducidas, respectivamente, en los pacientes con CCR en relación con los controles sanos (Kim y cols., 2019)



# **C***onclusiones*



1. El ARNm de los genes implicados en el proceso angiogénico *JAG1*, *PTGS2* y *GUCY2C* en muestras de sangre periférica de pacientes con CCRm, está sobreexpresado de forma estadísticamente significativa en relación a los casos control.
2. Los niveles de ARNm de los genes *JAG1*, *PTGS2*, *GUCY2C* y *PGF* en muestras suero de pacientes con CCRm, mostraron un incremento estadísticamente significativo en relación a los casos control.
3. Los niveles de ARNm circulante de todos los genes analizados fueron significativamente mayores en el suero de los pacientes con CCRm que en las muestras de sangre, siendo el ARNm de *PTGS2* en suero el que presentó una mayor capacidad de discriminación (AUC 0,984).
4. En las muestras de sangre de pacientes con CCRm, sólo el mRNA de *JAG1* mostró una capacidad discriminativa relevante (AUC 0,858)
5. En las muestras de suero, los ARNm de *GUCY2C* y *JAG1* también mostraron una alta capacidad de discriminación (AUC 0.896 y 0.840, respectivamente).
6. Ninguna de las combinaciones de biomarcadores ensayadas, tanto en sangre como en suero, fueron capaces de mejorar la capacidad de discriminación obtenida por los biomarcadores aislados.

7. Sólo la expresión de *GUCY2C* y la combinación *GUCY2C/ PTGS2* en el suero de los pacientes con CCRm se correlacionó significativamente con la respuesta al tratamiento.
  
8. La utilización de metabolómica no dirigida mediante LC-HRMS en suero permitió identificar cinco metabolitos (un endocannabinoide, dos glicerofosfolípidos y dos esfingolípidos) con niveles significativamente diferenciados entre los pacientes CCR m y los controles.
  
9. Los análisis ROC confirmaron que la combinación de los cinco metabolitos constituyen la “huella metabolómica” con el mayor poder discriminativo para pacientes con CCRm.



# ***B**ibliografía*



Aboud OA, Weiss RH. New opportunities from the cancer metabolome.. Clin Chem. 2013 Jan;59(1):138-46.

Aka AA, Rappaport JA, Pattison AM, y cols Guanylate cyclase C as a target for prevention, detection, and therapy in colorectal cancer. Expert Rev Clin Pharmacol. 2017 May;10(5):549-557.

Akil, A.; Gutierrez-Garcia, A.K.; Guenter, R.; y cols. Notch Signaling in Vascular Endothelial Cells, Angiogenesis, and Tumor Progression: An Update and Prospective. Front Cell Dev Biol. 2021 Feb 16;9:642352.

Alkhezayem S, Wani TA, Wakil S, y cols. Transcriptome analysis of neratinib treated HER2 positive cancer model vs untreated cancer unravels the molecular mechanism of action of neratinib. Saudi Pharm J. 2020 Aug;28(8):963-970

Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, y cols . Molecular pathways in colorectal cancer. J Gastroenterol Hepatol. 2012 Sep;27(9):1423-31.

American Joint Committee on Cancer (AJCC). TNM Staging Classification for colon Cancer 8th edition, 2017.

Andre T, Amonkar M, Norquist JM, y cols. Health-related quality of life in patients with microsatellite instability-high or mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer treated with first-line pembrolizumab versus chemotherapy (KEYNOTE-177): an open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2021 May;22(5):665-677.

Andre T, de Gramont A, Vernerey D, y cols. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: updated 10- year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC stud. J Clin Oncol. 2015 Dec 10;33(35):4176-87.

Angelucci, A.; Delle Monache, S.; Cortellini, A.; y cols "Vessels in the Storm": Searching for Prognostic and Predictive Angiogenic Factors in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2018 Jan 19;19(1):299.

Aranda E, Viéitez JM, Gómez-España A, y cols. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFOX plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer and  $\geq 3$  circulating tumour cells: the randomised phase III VISNÚ-1 trial. ESMO Open. 2020 Nov;5(6):e000944

Arcaroli, J.J.; Tai, W.M.; McWilliams, R.; y cols. A NOTCH1 gene copy number gain is a prognostic indicator of worse survival and a predictive biomarker to a Notch1 targeting antibody in colorectal cancer. Int J Cancer. 2016 Jan 1;138(1):195-205.

Ardalan Khales S, Abbaszadegan MR, Abdollahi A, y cols. SALL4 as a new biomarker for early colorectal cancers.J Cancer Res Clin Oncol. 2015 Feb;141(2):229-35

Arnold D, Lueza B, Douillard J-Y y cols. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trial. *Ann Oncol*. 2017 Aug 1;28(8):1713-1729.

Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, y cols. RAPIDO collaborative investigators. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021 Jan;22(1):29-42

Barault, L.; Amatu, A.; Siravegna, G.; y cols. Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer. *Gut*. 2018 Nov;67(11):1995-2005

Barbarino JM, Haidar CE, Klein TE, y cols. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for UGT1A1. *Pharmacogenet Genomics*. 2014 Mar;24(3):177-83

Barras D, Missiaglia E, Wirapati P, y cols. BRAF V600E mutant colorectal cancer subtypes based on gene expression. *Clin Cancer Res*. 2017 Jan 1;23(1):104-115

Baxter BA, Parker KD, Nosler MJ, y cols. Metabolite profile comparisons between ascending and descending colon tissue in healthy adults. *World J Gastroenterol*. 2020 Jan 21;26(3):335-352.

Bedin, C.; Enzo, M.V.; Del Bianco, P.; y cols. Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2017 Apr 15;140(8):1888-1898

Bendell J, Ciardiello F, Tabernero J y cols. Efficacy and safety results from IMblaze370, a randomized phase III study comparing atezolizumab + cobimetinib and atezolizumab monotherapy vs. Regorafenib in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2018 Jun; 29: v123.

Bengs S, Becker E, Busenhardt P, y cols  $\beta 6$  -integrin serves as a novel serum tumor marker for colorectal carcinoma. *Int J Cancer*. 2019 Aug 1;145(3):678-685

Birgisson H, Tsimogiannis K, Freyhult E y cols. Plasma Protein Profiling Reveal Osteoprotegerin as a Marker of Prognostic Impact for Colorectal Cancer. *Transl Oncol*. 2018 Aug;11(4):1034-1043

Bisgin, A.; Kargi, A.; Yalcin, A.D.; y cols. Increased serum sTRAIL levels were correlated with survival in bevacizumab-treated metastatic colon cancer. *BMC Cancer*. 2012 Feb 7;12:58

Bork, Rahbari, Scholch y cols. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *Br J Cancer* 2015 Apr 14;112(8):1306-13

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, y cols (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424.

Breugom AJ, Swets M, Bosset JF, y cols. Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2015 Feb;16(2):200-7.

Bruni D, Angell HK, Galon J y cols. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer.* 2020 Nov;20(11):662–80.

Burz C, Pop V, Buiga R, y cols. Circulating tumor cells in clinical research and monitoring patients with colorectal cancer. *Oncotarget.* 2018 May 11;9(36):24561-24571

Carrithers, S.L.; Barber, M.T.; Biswas, S.; y cols. Guanylyl cyclase C is a selective marker for metastatic colorectal tumors in human extraintestinal tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14827-32

Chan E.C., P.K. Koh, M. Mal, y cols. Keun Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) *J. J Proteome Res.* 2009 Jan;8(1):352-61.

Chan E.C., P.K. Koh, M. Mal, y cols. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *J Proteome Res.* 2009 Jan;8(1):352-61.

Chand M, Keller DS, Mirnezami R, y cols. Novel biomarkers for patient stratification in colorectal cancer : A review of definitions , emerging concepts , and data. *World J Gastrointest Oncol.* 2018 Jul 15;10(7):145-158

Chang, W.H.; Ho, B.C.; Hsiao, Y.J.; y cols. Is Associated with Poor Survival through Inducing Metastasis in Lung Cancer. *PLoS One.* 2016 Mar 1;11(3):e0150355

Chen L, Ke X. MMP7 as a potential biomarker of colon cancer and its prognostic value by bioinformatics analysis. *Medicine (Baltimore).* 2021 Mar 5;100(9):e24953.

Cheung, A.H.; Chow, C.; To, K.F. Latest development of liquid biopsy. *J Thorac Dis.* 2018 Jun;10(Suppl 14):S1645-S1651

Clèries R, Buxó M, Martínez JM y cols. Contribution of changes in demography and in the risk factors to the predicted pattern of cancer mortality among Spanish women by 2022. *Cancer Epidemiol.* 2016 Feb; 40:113-8.

Cohen, J.D.; Li, L.; Wang, Y.; y cols. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science.* 2018 Feb 23;359(6378):926-930.

Conroy T, Lamfichekh N, Etienne P y cols. Total neoadjuvant therapy with mFOLFIRINOX versus preoperative chemoradiation in patients with locally advanced rectal cancer: Final results of PRODIGE 23 phase III trial, a UNICANCER GI trial. *J Clin Oncol*. 2020 May; 38 (suppl 15): 4007-4007

Coppedè F, Lopomo A, Spisni R, y cols. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan 28;20(4):943-56

Corconan RB, André T, Atreya CE y cols. Combined BRAF, EGFR, and MEK inhibition in patients with BRAFV600E Mutant colorectal cancer. *Cancer Discovery*. 2018 Apr;8(4):428-43.

Cremolini C, Antoniotti C, Lonardi S y cols. Activity and safety of Cetuximab plus modified FOLFOXIRI followed by maintenance with Cetuximab or Bevacizumab for RAS and BRAF wild-type metastatic colorectal cancer. A randomized phase 2 clinical trial. *JAMA Oncol*. 2018 Apr 1;4(4):529-536

Cremolini C, Antoniotti C, Stein A, y cols. Individual Patient Data Meta-Analysis of FOLFOXIRI Plus Bevacizumab Versus Doublets Plus Bevacizumab as Initial Therapy of Unresectable Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2020 Aug 20: JCO2001225.

Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C y cols. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: update overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol*. 2015 Oct;16(13):1306-15.

Crotti S, Agnoletto E, Cancemi G, y cols. Altered plasma levels of decanoic acid in colorectal cancer as a new diagnostic biomarker. *Anal Bioanal Chem*. 2016 Sep;408(23):6321-8.

Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, y cols. Liquid biopsy: monitoring cancer genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Aug;10(8):472-84

Dai, Y.; Wilson, G.; Huang, B.; y cols. Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2014 Apr 10;5(4):e1170.

Das V, Kalita J, Pal M. ScienceDirect Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenge. *Biomed Pharmacother*. 2017 Mar;87:8-19

Denkert C, J. Budczies, W. Weichert, G. y cols. Metabolite profiling of human colon carcinoma—deregulation of TCA cycle and amino acid turnover *Mol Cancer*. 2008 Sep 18; 7:72.

Di Lena M, Porcelli F, Altomare DF. Volatile organic compounds as new biomarkers for colorectal cancer: a review. *Colorectal Dis*. 2016 Jul;18(7):654-63.

Dienstmann R, Villacampa G, Sveen. y cols. Relative contribution of clinicopathological variables, genomic markers, transcriptomic subtyping and microenvironment features for outcome prediction in stage II/III colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2019 Oct 1;30(10):1622-1629

Ding L, Lan Z, Xiong X, y cols. Dual Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 17;19(9):2791

Ding, C.; Luo, J.; Fan, X.; y cols. Elevated Gab2 induces tumor growth and angiogenesis in colorectal cancer through upregulating VEGF levels. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Apr 18;36(1):56

Douillard JY, Oliner KS, Siena S y cols. Panitumumab- FOLFOX-4 treatment and RAS mutation in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2013 Sep 12;369(11):1023-34.

Drebber U, Lay M, Wedemeyer I, y cols .Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Oncol.* 2011 Aug;39(2):409-15.

Drilon A, Laetsch TW, Kummar S y cols. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-positive cancer in adults and children. *N Engl J Med.* 2018 Feb 22;378(8):731-739

Erben V, Bhardwaj M, Brenner H y cols Metabolomics Biomarkers for Detection of Colorectal Neoplasms : A Systematic Review. *Cancers (Basel).* 2018 Jul 27;10(8).

EUROSTAT. Tobacco consumption statistics.; [último acceso el 11/01/2020].

Falcone A, Ricci S, Brunetti I y cols; Gruppo Oncologico Nord Ovest. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, eucoverin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol.* 2007 May 1;25(13):1670-6.

Farshidfar F, Kopciuk KA, Hilsden R, y colA quantitative multimodal metabolomic assay for colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2018 Jan 4;18(1):26.

Farshidfar F, Weljie AM, Kopciuk KA, y cols. A validated metabolomic signature for colorectal cancer: exploration of the clinical value of metabolomics. *Br J Cancer.* 2016 Sep 27;115(7):848-57.

Fathi A, Hussein S, Roshdy M, y cols. Prognostic Significance of CD133 and Ezrin Expression in Colorectal Carcinoma. *IUBMB Life.* 2017 May;69(5):328-340.

Feng Y, Wu C, Shiau A, y cols. MicroRNA-21-mediated regulation of Sprouty2 protein expression enhances the cytotoxic effect of 5-fluorouracil and metformin in colon cancer cells. *Int J Mol Med.* 2012 May;29(5):920-6

Fernández-Martos C, Pericay C, Aparicio J, y cols. Phase II, randomized study of concomitant chemoradiotherapy followed by surgery and adjuvant capecitabine plus

oxaliplatin (CAPOX) compared with induction CAPOX followed by concomitant chemoradiotherapy and surgery in magnetic resonance imaging-defined, locally advanced rectal cancer: Grupo cancer de recto 3 study. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 10;28(5):859-65.

Fiehn O. Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks; *Comp Funct Genomics* 2001; 2: 155-168.

Francesco Sclafani, David Cunningham. Neoadjuvant chemotherapy without radiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Future Oncol*. 2014 Nov;10(14):2243-57.

Fu F, Jiang W, Zhou L. y cols. Translational Oncology Circulating Exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p Predict Pathologic Stage and Grade of Colorectal Cancer. *Transl Oncol*. 2018 Apr;11(2):221-232

Fuchs CS, Marshall J, Barreucó J. y cols. Randomized, controlled trial of irinotecan plus Infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updates result from the BICC-C study. *J Clin Oncol*. 2008 Feb 1;26(4):689-90.

Gacche, R.N. Compensatory angiogenesis and tumor refractoriness. *Oncogenesis*. 2015 Jun 1;4(6):e153.

Galamb O, Barták BK, Kalmár A, y cols. Diagnostic and prognostic potential of tissue and circulating long non-coding RNAs in colorectal tumors. *World J Gastroenterol*. 2019 Sep 14;25(34):5026-5048.

Gao J, Wu H, Wang L, y cols. Validation of targeted next-generation sequencing for RAS mutation detection in FFPE colorectal cancer tissues: comparison with Sanger sequencing and ARMS-Scorpion real-time PCR. *BMJ Open*. 2016 Jan 8;6(1):e009532.

Garza, D.R.; Taddese, R.; Wirbel, J.; y cols. Metabolic models predict bacterial passengers in colorectal cancer. *Cancer Metab*. 2020 Feb 10; 8:3

Geisser M, Klingler T, Riera-Knorrenschild J y cols. mFOLFOXIRI + Panitumumab versus FOLFOXIRI as first-line treatment in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer (mCRC): a randomized phase II VOLFI trial of the AIO (AIOKRK0109). *Ann of Oncol*. 2018 June; suppl 5:0-024.

Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, y cols. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer : A review. *Cancer Treat Rev*. 2016 Dec;51:19-26.

Ghiringhelli F, Chibaudel B, Taieb J y cols. Durvalumab and tremelimumab in combination with FOLFOX in patients with RAS-mutated, microsatellite-stable, previously untreated metastatic colorectal cancer (MCRC): Results of the first intermediate analysis of the phase Ib/II MEDETREME trial. *J Clin Oncol* 2020 May; 38; suppl 15: 3006-3006

Giampieri, R.; Ziranu, P.; Daniele, B.; y cols. From CENTRAL to SENTRAL (SErum aNgiogenesis cenTRAL): Circulating Predictive Biomarkers to Anti-VEGFR Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020 May 22;12(5):1330.

Giannakis M, Hodis E, Jasmine Mu X, y cols. RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nat Genet*. 2014 Dec;46(12):1264-6.

Glynn-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E y cols. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;28(suppl\_4): iv22-iv40.

Goel, G. Molecular characterization and biomarker identification in colorectal cancer: Toward realization of the precision medicine dream. *Cancer Manag Res*. 2018 Nov 19;10: 5895-5908

Gonzalez-Cao M, Mayo-de-Las-Casas C, Molina-Vila MA, y cols. BRAF mutation analysis in circulating free tumor DNA of melanoma patients treated with BRAF inhibitors.. *Melanoma Res*. 2015 Dec;25(6):486-95.

Graham LD, Pedersen SK, Brown GS, y cols. Colorectal Neoplasia Differentially Expressed (CRNDE), a Novel Gene with Elevated Expression in Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas. *Genes Cancer*. 2011 Aug;2(8):829-40.

Grothey A, Sobrero AF, Shields AF y cols. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Mar 29;378(13):1177-1188

Gu J, Y. Xiao, D. Shu, X. y cols. Metabolomics analysis in serum from patients with colorectal polyp and colorectal Cancer by 1 H-NMR spectrometry *Dis Markers*. 2019 Apr 7; 2019:3491852

Guinney J, Dienstmann R, Wang X, y cols. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1350-6

Haibe, Y.; Kreidieh, M.; El Hajj, H.; y cols. Resistance Mechanisms to Anti-angiogenic Therapies in Cancer. *Front Oncol*. 2020 Feb 27;10:221.

Hainsworth JD, Meric-Bernstam F, Swanton C y cols. Targeted therapy for advanced solid tumors on the basis of molecular profiles: results from MyPathway, an open-label, phase IIa multiple basket study. *J Clin Oncol*. 2018 Feb 20;36(6):536-542.

Hao H, Liu L, Zhang D, y cols. Diagnostic and prognostic value of miR-106a in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Jan 17;8(3):5038-5047.

Hashimoto Y, Zumwalt TJ, Goel A. DNA methylation patterns as noninvasive biomarkers and targets of epigenetic therapies in colorectal cancer. *Epigenomics*. 2016 May;8(5):685-703.

Hauptman N, Glava D. Colorectal Cancer Blood-Based Biomarkers. *Gastroenterol Res Pract.* 2017;2017:2195361.

Henriksen T V, Tarazona N, Reinert T, y cols. Circulating tumor DNA analysis for assessment of recurrence risk, benefit of adjuvant therapy, and early relapse detection after treatment in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 2021 Jan 20;39(suppl 3):11–11.

Heras SC, Martínez-balibrea E, Heras SC, y cols. CXC family of chemokines as prognostic or predictive biomarkers and possible drug targets in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2018 Nov 14;24(42):4738-4749.

Heuckmann JM, Thomas RK. A new generation of cancer genome diagnostics for routine clinical use: overcoming the road- blocks to personalized cancer medicine. *Ann Oncol.* 2015 Sep;26(9):1830-1837

Hirayama A., K. Kami, M. Sugimoto, y cols. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.* 2009 Jun 1;69(11):4918-25.

Hopirtean, C.; Nagy, V. Optimizing the use of anti VEGF targeted therapies in patients with metastatic colorectal cancer: review of literature. *Clujul Med* 2018, 91, 12-17.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, y cols. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Disponible en: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/). Based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019.

Hsu, H.C.; Lapke, N.; Chen, S.J.; y cols. PTPRT and PTPRD Deleterious Mutations and Deletion Predict Bevacizumab Resistance in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Cancers (Basel).* 2018 Sep 6;10(9)

Hu X, Li Y, Li Q, y cols EBioMedicine ITGAE Defines CD8 + Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predicting a better Prognostic Survival in Colorectal Cancer. *EBioMedicine.* 2018 Sep;35:178-188

Huang Z, Feng Y. Exosomes Derived From Hypoxic Colorectal Cancer Cells Promote Angiogenesis Through Wnt4-Induced  $\beta$ -Catenin Signaling in Endothelial Cells. *Oncol Res.* 2017 May 24;25(5):651-661.

Huchster HS, Bendell JC, Cleary JM y cols. Efficacy and safety and efficacy of atezolizumab (atezo) and bevacizumab (bev) in a phase Ib study of microsatellite instability (MSI)-high metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol.* 2017 February 1;35(suppl 4): 673-673.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W y cols. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jun 3;350(23):2335-42

Hutchins G, Southward K, Handley K, y cols. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1261-70.

Ii, M.; Yamamoto, H.; Adachi, Y.; y cols. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006 Jan;231(1):20-7.

Ilic, I.; Jankovic, S.; Ilic, M. Bevacizumab Combined with Chemotherapy Improves Survival for Patients with Metastatic Colorectal Cancer: Evidence from Meta Analysis. *PLoS One*. 2016 Aug 31;11(8):e0161912.

Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la causa de muerte. [último acceso el 19/01/21]

Itatani, Y.; Kawada, K.; Yamamoto, T.; y cols. Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer-Alterations to Anti-VEGF Pathway. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 18;19(4):1232.

Jamal-Hanjani M, Quezada SA, Larkin J, y cols. Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin Cancer Res*. 2015 Mar 15;21(6):1258-66.

Jeanne T, Joshua D. Cohen y cols. Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *JAMA Oncol*. 2019 Dec 1;5(12):1710-1717.

Jiang Y, Zhang C, Chen K, y cols The clinical significance of DC-SIGN and DC-SIGNR, which are novel markers expressed in human colon can *PLoS One*. 2014 Dec 12;9(12):e114748

Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO y cols. Non-V600 BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2017 Aug 10;35(23):2624-2630

Bujko K, Wyrwicz L, Rutkowski A, y cols. Long-course oxaliplatin-based preoperative chemoradiation versus 5 × 5 Gy and consolidation chemotherapy for cT4 or fixed cT3 rectal cancer: results of a randomized phase III study. *Ann Oncol*. 2016 May;27(5):834-42

Kadiyska T, Nossikoff A. Stool DNA methylation assays in colorectal cancer screening. *World J Gastroenterol*. 2015 Sep 21;21(35):10057-61

Khan K, Rata M, Cunningham D, y cols. Functional imaging and circulating biomarkers of response to regorafenib in treatment-refractory metastatic colorectal cancer patients in a prospective phase II study. *Gut*. 2018 Aug;67(8):1484-1492.

Kim ER, H.N. Kwon, H. Nam, y cols. Urine-NMR metabolomics for screening of advanced colorectal adenoma and early stage colorectal cancer. *Sci Rep*. 2019 Mar 18;9(1):4786.

Kim, Y.S.; Kang, K.N.; Shin, Y.S.; y cols. Diagnostic value of combining tumor and inflammatory biomarkers in detecting common cancers in Korea. *Clin Chim Acta* 2021, 516, 169-178. *Clin Chim Acta*. 2021 May;516:169-178.

Kohne CH, Cunningham D, Di Costanzo F, y cols. Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracil-based treatment for metastatic colorectal cancer: results of a multivariate analysis of 3825 patients. *Ann Oncol*. 2002 Feb;13(2):308-17.

Kopetz S, Guthrie KA, Morris VK y cols. Randomized trial of Irinotecan and Cetuximab with ou without Vemurafenib in BRAF mutant metastatic colorectal cancer (SWOG 1406). *J Clin Oncol*. 2017;35 suppl 4S: abstr 520. *J Clin Oncol*. 2021 Feb 1;39(4):285-294

Kopetz S, TaberneroJ, Rosenberg R y cols. Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stge II colorectal cancer patuents more accurately than clinical factors. *Oncologist*. 2015 Feb;20(2):127-33

Krebs MG, Renehan AG, Backen A y cols. Circulating Tumor Cell Enumeration in a Phase II Trial of a Four-Drug Regimen in Advanced Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2015 Jun;14(2):115-22.

Kuo, C.-C.; Ling, H.-H.; Chiang, M.-C. y cols. Metastatic Colorectal Cancer Rewrites Metabolic Program Through a Glut3-YAP-dependent Signaling Circuit. *Theranostics*. 2019 Apr 13;9(9):2526-2540

Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, y cols. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013 Oct;24 Suppl 6:vi64-72.

Le DT, Durham JN, Smith KN y cols. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017 Jul 28;357(6349):409-413

Le DT, Kavan P, Kim TW y cols. Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol*. 2020 Jan 1;38(1):11-19.

Lech G, Slotwiński R, Słodkowski M, y cols. Global view Colorectal cancer tumour markers and biomarkers : Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 7;22(5):1745-55.

Lee, C.-K.; Jeong, S.-H.; Jang, C.; y cols. Tumor metastasis to lymph nodes requires YAP-dependent metabolic adaptation. *Science*. 2019 Feb 8;363(6427):644-649.

Levy M, Visokai V, Lipska L, y cols. Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma*. 2008;55(2):138-42

Li D, Chen T. Li Q y cols. Diagnostic Value of Methylated Septin9 for colorectal cancer Detection. *Front Oncol*. 2018 Jul 2;8:247.

Li J, Qin S, Xu RH y cols. Effect of Fruquintinib vs. placebo on overall survival in patients with previously treated metastatic colorectal cancer: The FRESCO randomized clinical trial. *JAMA*. 2018 Jun 26;319(24):2486-2496.

Li W, Zhang G, Wang HL, y cols. (2016) Analysis of expression of cyclin E, p27kip1 and Ki67 protein in colorectal cancer tissues and its value for diagnosis, treatment and prognosis of disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016 Dec;20(23):4874-4879

Li ZN, Zhao L, Yu LF, y cols . *BRAF* and *KRAS* mutations in metastatic colorectal cancer: future perspectives for personalized therapy. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2020 Jun 15;8(3):192-205.

Li, D.; Masiero, M.; Banham, y cols. The notch ligand JAGGED1 as a target for anti-tumor therapy. *Front Oncol*. 2014 Sep 25;4:254.

Li, P.; Schulz, S.; Bombonati, A.; y cols. Guanylyl cyclase C suppresses intestinal tumorigenesis by restricting proliferation and maintaining genomic integrity. *Gastroenterology*. 2007 Aug;133(2):599-607

Lin J, Chuang C, Zuo L. y cols. Potential roles of microRNAs and ROS in colorectal cancer: diagnostic biomarkers and therapeutic targets. *Oncotarget*. 2017 Mar 7;8(10):17328-17346.

Lin JE, Colon-Gonzalez F, Blomain E, y cols. Obesity-Induced Colorectal Cancer Is Driven by Caloric Silencing of the Guanylin-GUCY2C Paracrine Signaling Axis. *Cancer Res*. 2016 Jan 15;76(2):339-46

Lin Y, Ma C, Liu C, y cols NMR-based fecal metabolomics fingerprinting as predictors of earlier diagnosis in patients with colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 May 17;7(20):29454-64

Lindon, J.C., Holmes, E., Nicholson, J.K. Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004 Mar;4(2):189-99

Link, T.; Kuhlmann, J.D.; Kobelt, D.; y cols. Clinical relevance of circulating MACC1 and S100A4 transcripts for ovarian cancer. *Mol Oncol*. 2019 May;13(5):1268-1279

Linuma, Watanabe, Mimori y cols. Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011 Apr 20;29(12):1547-55.

Liu HN, T.-T. Liu, H. Wu, y cols. Shen Serum microRNA signatures and metabolomics have high diagnostic value in colorectal cancer using two novel methods. *Cancer Sci*. 2018 Apr;109(4):1185-1194.

Liu R, Su X, Long Y, y cols. A systematic review and quantitative assessment of methylation biomarkers in fecal DNA and colorectal cancer and its precursor, colorectal adenoma. *Mutat Res*. 2019 Jan-Mar;779:45-57.

Liu, B., Qu, L., Yan, S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int.* 2015 Nov 5;15:106.

Liu W, Zhang J, Yao X, y cols. Bevacizumab-enhanced antitumor effect of 5-fluorouracil via upregulation of thymidine phosphorylase through vascular endothelial growth factor A/vascular endothelial growth factor receptor 2-specificity protein 1 pathway.. *Cancer Sci.* 2018 Oct;109(10):3294-3304.

Lizarbe MA, Calle-espínosa J, Fernández-lizarbe E, y cols. Colorectal Cancer : From the Genetic Model to Posttranscriptional Regulation by Noncoding RNAs.. *Colorectal cancer: from the genetic model to posttranscriptional regulation by noncoding RNAs.* BioMed Research International, 2017 (735426). pp. 1-39. ISSN 2314-6133, ESSN: 2314-6141

Loke MF, E.G. Chua, H.M. Gan, y cols Metabolomics and 16S rRNA sequencing of human colorectal cancers and adjacent mucosa *PLoS One.* 2018 Dec 21;13(12):e0208584

Loo JM, Scherl A, Nguyen A, y cols. Extracellular metabolic energetics can promote cancer progression. *Cell.* 2015 Jan 29;160(3):393-406.

Lopez-Arribillaga, E.; Rodilla, V.; Espinosa, L. *Future Oncol.* 2019 Feb;15(4):345-347.

Lu J, Harrison RA, Li L, y cols. KRAS G12C Drug Development: Discrimination between Switch II Pocket Configurations Using Hydrogen/Deuterium-Exchange Mass Spectrometry. *Structure.* 2017 Sep 5;25(9):1442-1448.e3.

Luo, D.; Liu, Q.; Yu, W.; y cols. Prognostic value of distant metastasis sites and surgery in stage IV colorectal cancer: a population-based study. *Int J Colorectal Dis.* 2018 Sep;33(9):1241-1249

Lyman GH, Moses HL. Biomarker y cols . Tests for Molecularly Targeted Therapies- The Key to Unlocking Precision Medicine. *N Engl J Med.* 2016 Jul 7;375(1):4-6.

Ma Y, Zhang P, Wang F, y cols. An integrated proteomics and metabolomics approach for defining oncofetal biomarkers in the colorectal cancer. *Ann Surg.* 2012 Apr;255(4):720-30.

Ma YL, H.-L. Qin, W.-J. Liu, y cols. Ultra-high performance liquid chromatography–Mass spectrometry for the metabolomic analysis of urine in colorectal cancer. *Dig Dis Sci.* 2009 Dec;54(12):2655-62.

Ma, J.; Lin, Y.; Zhan, M. y cols. Differential miRNA expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of lung cancer.. *Lab Invest.* 2015 Oct;95(10):1197-206.

Maida, M.; Macaluso, F.S.; Ianiro, G.; y cols. Screening of colorectal cancer: present and future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017 Dec;17(12):1131-1146.

Maiertaler, M.; Benner, A.; Hoffmeister, M.; y cols. Plasma miR-122 and miR-200 family are prognostic markers in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2017 Jan 1;140(1):176-187.

Maisonial-Besset A, Witkowski T, Navarro-Teulon I, y cols . Tetraspanin 8 (TSPAN 8) as a potential target for radio-immunotherapy of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Mar 28;8(13):22034-22047.

Mal M, Koh PK, Cheah PY, y cols. Metabotyping of human colorectal cancer using two-dimensional gas chromatography mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Apr;403(2):483-93.

Manne U, Jadhav T, Putcha BK, y cols . Molecular Biomarkers of Colorectal Cancer and Cancer Disparities: Current Status and Perspect *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2016 Dec;12(6):332-344.

Mármol I, Sánchez-de-diego C, Dieste AP, y cols : A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 19;18(1). pii: E197.

Marshall, K.W.; Mohr, S.; Khettabi, F.E.; y cols. A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2010 Mar 1;126(5):1177-86.

Maurel, J.; Nadal, C.; Garcia-Albeniz, X.; y cols. Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patient *Int J Cancer*. 2007 Sep 1;121(5):1066-71.

Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS y cols. Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2015 Dec;16(16):1639-50.

Mima K, Nishihara R, Yang J, y cols .MicroRNA MIR21 (miR-21) and PTGS2 expression in colorectal cancer and patient survival. *C Clin Cancer Res*. 2016 Aug 1;22(15):3841-8.

Ming-Chun Jiang, Jiao-Jiao Ni, Wen-Yu y cols. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities.. *Am J Cancer Res*. 2019 Jul 1;9(7):1354-1366.

Miyo, M.; Konno, M.; Nishida, N. y cols. Metabolic Adaptation to Nutritional Stress in Human. *Colorectal Cancer*. *Sci Rep*. 2016 Dec 7; 6: 38415.

Mody, K.; Baldeo, C.; Bekaii-Saab, T. Antiangiogenic Therapy in Colorectal Cancer.. *Cancer J*. 2018 Jul/Aug;24(4):165-170

Molina-Vila MA, Bertran-Alamillo J, Reguart N, y cols A sensitive method for detecting EGFR mutations in non-small cell lung cancer samples with few tumor cells. *J Thorac Oncol*. 2008 Nov;3(11):1224-35.

Montagut C, Argilés G, Ciardello F y cols. Efficacy of Sym004 in patients with metastatic colorectal cancer with acquired resistance to antiEGFR therapy and molecularly selected by circulating tumor DNA analyses: a phase 2 randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2018 Apr 12;4(4):e175245.

Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, y cols. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med.* 2012 Jan 22;18(2):221-3.

Morano, F.; Sclafani, F. Duration of first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Translating the available evidence into general recommendations for routine practice. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018 Nov;131:53-65

Nakaji Y, Oki E, Nakanishi R, y cols. Prognostic value of BRAF V600E mutation and microsatellite instability in Japanese patients with sporadic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017 Jan;143(1):151-160

Negi, R.R.; Rana, S.V.; Gupta, V.; y cols. Over-Expression of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019 Jun 1;20(6):1675-1681.

Nishiumi S, T. Kobayashi, A. Ikeda, y cols. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer. *PLoS One.* 2012;7(7): e40459

Nishiumi S, Kobayashi T, Kawana S, y cols. Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography / triple-quadrupole mass spectrometry. *Oncotarget.* 2017 Mar 7;8(10):17115-17126.

Nixon, A.B.; Sibley, A.; Hatch, A.J.; y cols. Blood-based biomarkers in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFOX or FOLFIRI plus bevacizumab (Bev), cetuximab (Cetux), or Bev plus Cetux: Results from CALGB 80405 (Alliance). *J Clin Oncol* 2016 May; 34 (suppl 15 ):3597-3597

Nosho K, Igarashi H, Nojima M, Iy cols. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis.* 2014 Apr;35(4):776-83.

Ogino, S.; Kirkner, G.J.; Nosho, K.; y cols. Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 15;14(24):8221-7

Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM y cols. Durable clinical Benefit with Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2018 Mar 10;36(8):773-779.

Overman MJ, McDermott R, Leach JL y cols. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label multicentre, phase 2 Study. *Lancet Oncol.* 2017 Sep;18(9):1182-1191.

Pack SC, Kim HR, Lim SW, y cols. Usefulness of plasma epigenetic changes of five major genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2013 Jan;28(1):139-47.

Pagès F, André T, Taieb J, y cols. Prognostic and predictive value of the Immunoscore in stage III colon cancer patients treated with oxaliplatin in the prospective IDEA France PRODIGE-GERCOR cohort study. *Ann Oncol.* 2020 Jul;31(7):921-929.

Pakiet, A.; Kobiela, J.; Stepnowski, P. y cols. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: A review. *Lipids Health Dis.* 2019 Jan 26;18(1):29

Park S, Song CS, Yang H, y cols. Field Cancerization in Sporadic Colon Cancer. *Gut Liver.* 2016 Sep 15;10(5):773-80.

Pate, K.T.; Stringari, C.; Sprowl-Tanio, S.; y cols. Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *EMBO J.* 2014 Jul 1;33(13):1454-73.

Pattison AM, Merlino DJ, Blomain ES, y cols. Guanylyl cyclase C signaling axis and colon cancer prevention. *World J Gastroenterol.* 2016 Sep 28;22(36):8070-7.

Pedersen SK, Mitchell SM, Graham LD, y cols. CAHM, a long non-coding RNA gene hypermethylated in colorectal neoplasia. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society*; 2014. p. 9.

Peng Q, Zhang X, Min M, y cols. The clinical role of microRNA-21 as a promising biomarker in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017 Jul 4;8(27):44893-44909.

Phallen, J.; Sausen, M.; Adleff, V.; y cols. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med.* 2017 Aug 16;9(403):eaan2415

Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, y cols. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2015 Mar;51(5):587-94

Pinto, C.; Antonuzzo, L.; Porcu, L.; y cols.. Efficacy and Safety of Bevacizumab Combined With Fluoropyrimidine Monotherapy for Unfit or Older Patients With Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-A *Clin Colorectal Cancer.* 2017 Jun;16(2):e61-e72.

Qian X, Yu J, Yin Y, y cols . MicroRNA-143 inhibits tumor growth and angiogenesis and sensitizes chemosensitivity to oxaliplatin in colorectal cancers. *Cell Cycle.* 2013 May 1;12(9):1385-94

Quandt, D.; Dieter Zucht, H.; Amann, A.; y cols. Implementing liquid biopsies into clinical decision making for cancer immunotherapy. *Oncotarget.* 2017 Jul 18;8(29):48507-48520

REDECAN. Red Española de Registros de Cáncer. [último acceso el 11/01/21].

Reguart N, Teixido C, Gimenez-Capitan A, y cols. Identification of ALK, ROS1, and RET Fusions by a Multiplexed mRNA-Based Assay in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Samples from Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Clin Chem*. 2017 Mar;63(3):751-760.

Reinert T, Henriksen TV, Christensen E y cols. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients with Stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2019 Aug 1;5(8):1124-1131.

Ren A, Dong Y, Tsoi H, y cols. Detection of miRNA as Non-Invasive Biomarkers of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2015 Jan 27;16(2):2810-23.

Rödel C, Graeven U, Fietkau R, y cols. Oxaliplatin added to fluorouracil-based preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy of locally advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 study): final results of the multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015 Aug;16(8):979-89

Rodia MT, Solmi R, Pasini F, y cols. LGALS4, CEACAM6, TSPAN8, and COL1A2: Blood Markers for Colorectal Cancer-Validation in a Cohort of Subjects With Positive Fecal Immunochemical Test Result. *Clin Colorectal Cancer*. 2018 Jun;17(2):e217-e228.

Rodia MT, Ugolini G, Mattei G, y cols. Systematic large-scale meta-analysis identifies a panel of two mRNAs as blood biomarkers for colorectal cancer detection. *Oncotarget*. 2016 May 24;7(21):30295-306.

Rosell R, Moran T, Queralt C, y cols. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009 Sep 3;361(10):958-67.

Rowland A, Dias MM, Wiese MD, y cols. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015 Jun 9;112(12):1888-94.

Ruiz-lópez L, Blancas I, Garrido JM, y cols. The role of exosomes on colorectal cancer: A review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Apr;33(4):792-799.

Sabry D, El-Deek SEM, Maher M, y cols. Role of miRNA-210, miRNA-21 and miRNA-126 as diagnostic biomarkers in colorectal carcinoma: impact of HIF-1 $\alpha$ -VEGF signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. 2019 Apr;454(1-2):177-189

Sahengbieke, S.; Wang, J.; Li, X.; y cols. Circulating cell-free high mobility group AT-hook 2 mRNA as a detection marker in the serum of colorectal cancer patients. *J Clin Lab Anal* 2018, 32, e22332. *J Clin Lab Anal*. 2018 May;32(4):e22332.

Salazar R, Roepman P, Capella G, y cols. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 1;29(1):17-24.

Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E y cols. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 20;26(12):2013-9.

Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C y cols. Dual-Targeted therapy with Trastuzumab and Lapatinib in treatment refractory, KRAS codon 12/12 wild-Type, HER2 positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jun ;17(6):738-746.

Sastre J, García-Alfonso P, Viéitez JM, y cols. Influence of BRAF and PIK3CA mutations on the efficacy of FOLFIRI plus bevacizumab or cetuximab as first-line therapy in patients with RAS wild-type metastatic colorectal carcinoma and <3 baseline circulating tumour cells: the randomised phase II VISNÚ-2 study. *ESMO Open*. 2021 Apr;6(2):100062

Sastre J, Maestro ML, Gómez-España A, y cols. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study. *Oncologist*. 2012;17(7):947-55

Satoh, K.; Yachida, S.; Sugimoto, M.; y cols. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Sep 12;114(37): E7697-E7706.

Schmoll HJ, Tabernero J, Maroun J, y cols. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results of the NO16968 randomized controlled phase III trial. *J Clin Oncol*. 2015 Nov 10;33(32):3733-40.

Schmoll HJ, Twelves C, Sun W, y cols. Effect of adjuvant capecitabine or fluorouracil, with or without oxaliplatin, on survival outcomes in stage III colon cancer and the effect of oxaliplatin on postrelapse survival: a pooled analysis of individual patient data from four randomized controlled trials. *Lancet Oncol*. 2014 Dec;15(13):1481-1492

Scholer, L.V.; Reinert, T.; Orntoft, M.W.; y cols. Clinical Implications of Monitoring Circulating Tumor DNA in Patients with Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017 Sep 15;23(18):5437-5445.

Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M y cols. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of Panitumumab plus modified fluorouracil, Leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2014 Jul 20;32(21):2240-7

Seligmann JF, Fisher D, Smith CG, y cols. Investigating the poor outcomes of BRAF-mutant advanced colorectal cancer: analysis from 2530 patients in randomised clinical trials. *Ann Oncol.* 2017 Mar 1;28(3):562-568

Sheikine Y, Kuo FC, Lindeman NI y cols . Clinical and Technical Aspects of Genomic Diagnostics for Precision Oncology. *J Clin Oncol.* 2017 Mar 20;35(9):929-933.

Sheng J, Sun H, Yu FB, y cols. The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer. *Int J Med Sci.* 2020 Apr 27;17(8):1095-1101.

Shimura T, Iwasaki H, Kitagawa M, y cols. Urinary Cysteine-Rich Protein 61 and Trefoil Factor 3 as Diagnostic Biomarkers for Colorectal. *Transl Oncol.* 2019;12(3):539-44. *Transl Oncol.* 2019 Mar;12(3):539-544.

Shirahata A, Hibi K. Serum Vimentin Methylation as a Potential Marker for Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2014 Aug;34(8):4121-5.

Shou X, Li Y, Hu W, y cols. Six-gene Assay as a new biomarker in the blood of patients with colorectal cancer: establishment and clinical validati *Mol Oncol.* 2019 Apr;13(4):781-791.

Shuji Ogino, Gregory J. Kirkner, y cols. Cyclooxygenase-2 Expression is an Independent Predictor of Poor Prognosis in Colon Cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 15; 14(24): 8221–8227.

Siegel R, Miller K, Jemal A y cols *Cancer Statistics 2020.* *CA Cancer J Clin.* 2020 Jan;70(1):7-30

Siena S, Di Bartolomeo M, Pratap K y cols. A phase II, multicenter, open-label study of trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients (pts) with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (mCRC): DESTINYCRC01. *J Clin Oncol* 2020 May; 38(suppl 15): 4000-4000

Siena S, Rivera F, Taieb J, y cols. Survival Outcomes in Patients With RAS Wild Type Metastatic Colorectal Cancer Classified According to Kohne Prognostic Category and BRAF Mutation Status. *Clin Colorectal Cancer.* 2018 Mar;17(1):50-57. e8

Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2012 Mar 15;18(6):1506-12.

Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, y cols. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol.* 2015 Jan;26(1):13-21.

Stintzing S, Modest DP, Rossius L, y cols. FIRE-3 investigators. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Oct;17(10):1426-1434.

Sugiyama, M.; Oki, E.; Nakaji, Y.; y cols. High expression of the Notch ligand Jagged-1 is associated with poor prognosis after surgery for colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2016 Nov;107(11):1705-1716.

Sun Q, Liu Y, Liu B, y cols. Use of Liquid Biopsy in Monitoring Colorectal Cancer Progression Shows Strong Clinical Correlation. *Am J Med Sci.* 2018 Mar;355(3):220-227.

Tabernero J, Grothey A, Van Cutsem E, y cols. Encorafenib Plus Cetuximab as a New Standard of Care for Previously Treated *BRAF* V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Updated Survival Results and Subgroup Analyses from the BEACON Study. *J Clin Oncol.* 2021 Feb 1;39(4):273-284.

Tabernero J, Melero I, Ros W y cols. Phase Ia and Ib studies of the novel carcinoembryonic antigen (CEA) T-cell bispecific (CEA CD3 TCB) antibody as a single agent and in combination with atezolizumab: Preliminary efficacy and safety in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol.* 2017 May;35 suppl 15:( 3002-3002)

Taieb J, Shi Q, Pederson L, y cols. 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 Sep 1;30(9):1466-1471

Tan SSL, Khin LW, Wong L, y cols. Sphingosine kinase 1 promotes malignant progression in colon cancer and independently predicts survival of patients with colon cancer by competing risk approach in South asian population *Clin Transl Gastroenterol.* 2014 Feb 27;5(2): e51.

Tanaka K, Shiota G, Meguro M, y cols. Loss of imprinting of long QT intronic transcript 1 in colorectal cancer. *Oncology.* 2001;60(3):268-73

Tanaka N, Mashima T, Mizutani A, y cols . APC Mutations as a Potential Biomarker for Sensitivity to Tankyrase Inhibitors in Colorectal Cancer . *Mol Cancer Ther.* 2017 Apr;16(4):752-762.

Tarragó-Celada, J.; Foguet, C.; Tarrado-Castellarnau, M.; y cols Cysteine and folate metabolism are targetable vulnerabilities of metastatic colorectal cancer. *Colorectal Cancer. Cancers (Basel).* 2021 Jan 23;13(3):425

Tateishi Y, Okudela K, Mitsui H, y cols. The potential role of microRNA-31 expression in early colorectal cancer. *Pathol Int.* 2015 Oct;65(10):513-8

Thomas J, Ohtsuka M, Pichler M, y cols. MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2015 Nov 25;16(12):28063-76

Timothy Iveson, Alberto F. Sobrero, Takayuki Yoshino, y cols and on behalf of the IDEA Collaboration. Prospective pooled analysis of four randomized trials investigating duration of adjuvant (adj) oxaliplatin-based therapy (3 vs 6 months {m})

for patients (pts) with high-risk stage II colorectal cancer (CC). *J Clin Oncol* 2019 May 20; (suppl 15): 3501-3501

Tournigand C, André T, Achille E y cols. FOLFIRI followed by FOLFOX-6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 15;22(2):229-37

Tsai W, Chen J, Shao H, y cols. Circulating Tumor Cell Count Correlates with Colorectal Neoplasm Progression and Is a Prognostic Marker for Distant Metastasis in Non-Metastatic Patients. *Sci Rep*. 2016 Apr 14;6:24517

Tsukamoto, M.; Iinuma, H.; Yagi, T.; y cols. Circulating Exosomal MicroRNA-21 as a Biomarker in Each Tumor Stage of Colorectal Cancer. *Oncology*. 2017;92(6):360-370.

Tume L, Cisneros C, Sevillano J, y cols. Desregulación de microARN en el cáncer : un enfoque terapéutico y diagnóstico. *Gac Mex Oncol*. 2016;15(5):298-304.

Tupá V, Draho S, Grendár M, y cols. Expression and association of carbonic anhydrase IX and cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Pathology, Research and Practice*. 2019 Apr;215(4):705-711.

Turano P, Turano P. Colorectal cancer: the potential of metabolic fingerprinting. *Gastroenterol Hepatol*. 2014 Nov; 8(8):847-9

Turati F, Bravi F, Di Maso M, y cols. Adherence to the World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research recommendations and colorectal cancer risk. *Eur J Cancer*. 2017 Nov; 85:86-94

Twelves C, Scheithauer W, McKendrick J, y cols. Capecitabine versus 5-fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results from the X-ACT trial with analysis by age and preliminary evidence of a pharmacodynamic marker of efficacy. *Ann Oncol*. 2012 May;23(5):1190-1197.

Uchiyama K, N. Yagi, K. Mizushima, y cols. Serum metabolomics analysis for early detection of colorectal cancer. *J Gastroenterol*. 2017 Jun; 52 (6):677-694.

Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016 Aug;27(8):1386-422

Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH y cols. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan plus Cetuximab treatment and RAS mutation in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Mar 1;33(7):692-700.

Van der Valk MJM, Hilling DE, Bastiaannet E, y cols. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International

Watch & Wait Database (IWWD): an international multicentre registry study. *Lancet*. 2018 Jun 23;391(10139):2537-2545

Van Geel RMJM, Tabernero J, Elez E y cols. A phase Ib dose-escalation study of Encorafenib and Cetuximab with or without Alpelisib in metastatic BRAF-mutant colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2017 Jun;7(6):610-619

Veneables W, Ripley B, Hornik K, Gebhdart A. Bundle of MASS class, nnet, spatial. 7. 2-42 ed (2008).

Venook A, Niedzwiecki D, Lenz HJ y cols. Effect of first-line chemotherapy combined with cetuximab or bevacizumab on overall survival in patients with KRAS wild-type advanced or metastatic colorectal cancer: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2017 Jun 20;317(23):2392-2401.

Vera R, González-Flores E, Rubio C, y cols. Multidisciplinary management of liver metastases in patients with colorectal cancer: a consensus of SEOM, AEC, SEOR, SERVEI and SEMNIM. *Clin Transl Oncol*. 2020 May;22(5):647-662.

Verhoeff SR, van Erning FN, Lemmens VE, y cols. Adjuvant chemotherapy is not associated with improved survival for all high-risk factors in stage II colon cancer. *Int J Cancer*. 2016 Jul 1;139(1):187-93

Waldman, S.A.; Hyslop, T.; Schulz, S.; y cols. Association of GUCY2C expression in lymph nodes with time to recurrence and disease-free survival in pN0 colorectal cancer. *JAMA*. 2009 Feb 18;301(7):745-52.

Wang X, Ding X, Nan L, y cols Investigation of the roles of exosomes in colorectal cancer liver metastasis. *Oncol Rep*. 2015 May;33(5):2445-53.

Wang X, Kuang Y, Hu X y cols Advances in epigenetic biomarker research in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 21;20(15):4276-87.

Wang Z, Su M, Xiang B, y cols. Circular RNA PVT1 promotes metastasis via miR-145 sponging in CRC. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 May 14;512(4):716-722

Wang, Y.-N.; Zeng, Z.-L.; Lu, J.; y cols. CPT1A-mediated fatty acid oxidation promotes colorectal cancer cell metastasis by inhibiting anoikis. *Oncogene*. 2018 Nov ;37(46):6025-6040.

Wang, Z, Y. Lin, J. Liang, Y. y cols. NMR-based metabolomic techniques identify potential urinary biomarkers for early colorectal cancer detection. *Oncotarget*. 2017 Nov 11;8(62):105819-105831

Warren JD, Xiong W, Bunker AM, y cols. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med*. 2011 Dec 14;9:133.

Watson JT, Sparkman OD. Introduction to mass spectrometry : instrumentation, applications and strategies for data interpretation. 4th ed. John Wiley & Sons, Chichester,England ; Hoboken, NJ, (2007)

Weickhardt, A.J.; Williams, D.S.; Lee, C.K.; y cols Vascular endothelial growth factor D expression is a potential biomarker of bevacizumab benefit in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015 Jun 30;113(1):37-45.

Weinberg DS, Lin JE, Foster NR, y cols. Bioactivity of Oral Linaclotide in Human Colorectum for Cancer Chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2017 Jun;10(6):345-354.

Wen T, Gao L, Wen Z, y. colos. Exploratory investigation of plasma metabolomics in human lung adenocarcinoma. *Mol Biosyst*. 2013 Sep;9(9):2370-8

Wilson ID. Chromatographic and Electrophoretic Separations Combined with Mass Spectrometry for Metabonomics. In: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, eds. *The handbook of metabonomics and metabolomics*. 1st ed. Elsevier, Amsterdam; Boston. 149-170 (2007)

Wirbel, J. Pyl PT, Kartal E, Zych K y cols . Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nat Med*. 2019 Apr;25(4):679-689.

Wishart D, Tzur D, Knox C, y cols. HMDB: the Human Metabolome Database.. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan;35(Database issue): D521-6.

Wu, Q.B.; Sun, G.P. Expression of COX-2 and HER-2 in colorectal cancer and their correlation. *World J Gastroenterol*. 2015 May 28;21(20):6206-14.

Xiao Z, Li B, Wang G, y cols. Validation of methylation-sensitive highresolution melting (MS-HRM) for the detection of stool DNA methylation in colorectal neoplasms. *Clin Chim Acta*. 2014 Apr 20;431:154-63.

Xiu, M.X.; Liu, Y.M.; Kuang, B.H. The oncogenic role of Jagged1/Notch signaling in cancer. *Biomed Pharmacother*. 2020 Sep;129:110416.

Yamada, T.; Matsuda, A.; Koizumi, M.; y cols. Liquid Biopsy for the Management of Patients with Colorectal Cancer. *Digestion*. 2019;99(1):39-45.

Yan S, Liu Z, Yu S, y cols. Diagnostic Value of Methylated Septin9 for Colorectal Cancer Screening : A Meta-Analysis. *Med Sci Monit*. 2016 Sep 25;22:3409-3418.

Yang F, Xie Y, Tang S, y cols. miR-143 regulates proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells and exhibits altered expression in colorectal cancer tissue. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Sep 15;8(9):15308-12.

Yang L, Sun Y, Huang X-E, y cols. Carcinoma Microsatellite Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Stage II

Rectal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(4):1545-51

Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, y cols. Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and *Ann Oncol*. 2018 Jan 1;29(1):44-70

Yu S, Cao H, Shen B, y cols Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. *Oncotarget*. 2015 Nov 10;6(35):37151-68.

Zelli V, Compagnoni C, Capelli R, y cols. Circulating MicroRNAs as Prognostic and Therapeutic Biomarkers in Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Pers Med*. 2020 Aug 22;10(3):98

Zhang M, He Y, Zhang X, y cols. A pooled analysis of the diagnostic efficacy of plasmic methylated septin-9 as a novel biomarker for colorectal cancer. *Biomed Rep*. 2017 Oct;7(4):353-360.

Zhang Y, Chen J, He X, y cols. SATB2 is a Promising Biomarker for Identifying a Colorectal Origin for Liver Metastatic Adenocarcinomas. *EBioMedicine*. 2018 Feb;28:62-69.

Zhang Y, Du Y, Song Z, y cols. Profiling of serum metabolites in advanced colon cancer using liquid chromatography-mass spectrometry. *Oncol Lett*. 2020 Jun;19(6):4002-4010.

Zhou J, Li X, Chen Z, y cols. Tumor-derived exosomes in colorectal cancer progression and their clinical applications. *Oncotarget*. 2017 Aug 10;8(59):100781-100790.

Zonta G, Anania G, Feo C, y cols. Use of gas sensors and FOBT for the early detection of colorectal cancer. *Sens Actuators B* 2018 Jun; 262: 884-891

