



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Programa de Doctorado de Medicina

2018

Análisis de *RAS* en plasma en cáncer colorrectal metastásico: impacto de la fracción mutante alélica en pronóstico

Tesis doctoral presentada para optar al grado de Doctor

Enrique Sanz García

Directores de Tesis Doctoral

Josep Maria Tabernero Caturla

María Elena Élez Fernández

Tutor de Tesis Doctoral

Albert Selva O'Callaghan

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Enrique y María del Carmen. Sin su apoyo incondicional el camino hasta llegar a esta tesis no hubiera sido posible. Gracias por la educación y los valores que me habéis transmitido desde la infancia hasta hoy.

A Franc, mi compañero de viaje y sufridor durante la elaboración de esta tesis. Sin tu comprensión, ánimo y sin tu ayuda en la edición no hubiera sido posible llegar a puerto sano, salvo y a tiempo.

A Raúl, mi hermano por estar siempre en los momentos buenos y malos, y por tu apoyo sin esperar nada a cambio.

A mis directores de tesis, Elena y Josep. Elena, sin tu papel como tutora de insistir en que hiciera la tesis, no hubiera dado el paso de matricularme a los estudios de doctorado. Gracias por todas las oportunidades que me has dado estos años. Lo que soy científica y médicamente te lo debo en una gran parte a ti. Éste es nuestro primer gran trabajo juntos. Espero poder seguir colaborando y trabajando aunque sea a la distancia contigo muchos años más. A Josep por darme la oportunidad de trabajar al acabar la residencia como investigador clínico en uno de los servicios de Oncología más importantes de Europa. Gracias por tu apoyo cuando tuve que tomar decisiones complicadas y por la labor tan importante que has realizado en mi formación y en la supervisión de esta tesis.

A todo el equipo de tumores gastrointestinales del Hospital Vall d'Hebron con el que trabajé durante la elaboración de esta tesis: Teresa, Jaume, María, Guillem, Tamara, Helena y Nacho. Muy especialmente a Nuria Mulet, pilar fundamental profesional y colaboradora activa en esta tesis. Un claro ejemplo de que en el trabajo también se pueden forjar amistades duraderas y sólidas.

A Ana Vivancos que pese a no ser directora de esta tesis, me ha ayudado a comprender mejor los resultados obtenidos y a profundizar más sobre la secuenciación y la biología molecular del cáncer. Gracias por tus ideas y por tus sugerencias durante todo este proceso. Asimismo, gracias a tu equipo de laboratorio por su paciencia.

A Francesco Mancuso, por su impagable ayuda en el análisis estadístico que como siempre tan arduo y complejo resulta para los profanos en la materia.

A Ariadna García, por su ayuda en el procesamiento y análisis de las muestras y por ser mi confidente emocional en los momentos más complicados de la tesis.

A mis compañeros del servicio de Oncología de Vall d'Hebron. A Ana Oaknin, por ser mi otra gran mentora y por qué ojalá nos volvamos a cruzar en algún momento de nuevo de nuestra carrera profesional. A Mercè Biosca y Natalia Iriarte, otro ejemplo de amistad sólida en el trabajo y por enseñarme que la oncología es mucho más de lo que esperaba. A mis co-residentes, Ana Garrido y Ana Martínez por tanto momentos juntos vividos y por tanto apoyo dado y recibido durante los 5 años de residencia. A todos mis residentes mayores y menores porque cada uno me habéis aportado algo durante estos años.

A todo el equipo de Oncología del Hospital Oncológico Clara Campal de Madrid, con los que tengo la suerte y el gran placer de trabajar en la actualidad. En especial a Lolín y César por aguantarme durante la redacción de esta tesis y a Rafa por reforzar mis conocimientos de estadística y por su ejemplo docente.

Y finalmente, y muy especialmente, a todos los pacientes que han participado en este estudio pero también a todos ellos a los que traté o sigo tratando. Esto es por y para vosotros. Espero que esta tesis pueda ser un grano de arena en el conocimiento de esta enfermedad por los que estáis y por los que desgraciadamente ya no estáis con nosotros.

INDICE DE ABREVIATURAS

ASCO: del inglés, American Society Clinical Oncology.

BEAMing: del inglés, beads, emulsion, amplification and magnetics.

BRAF: del inglés, B- rapid accelerated fibrosarcoma oncogene.

cfDNA: DNA circulante y libre.

COLD-PCR: del inglés, coamplification at lower denaturation temperature.

CTC: células tumorales circulantes.

ctDNA: DNA circulante tumoral.

ddPCR: del inglés, droplet-based digital PCR.

dMMR, deficiencia en el sistema de reparación del mismatch

DNA: ácido desoxiribonucleotido

dPCR: PCR digital.

ECOG: del inglés, Grupo Cooperativo Oncológico del Este.

EGFR: receptor del factor de crecimiento epitelial.

EMT: transición epitelio-mesénquima.

ESMO: del inglés, European Society Medical Oncology.

FDA: del inglés, Food and Drug Administration.

FOLFIRI: 5-Fluorouracilo + Leucovorin + Irinotecan.

FOLFOX: 5-Fluorouracilo + Leucovorin + Oxaliplatino.

FOLFOXIRI: 5-Fluorouracilo + Leucovorin + Oxaliplatino + Irinotecan.

FP: fluoropirimidinas.

HR: Hazard Ratio.

IC: intervalo de confianza.

KRAS: del inglés, Kirsten rat sarcoma oncogene.

m: meses.

MAF: fracción mutante alélica.

MAPK: del inglés, Mitogen-Activated Protein Kinases.

mCRC: cáncer colorrectal metastásico.

MSI: inestabilidad de microsatélites.

NGS: del inglés, Next Generation Sequencing.

NRAS: del inglés, Neuroblastoma rat Sarcoma oncogene.

NSS: no estadísticamente significativo.

OS: del inglés, overall survival (supervivencia global).

PCR: reacción de la polimerasa en cadena.

PD: del inglés, progressive disease (progresión de la enfermedad).

PFS: del inglés, progression free survival (supervivencia libre de progresión).

PI3KCA: del inglés, fosfoinositol-3-quinase.

PR: del inglés, partial response (respuesta parcial).

PTEN: del inglés, fosfatidilinositol-3, 4,5-trisfosfato 3-fosfatase.

RFS: del inglés, relapse free survival (supervivencia libre de recaída).

RNA: ácido ribonucleótido.

RR: tasa de respuestas.

rtPCR: PCR en tiempo real.

SD: del inglés, stable disease (enfermedad estable).

XELOX: capecitabina + oxaliplatino.

SUMARIO

| | |
|---|----|
| Resumen | 11 |
| Abstract | 13 |
| 1. Introducción | 15 |
| 1.1 Epidemiología y magnitud del problema | 15 |
| 1.2 Diagnóstico del cáncer colorrectal | 15 |
| 1.3 Tratamiento del cáncer colorrectal | 16 |
| 1.3.1 Tratamiento de la enfermedad localizada (estadio I-III) | 16 |
| 1.3.2 Tratamiento de la enfermedad metastásica | 17 |
| 1.4 Factores pronósticos y predictivos de cáncer colorrectal | 20 |
| 1.4.1 Factores clínicos, analíticos y patológicos | 20 |
| 1.4.2 Factores moleculares pronósticos y predictivos de respuesta | 21 |
| 1.5 Biopsia líquida | 29 |
| 1.5.1 Métodos para la detección del ctDNA | 30 |
| 1.5.2 Aplicabilidad de la determinación de DNA circulante en cáncer | 34 |
| 2. Justificación | 41 |
| 3. Hipótesis | 43 |
| 3.1 Primaria | 43 |
| 3.2 Secundarias | 43 |
| 4. Objetivos | 45 |
| 4.1 Objetivo primario | 45 |
| 4.2 Objetivos secundarios | 45 |
| 5. Material y Métodos | 47 |
| 5.1 Tipo de estudio | 47 |
| 5.2 Selección de la muestra | 47 |
| 5.3 Variables clínicas, patológicas, moleculares y de supervivencia | 48 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.4 | Análisis molecular de las muestras de tejido sólido | 49 |
| 5.5 | Análisis molecular de las muestras de sangre | 51 |
| 5.6 | Análisis estadístico..... | 54 |
| 6. | Resultados | 57 |
| 6.1 | Características basales de la población de estudio | 57 |
| 6.2 | Determinación de <i>RAS</i> en tejido tumoral de la población global..... | 60 |
| 6.3 | Determinación de <i>RAS</i> en plasma de la población global..... | 61 |
| 6.4 | Concordancia de la determinación de <i>RAS</i> en tejido tumoral y sangre | 62 |
| 6.5 | Supervivencia de la población global y en función de <i>RAS</i> | 64 |
| 6.6 | Características de la población con mutación de <i>RAS</i> en plasma | 66 |
| 6.7 | Distribución de la MAF en la población <i>RAS</i> mutado..... | 69 |
| 6.8 | Distribución y correlación de la MAF de <i>RAS</i> por línea..... | 69 |
| 6.9 | Correlación entre la MAF de <i>RAS</i> y la localización del tumor primario | 70 |
| 6.10 | Correlación entre la MAF de <i>RAS</i> y el número de sitios de metástasis..... | 71 |
| 6.11 | Correlación entre la MAF de <i>RAS</i> y la localización de las metástasis | 72 |
| 6.12 | Correlación entre la MAF de <i>RAS</i> y los marcadores tumorales | 73 |
| 6.13 | Correlación de la MAF con respuesta al tratamiento | 74 |
| 6.14 | Impacto de la MAF de <i>RAS</i> en primera línea..... | 75 |
| 6.14.1 | Impacto en PFS y OS según corte optimizado | 75 |
| 6.14.2 | Impacto en PFS y OS según corte de MAF del 1% | 77 |
| 6.14.3 | Impacto en PFS y OS según corte de MAF del 10%..... | 78 |
| 6.15 | Impacto de la MAF de <i>RAS</i> en pronóstico en segunda línea..... | 80 |
| 6.15.1 | Impacto en PFS y OS según corte optimizado (5.8%)..... | 80 |
| 6.15.2 | Impacto en PFS y OS según corte del 1%..... | 81 |
| 6.15.3 | Impacto en PFS y OS según corte del 10%..... | 82 |
| 6.16 | Impacto de la MAF de <i>RAS</i> en pronóstico en tercera línea | 83 |
| 6.17 | Análisis multivariante en primera línea para PFS y OS..... | 84 |

| | |
|---|-----|
| 7. Discusión..... | 85 |
| 7.1 Selección de la muestra..... | 85 |
| 7.2 Principales limitaciones del estudio..... | 86 |
| 7.3 Características de la población de estudio..... | 87 |
| 7.4 Determinación de <i>RAS</i> en tejido tumoral y biopsia líquida..... | 88 |
| 7.5 Concordancia entre la mutación de <i>RAS</i> en tejido sólido y plasma | 89 |
| 7.6 Supervivencia global de la población de estudio global y por mutación de <i>RAS</i> según tejido y plasma | 91 |
| 7.7 Características de la población <i>RAS</i> mutada en plasma seleccionada..... | 92 |
| 7.8 Distribución de la MAF de <i>RAS</i> en la población seleccionada y correlación con el momento de análisis..... | 93 |
| 7.9 Correlación de la MAF de <i>RAS</i> con la lateralidad del tumor primario e impacto en pronóstico | 94 |
| 7.10 Correlación de la MAF de <i>RAS</i> con número y localización de sitios de metástasis..... | 95 |
| 7.11 Correlación de la MAF de <i>RAS</i> con CEA y CA 19.9 e impacto en pronóstico | 95 |
| 7.12 Correlación de la MAF de <i>RAS</i> con respuesta al tratamiento | 96 |
| 7.13 Correlación de la MAF de <i>RAS</i> con pronóstico | 97 |
| 8. Conclusiones..... | 101 |
| 9. Líneas de futuro | 103 |
| 10. Referencias bibliográficas | 105 |
| 11. Índice de tablas | 119 |
| 12. Índice de Figuras..... | 121 |

Resumen

Introducción: A pesar de los importantes avances en el tratamiento del cáncer de colon metastásico (mCRC), la supervivencia sigue siendo corta. Existen diversos factores pronósticos y predictivos que se han de tener en cuenta, entre ellos la mutación del oncogén *RAS* presente en más del 40% de tumores. Esta mutación suele ser determinada en tejido sólido pero dada la imposibilidad en ocasiones de obtener suficiente muestra y la heterogeneidad tumoral, la determinación de dicha mutación en el DNA circulante en sangre (biopsia líquida) puede ser realizada por ejemplo mediante BEAMing (basada en la PCR digital). La hipótesis principal de este estudio es que la determinación cuantitativa de esta mutación (fracción mutante alélica –MAF-) podría ser un factor pronóstico o predictor en mCRC.

Material y métodos: Se trata de un estudio retrospectivo que incluye 110 pacientes procedentes de dos centros. Se han recogido las principales variables clínicas, patológicas y de supervivencia de estos pacientes así como la determinación de *RAS* en tejido sólido por la técnica habitual. La determinación de la MAF en plasma se ha realizado mediante la técnica del BEAMing y se ha establecido la correlación con la mutación en tejido sólido mediante PCR en tiempo real. Se ha analizado el impacto pronóstico en supervivencia global (OS) y libre de progresión (PFS) de la MAF de *RAS* en una población homogénea tratada de forma similar, así como correlación con distintas variables.

Resultados: En el total de la población de estudio, se han detectado 62 pacientes (56.4%) que presentaban en plasma alguna mutación de *RAS* mediante BEAMing. La concordancia entre la determinación mediante PCR en tejido sólido y el BEAMing en plasma fue del 90% con un índice estimado *Kappa* de Cohen 0.80 (IC 95% 0.68-0.91). No se han objetivado diferencias estadísticamente significativas en OS entre la población *RAS* mutada y no mutada en tejido sólido y en plasma. Con el fin de homogeneizar la población para el análisis pronóstico de la MAF de *RAS* se han seleccionado un total de 42 pacientes que no habían recibido cirugía de lesiones metastásicas. No se ha observado correlación estadísticamente significativa con la mayoría de las variables clínicas analizadas salvo localización de metástasis. El análisis de la MAF de *RAS* basal previo al

tratamiento de primera línea reveló una correlación significativa con OS (HR = 3.514; p = 0.00066), siendo los pacientes con menores niveles de MAF de *RAS* los que tienen una OS mayor. Asimismo, los pacientes con menores niveles de MAF presentaron una mayor PFS aunque no fue estadísticamente significativa dicha tendencia. En el análisis multivariante en primera línea la MAF fue un factor pronóstico independiente en OS (HR = 2.73; p = 0.006) y PFS (HR = 3.74; p = 0.049). Asimismo, la MAF fue más alta en aquellos pacientes con progresión de enfermedad como mejor respuesta (p= 0.007).

Conclusiones: La MAF en plasma de *RAS* puede ser un factor pronóstico en los pacientes con mCRC *RAS* mutados pudiendo ayudar al clínico a tomar decisiones sobre el tratamiento de dicha enfermedad. No obstante, dada la naturaleza del estudio, es necesario estudios más amplios y prospectivos que puedan validar el uso de esta técnica en la práctica clínica.

Abstract

Introduction: Despite recent major advances in metastatic colorectal cancer (mCRC), survival is still poor. There are different prognostic and predictive factors to be taken into account, among them, *RAS* mutation which is observed in 40% of all tumors. This mutation is determined in solid biopsy but sometimes, as it is not possible to get enough sample for this determination and due to tumor heterogeneity, this mutational status can be analyzed from circulating DNA in blood (liquid biopsy) using BEAMing for instance (a digital PCR-based technology). The main hypothesis of this study is to analyze whether quantitative determination of this mutation (mutant allele fraction-MAF-) could be a prognostic or predictive factor for *RAS* mutant mCRC.

Material and Methods: This is a retrospective study comprising a total of 110 patients from two different sites. Main clinical, pathological and survival data have been recorded as well as determination of *RAS* mutational status in solid biopsy using routine techniques. MAF determination in plasma has been determined using BEAMing and correlation with mutational status in solid tissue using real time PCR has been analyzed. Prognosis impact in overall survival (OS) and progression free survival (PFS) of *RAS* MAF in a homogenous cohort has been analyzed as well its correlation with different variables.

Results: In the whole population, *RAS* mutation in plasma has been detected with BEAMing in a total of 62 patients (56.4%). Concordance between real time PCR in solid biopsy and BEAMing in plasma is 90% with an estimated Cohen *Kappa* index of 0.80 (95% CI 0.68-0.91). No statistical significant differences in OS have been detected between *RAS* mutant and wild type in solid and liquid biopsy. In order to make population homogenous regarding prognosis impact of *RAS* MAF, a total of 42 patients who have not been operated for metastatic disease have been selected. There are not statistical significant correlations with the most part of the clinical variables except for metastases location. *RAS* MAF prior to first line therapy shows a significant correlation with OS (HR = 3.514; p = 0.00066), as *RAS* MAF is lower in patients with longer OS. Moreover, patients with lower MAF show a trend to longer PFS that is not statistically significant. In the multi-variant

analysis, *RAS* MAF is an independent prognosis factor for OS (HR = 2.73; $p = 0.006$) and PFS (HR = 3.74; $p = 0.049$). Moreover, patients with higher MAF tend to have progressive disease as best response to treatment ($p = 0.007$).

Conclusions: *RAS* MAF in plasma could be an independent prognosis factor in patients with *RAS* mutant mCRC and may help clinicians to make decisions about management of this disease. However, due to the characteristics of this study, prospective studies are needed to validate this technique for the use in the daily practice.

1. Introducción

1.1 Epidemiología y magnitud del problema

El cáncer colorrectal es uno de los principales tumores diagnosticados en el mundo. De acuerdo a los datos publicados a partir de la base de datos de la Organización Mundial de la Salud (GLOBOCAN) del año 2012, se trata de la tercera causa más frecuente de malignidad y es la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo, habiéndose reportado en 2012 1.4 millones de nuevos casos y casi 700000 muertes (1). Dos tercios de los nuevos casos y prácticamente el 60% de las muertes por este tumor se producen en países desarrollados, muy probablemente porque los factores de riesgo para su desarrollo están relacionados con los hábitos de vida del primer mundo: alcohol, tabaco, obesidad, diabetes, sedentarismo y dieta no saludable (2). En la Unión Europea, el cáncer colorrectal se ha convertido en la segunda causa de muerte por cáncer, siendo la estimación para este año de 177400 muertes con mayor incidencia en hombres. Sin embargo, hay datos para la esperanza ya que la mortalidad ha disminuido en la Unión Europea desde 2012 en un 6.7% en los hombres y en un 7.5% en las mujeres (3). En nuestro país, según datos publicados por la Sociedad Española de Oncología Médica, la incidencia estimada en el año 2015 era de 41441, siendo en conjunto, el tumor más frecuentemente diagnosticado en ambos sexos y uno de los pocos cuya incidencia había crecido progresivamente (4). En cuanto a la mortalidad, se estimaba que en nuestro país en ese año habría 15449 muertes, convirtiéndose en la segunda causa de mortalidad por cáncer por detrás del cáncer de pulmón. Pese a que su incidencia puede verse reducida modificando hábitos de vida, la reducción más importante de la incidencia y de la mortalidad viene dado por una mejora en los métodos de cribado (5).

1.2 Diagnóstico del cáncer colorrectal

En la actualidad, hay discrepancia sobre el cribado más eficiente del cáncer colorrectal pero se proponen dos alternativas: la detección de sangre oculta en heces y la colonoscopia (6). La detección de sangre oculta en heces es un método más barato y menos invasivo frente a la segunda opción. 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 (7). En caso de positividad, se deberá realizar una colonoscopia. En el caso de pacientes con familiares de primer grado con cáncer colorrectal o pacientes con enfermedades que predisponen a este cáncer (síndrome de Lynch, enfermedad inflamatoria intestinal entre otras), la edad a partir de la que realizar el cribado disminuye.

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 (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 (8). Se considera estadio I cuando hay afectación maligna hasta la muscular propia, estadio II cuando hay afectación exclusiva de tejidos pericólicas u órganos vecinos y estadio III cuando existen ganglios regionales afectos.

1.3 Tratamiento del cáncer colorrectal

Una vez confirmado el diagnóstico de carcinoma colorrectal se deberá completar estudio de extensión con tomografía computarizada de tórax, abdomen y pelvis y analítica con marcadores tumorales (CEA, CA 19.9) (9). Es importante que el paciente afecto de esta patología sea abordado desde el punto de vista multidisciplinar y la decisión del tratamiento más óptimo sea tomada en los comités de tumores formados por especialistas involucrados en el diagnóstico y manejo del carcinoma colorrectal (10, 11).

1.3.1 Tratamiento de la enfermedad localizada (estadio I-III)

En cuanto a la enfermedad localizada el manejo de la misma va a depender de la localización del tumor primario. El tratamiento inicial del tumor de colon es la cirugía: la extensión de dicha resección dependerá de la distribución de la vascularización y del drenaje linfático. La resección debe incluir al menos 5 cm de margen en cada lado (aunque habitualmente es mayor dada la necesidad de reseccionar todo el intestino irrigado por la misma arteria) y la extirpación al menos de 12 ganglios linfáticos (9). En el caso del tumor de recto, será necesario realizar

una resonancia pélvica y una ecografía endoscópica rectal (12, 13). La recomendación actual es que aquellos tumores por debajo de la reflexión peritoneal con infiltración profunda de la pared y/o ganglios locorreccionales y/o infiltración del mesorrecto sean considerados para tratamiento neoadyuvante con radioterapia o quimio-radioterapia concomitante con 5-fluoropirimidinas, con similar supervivencia global pero mejor control local y menor toxicidad para la segunda (14). En la actualidad, se considera indicado valorar tratamiento adyuvante tras cirugía de cáncer colorrectal en los estadios III con la combinación de fluoropirimidinas y oxaliplatino dado el beneficio en supervivencia libre de progresión y global (15). En el caso del estadio II, el tratamiento adyuvante con quimioterapia debe individualizarse según una serie de factores de riesgo: obstrucción o perforación, CEA elevado, menos de 12 ganglios extirpados, grado histológico, invasión vascular o perineural o afectación de la serosa (9).

1.3.2 Tratamiento de la enfermedad metastásica

En cuanto a la enfermedad metastásica, implica aproximadamente una cuarta parte los casos de neoplasia de colon al diagnóstico si bien es cierto que un 20-40% de los pacientes pueden recaer. En los casos de enfermedad metastásica el pronóstico es más sombrío. De acuerdo al consenso vigente de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO, en sus siglas en inglés) es importante tener en cuenta el estado general del paciente y la extensión de la enfermedad (11) (figura 1). Asimismo, es importante disponer del perfil molecular del tumor, principalmente la determinación de las mutaciones de los oncogenes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF*. En cualquier caso, el papel de la quimioterapia basada en fluoropirimidinas (5-fluorouracilo endovenoso o capecitabina, su prodroga vía oral), leucovorin, oxaliplatino e irinotecan es fundamental; FOLFOX (5-Fluorouracilo + Leucovorin + Oxaliplatino) o XELOX (Capecitabina + Oxaliplatino) o FOLFIRI (5-Fluorouracilo + Leucovorin + Irinotecan) han demostrado beneficio en cáncer colorrectal sin perjuicio de ser utilizados en primera o segunda línea (16). La posibilidad de la combinación de todos estos fármacos, el esquema FOLFOXIRI, ha demostrado mejores resultados en tasa de respuesta y supervivencia libre de progresión si bien es cierto que no se ha comparado

directamente en términos de supervivencia global con el tratamiento secuencial (17).

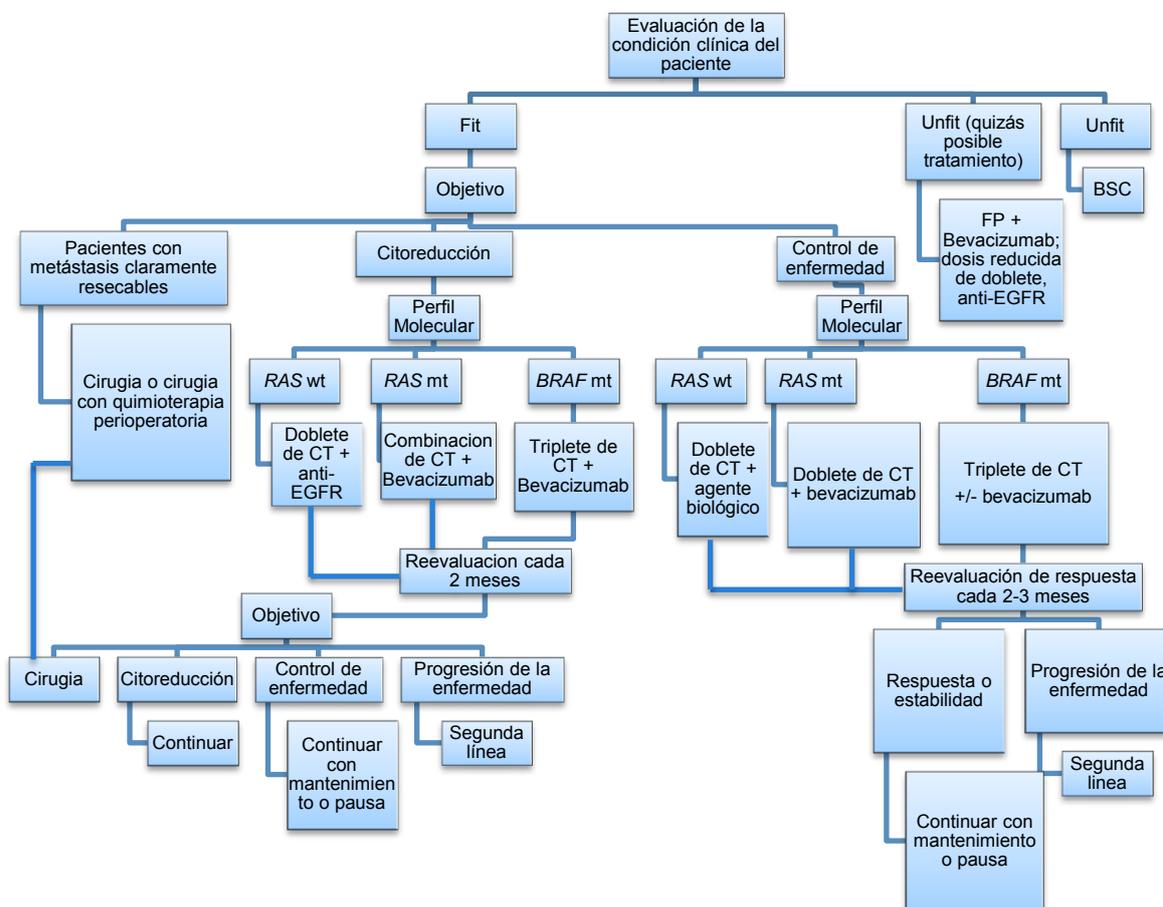


Figura 1. Algoritmo de tratamiento de cáncer colorrectal metastásico propuesto por ESMO (adaptado de la referencia 11).

A este tratamiento se le debe asociar en función del objetivo del tratamiento y de su perfil mutacional anticuerpos monoclonales dirigidos contra la angiogénesis como es el caso de bevacizumab en primera y segunda línea y aflibercept o ramucirumab sólo en segunda línea (18-28) (tabla 1). Otra opción en el caso de ausencia de mutación en los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* son los anticuerpos dirigidos contra la vía del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) tales como cetuximab o panitumumab (29-31).

| Ensayo Clínico | Línea tratamiento | Brazos tratamiento | OS | PFS | RR |
|---|--|---|--|---|---------------------------------|
| NO16966 Saltz et al (18) | 1ª línea | FOLFOX4/XELOX FOLFOX4/XELOX + bevacizumab | 19.9m 21.3m NSS | 8.0m 9.4m HR:0.83 p<0.01 | 38% 38% NSS |
| TRIBE Loupakis et al (19) | 1ª línea | FOLFIRI+ bevacizumab FOLFOXIRI+ bevacizumab | 25.8m 31m HR:0.79 p=0.05 | 9.7m 12.1m HR:0.75 p<0.01 | 53% 65% p<0.01 |
| TML Bennouna et al (24) | 2ª línea tras tratamiento en 1ª línea con bevacizumab | FOLFOX/XELOX/ FOLFIRI FOLFOX/XELOX/ FOLFIRI + bevacizumab | 9.8m 11.2m HR:0.81 p<0.01 | - - - | - - |
| ECOG3200 Giantonio et al(26) | 2ª línea | FOLFOX4 FOLFOX4+ bevacizumab bevacizumab | 10.8m 12.9m 10.2m HR:0.75 p<0.01 | 4.7m 7.3m 2.7m HR:0.61 p<0.01 | 8.6% 22.7% 3.3% p<0.01 |
| VELOUR Van Cutsem et al (27) | 2ª línea con línea previa con o sin bevacizumab | FOLFIRI FOLFIRI- aflibercept | 12.1m 13.5m HR:0.82 p=0.03 | 4.7m 6.9m HR:0.76 p<0.01 | 19% 11.1 % |
| RAISE Taberbero et al (28) | 2ª línea tras tratamiento previo con bevacizumab | FOLFIRI FOLFIRI- ramucirumab | 11.7m 13.3m HR:0.84 p<0.01 | 4.5m 5.7m HR:0.79 p<0.01 | 13% 13% |

Tabla 1. Principales ensayos clínicos mCRC con antiangiogénicos.

(OS: Supervivencia global PFS: Supervivencia libre de progresión RR: Tasa de Respuestas m: meses HR: Hazard Ratio FP: Fluoropirimidinas NSS: no estadísticamente significativo).

En el caso de refractariedad a todos estos tratamientos, las opciones de tratamiento son más limitadas con mínimas respuestas (1%). Regorafenib, un inhibidor multi-tirosin quinasa, ha demostrado un beneficio en torno a un mes (6.4 versus 5.1 meses de placebo; HR: 0.77; p=0.005) en estos pacientes en términos de supervivencia global con un perfil de toxicidad en forma de hipertensión, astenia, diarreas y mucositis no despreciable (32). TAS-102 (una combinación oral de trifluridina, un análogo de la timidina, y tipiracil, un inhibidor de la fosforilasa de la timidina), ha mostrado similar beneficio en supervivencia global (7.1 meses versus 5.3 meses; HR: 0.48; p<0.05) con un perfil de toxicidad similar

a la quimioterapia (náusea, astenia, vómitos, neutropenia y trombocitopenia) (33). La inmunoterapia (nivolumab o pembrolizumab), tratamiento actualmente aprobado en otros tumores, sólo ha demostrado a día de hoy eficacia en tumores colorrectales que presentan deficiencia en el sistema de reparación del DNA caracterizado por la presencia de inestabilidad de microsatélites (34, 35).

1.4 Factores pronósticos y predictivos de cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal metastásico 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 que se conocen como factores predictivos.

1.4.1 Factores clínicos, analíticos y patológicos

A día de hoy, no hay un consenso claro de qué factores clínicos y analíticos son válidos y consistentes como factores pronósticos en cáncer colorrectal a excepción del estadiaje TNM. En cualquier caso, la edad no parece ser un factor pronóstico relevante en estos tumores.

La clasificación pronóstica de Köhne fue propuesta en 2002 previo al conocimiento exhaustivo de la biología molecular (36). En ella, se estableció 3 grupos de riesgo y se basa en el ECOG, los niveles de fosfatasa alcalina, leucocitos y el número de localizaciones metastásicas y ha sido validada externamente en diferentes cohortes de pacientes (37, 38) y en ensayos clínicos fase III en primera y segunda línea de cáncer colorrectal metastásico *RAS* no mutado (39). En cuanto al sitio de localización de metástasis parece que la presencia de enfermedad peritoneal confiere un peor pronóstico en términos de supervivencia (40). Respecto a los marcadores tumorales, en el caso del CEA se trata de un factor pronóstico independiente en estadios precoces tras cirugía (41) Sin embargo, no está claro su papel pronóstico en estadio metastásico. Los datos más recientes muestran que puede ser un factor pronóstico negativo en correlación con otros marcadores como la serpina B5 expresada en el tumor (42). Por otra parte, los niveles de CEA son más elevados en tumores con mutación de *KRAS* y su elevación está asociada a un peor pronóstico (43). En el caso del

marcador tumoral CA 19.9 sí parece que se encuentra más frecuentemente elevado en pacientes con metástasis y sí parece que pudiera ser un factor pronóstico (44) así como para el desarrollo de metástasis pulmonares o peritoneales (45-47). Asimismo, existen también datos que muestran que la presencia de CEA y CA 19.9 en sangre es mayor en pacientes con cáncer colorrectal con metástasis hepáticas siendo factores independientes predictores de supervivencia en pacientes no resecables (48).

En cuanto los factores patológicos, la histología más frecuente de cáncer colorrectal es el adenocarcinoma. Sin embargo, es conocido 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 es debido a las características moleculares de peor pronóstico (49).

1.4.2 Factores moleculares pronósticos y predictivos de respuesta

La biología molecular del cáncer colorrectal es compleja y se debe a la adquisición de distintas mutaciones a lo largo de la carcinogénesis. Algunas de estas alteraciones confieren un peor pronóstico y una resistencia a determinadas terapias. A continuación, se explican las principales alteraciones moleculares en base a las distintas vías alteradas con mención especial a las mutaciones de *KRAS* al ser relevantes para la comprensión de esta tesis. Las recomendaciones actuales de la Sociedad Americana de Oncología Médica y la de Anatomía Patológica es la realización a todos los pacientes con cáncer colorrectal metastásico de las mutaciones en exón 2, 3 y 4 de *KRAS* y *NRAS*, la mutación V600E de *BRAF* y la detección por inmunohistoquímica de la inestabilidad de microsatélites (50).

1.4.2.1 Alteraciones en la vía de las MAPK

La vía de las MAPK (figura 2) es relevante en el desarrollo del carcinoma

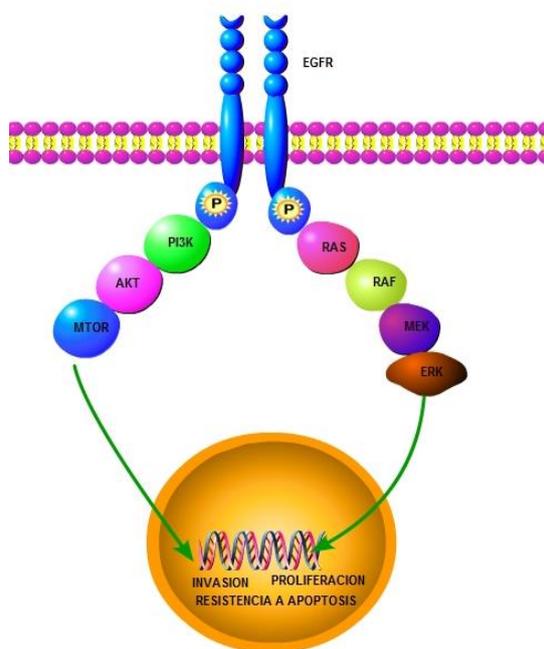


Figura 2. Esquema de la vía de la MAPK y su relación con la vía de PI3KCA.

colorrectal, con casi dos terceras partes de tumores presentando alguna alteración. Éstas suelen tener un impacto pronóstico pero también predictivo de respuesta a algunas terapias como panitumumab y cetuximab.

EGFR

Las alteraciones más descritas en *EGFR* son la sobreexpresión, las mutaciones en su gen y la sobreexpresión de los ligandos (51). La expresión del receptor de membrana EGFR se observa en el 60-80% de los tumores colorrectales mediante inmunohistoquímica (52). Sin embargo, solo

un 20% aproximadamente de los tumores con expresión presentan una amplificación génica. En cualquier caso, no está claro el valor pronóstico ni tampoco el predictivo de respuesta a terapia anti-EGFR, aunque hay datos de que los tumores sin expresión de EGFR podrían responder a cetuximab (53, 54). En cuanto a las mutaciones activadoras en el dominio catalítico de EGFR son pocos frecuentes y son mutaciones de resistencia a terapia anti-EGFR. Entre ellas están la mutación K467T y S492R que se han descrito como mutación de resistencia a cetuximab, no así a panitumumab (55) o la mutación de R451C o G465R de resistencia a ambos fármacos (56). En cuanto a la ganancia del número de copias de este gen es debido a la amplificación del gen o a la polisomía del cromosoma 7 donde se encuentra este gen. La amplificación del gen está asociada con respuesta clínica a cetuximab pero a una menor supervivencia (57-59). Por último, la sobreexpresión de los ligandos del receptor como epiregulina y anfiregulina ha sido postulada como un valor pronóstico positivo a altos niveles de estos ligandos en pacientes tratados con cetuximab (60).

RAS

La proteína RAS es una proteína GTPasa que es capaz de unirse a la membrana citoplasmática y 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: *KRAS*, *NRAS* y *HRAS* que al mutarse 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 (61). En cáncer colorrectal, los oncogenes alterados son con mayor frecuencia en este orden *KRAS* y *NRAS*.

KRAS

KRAS se encuentra mutado en adenocarcinoma de colon en aproximadamente el 40% de los casos. El gen codifica una proteína de 188 aminoácidos que tiene actividad inherente catalítica situándose cercana a la membrana celular. La activación de RAS se produce cuando esta proteína presenta unión a GTP. Cuando hay una mutación en esta proteína, RAS permanece unida en todo momento a GTP y se produce una activación sin control de toda la vía. Los principales lugares de mutación son en este orden: exón 2 (codón 12 y 13), exón 3 (codón 59 y 61) y exón 4 (codón 146). Hasta un 95% de las mutaciones ocurren en exón 2, siendo la más frecuente en el codón 12 un cambio de guanina por adenina (*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 (tabla 2) en función del estadio y del tipo de mutación.

En cuanto al papel como predictor de respuesta, la presencia de mutación en *KRAS* impide un beneficio de panitumumab y cetuximab (62). Desde el punto de vista clínico se observó en una cohorte de 30 pacientes tratados con cetuximab que ninguno de los respondedores presentaban mutación en este oncogén (63). Asimismo, los resultados negativos de los estudios clínicos con cetuximab y panitumumab llevaron a realizar el análisis según el estado de *KRAS* en el exón 2 (codón 12 y 13) (31, 64) y del exón 3 y 4 de *KRAS* tanto para cetuximab (65)

como para panitumumab (66), concluyendo su no beneficio. Un meta-análisis incluyendo un total de 5948 pacientes incluidos en ensayos clínicos fase II y fase III confirma la falta de eficacia de cetuximab y panitumumab si existe mutación en *KRAS* o en *NRAS* (tabla 3) (67). No obstante, existen datos retrospectivos de que la mutación en el codón 13 (G13D) puede tener un mejor resultado con estos anticuerpos en términos de respuesta tumoral y de supervivencia libre de progresión (68).

| Estudio | Muestra | Estadios | Impacto pronóstico | Observación |
|--|---------|--|--|---|
| RASCAL I (Andreyev, 1998)(69) | 2721 | Localizado y avanzado | SI PEOR supervivencia (HR: 1.22; p = 0.02) | Mutaciones en codón 12 y 13 indistintamente |
| RASCAL II (Andreyev, 2001)(70) | 4268 | Localizado y avanzado | SI PEOR supervivencia global (HR: 1.29; p = 0.008) PEOR supervivencia libre de fallo al tratamiento (HR: 1.3; p = 0.004) | Exclusivamente en la mutación G12V |
| QUASAR análisis exploratorio (Hutchins, 2011)(71) | 1913 | Estadio II tratados o no con quimioterapia adyuvante | SI Mayor riesgo de recaída (RR: 1.40; p = 0.002) | Sin diferencias en dicho impacto con el tratamiento de quimioterapia adyuvante. |
| MEMORIALS LOAN KETTERING (Nash, 2010)(72) | 532 | Localizado y avanzado | SI PEOR supervivencia global a 5 años (55% vs 68%; p = 0.002) | Independiente de estadio. Aparente mayor mortalidad en MSS/ <i>KRAS</i> mutado estadio I/II |
| WESTERN WASHINGTON STATE (Phipps, 2013)(73) | 1989 | Localizado y avanzado | SI PEOR supervivencia específica por cáncer de colon (HR: 1.37) | Esta asociación no fue observada en estadios con enfermedad a distancia |
| DANA FARBER (Imamura, 2012)(74) | 1261 | Localizado y avanzado | SI MAYOR mortalidad específica para cáncer colorrectal (HR: 1.30; p = 0.037) | Sólo en mutaciones en codón 12, no en codón 13. |

| Estudio | Muestra | Estadios | Impacto pronóstico | Observación |
|--|---------|--|--|--|
| NORTH CAROLINA AND UTAH (Samowitz, 2000)(75) | 1413 | Localizado y avanzado | NO No diferencias en supervivencia (HR: 1.2; IC95 1-1.4) | Tendencia a peor supervivencia en mutación de codón 13. |
| BRIGHAM AND WOMEN HOSPITAL (Ogino, 2009) (76) | 647 | Localizado y avanzado | NO No diferencias en supervivencia global (HR: 0.98; IC95 0.74–1.28) | No existen diferencias con respecto a supervivencia de cáncer colorrectal |
| PERTH (Wang, 2003)(77) | 396 | Estadios II resecaados | NO No diferencias en riesgo de muerte (RR: 1.06; p = 0.8) | Estudio pequeño que no permite detectar diferencias |
| CALGB8980 3 (Ogino, 2009)(78) | 508 | Estadios III resecaados y tratados con quimioterapia (5FU+/- Irinotecan) | NO No diferencias supervivencia libre de enfermedad (HR: 0.98; IC95 0.73-1.31) ni en supervivencia global (HR: 0.90; IC95 0.64-1.27) | No impacto tampoco según la quimioterapia empleada. |
| PETTAC-3, EORTC 40093, SAK60-00 (Roth 2010)(79) | 1564 | Estadios II y III en adyuvancia con quimioterapia (FOLFIRI vs 5FU) | NO No diferencias en supervivencia libre de recurrencia (HR: 1.05; IC95 0.85-1.28) No diferencias en supervivencia global (HR: 1.09; IC95 0.86-1.38) | No impacto según quimioterapia empleada ni según el codón o el tipo de mutación. |

Tabla 2. Principales estudios sobre el valor pronóstico de la mutación de *KRAS* en cáncer colorrectal.

NRAS

La mutación en *NRAS* está presente en menos de un 5% de los tumores colorrectales y al igual que *KRAS* se encuentra principalmente mutada en exón 2 (codón 12 y 13). Su impacto pronóstico no ha sido claramente establecido aunque parece más prevalentes en el colon izquierdo y en estudios retrospectivos han mostrado un peor pronóstico que los *KRAS* mutados y nativos (80). Por otra parte, es un factor predictivo negativo para terapia anti-EGFR (tabla 3).

| Estudio | L. | Mutación | Tratamiento | PFS (wt) | OS (wt) | PFS (mt) | OS (mt) |
|---|------------------|--|--|---------------------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Quimioterapia vs Quimioterapia + anti-EGFR | | | | | | | |
| CRYS-TAL V. Cutsem et al(81-83) | 1 ^a L | <i>KRAS</i> ex2,3,4 <i>NRAS</i> ex 2,3,4 | FOLFIRI FOLFIRI-cetuximab | 8.4m 11.4m HR 0.56 p=0.02 | 20.2m 28.4m HR 0.56 p<0.01 | 7.5m 7.4m HR 1.05 p=0.5 | 17.7m 16.4m HR 1.05 p=0.6 |
| OPUS Boke-meyer et al(65, 84) | 1 ^a L | <i>KRAS</i> ex2,3,4 <i>NRAS</i> Ex 2,3,4 | FOLFOX4 FOLFOX4-cetuximab | 5.8m 12.0m HR 0.5 p<0.01 | 17.8m 19.8m HR 0.9 p=0.8 | 7.8m 5.6m HR 1.5 p<0.01 | 17.8m 13.5m HR 1.3 p=0.2 |
| COIN Maugh-an et al (85) | 1 ^a L | <i>KRAS</i> <i>NRAS</i> ex2/ codón 61 | FOLFOX FOLFOX-cetuximab | 8.6m 8.6m HR 0.96 p=0.6 | 17.9m 17m HR 1.04 p=0.7 | NR | 14.8m 13.6m HR 0.9 p=0.8 |
| PRIME Doui-llarrd et al(29) | 1 ^a L | <i>KRAS</i> ex2,3,4 <i>NRAS</i> ex 2,3,4 | FOLFOX4 FOLFOX4-panitumumab | 7.9m 10.1m HR 0.72 p<0.01 | 20.2m 26.0m HR 0.78 p=0.04 | 8.7m 7.3m HR 1.3 p<0.01 | 18.7m 15.5m HR 1.2 p=0.04 |
| 200501 81 Peeters et al (86, 87) | 2 ^a L | <i>KRAS</i> ex2,3,4 <i>NRAS</i> Ex 2,3,4 | FOLFIRI FOLFOX-4-panitumumab | 4.6m 6.4m HR 0.7 p<0.01 | 13.9m 16.2m HR 0.81 p=0.08 | 4m 4.8m HR 0.9 p=0.1 | 11.1m 11.8m HR 0.9 p=0.3 |
| PICCO-LO Seymour et al (88) | 2 ^a L | <i>KRAS</i> <i>NRAS</i> ex2 y codón 61 | Irinotecan Irinotecan-panitumumab | 10.5m 10.4m HR 0.91 p=0.4 | NR NR HR 0.78 p=0.04 | NR NR | NR NR |
| 200204 08 Patter-son et al(64, 89) | 3 ^a L | <i>KRAS</i> ex2,3,4 <i>NRAS</i> Ex 2,3,4 | Paliativos Panitumumab | 7s 14s HR 0.36 p<0.01 | NR | NR HR 0.98 p<0.05 | NR |
| Quimioterapia + Bevacizumab vs Quimioterapia + anti-EGFR | | | | | | | |
| PEAK Kart-haus et al (90, 91) | 1 ^a L | <i>KRAS</i> mt exón 2. <i>KRAS</i> ex3,4 y <i>NRAS</i> ex2,3,4 | mFOLFOX-6-bevacizumab mFOLFOX-6-panitumumab | 9.5m 13.0m HR 0.65 p=0.03 | 28.9m 41.4m HR 0.63 p=0.06 | 8.8m 8.4m HR 1.13 p=0.06 | 16.6m 27m HR 0.41 p=0.02 |

Tabla 3. Principales estudios de anticuerpos anti-EGFR en cáncer colorrectal y su impacto en población *RAS* wild type y mutada.

(L: línea; NR: No reportada; ex: exón; HR: Hazard Ratio; mt: mutado; wt: wild type; m: meses; s: semanas).

BRAF

La mutación de *BRAF* en cáncer colorrectal es poco frecuente (8-12%) y asocia a un determinado fenotipo: más frecuente en mujeres, en estadios más avanzados (92), tumores de colon derecho, pobremente diferenciados, con histología mucinosa y con inestabilidad de microsatélites (93-95). Asimismo, parece que presentan más metastasis peritoneales y menos en hígado o pulmón (96, 97).

En cuanto al papel pronóstico de *BRAF* parece que la mutación V600E (más del 90% de casos) es un factor negativo pronóstico aunque su asociación con la inestabilidad de microsatélites debe ser tomada en cuenta (98): en estadios II y III, la mutación de *BRAF* puede ser un factor pronóstico negativo en tumores sin inestabilidad de microsatélites (79) mientras que en el contexto metastásico, también parece que la mutación de *BRAF* confiere una peor supervivencia libre de progresión y global (99) según los datos de análisis retrospectivos de varios estudios (100). El impacto pronóstico parece limitado a supervivencia global (101).

En cuanto al valor predictivo de respuesta de *BRAF* hay más controversia. A pesar de que las respuestas al tratamiento son limitadas, no existen diferencias entre oxaliplatino o irinotecan. Existen datos que avalan mayor beneficio con FOLFOXIRI-bevacizumab aunque no hay diferencias estadísticamente significativas respecto FOLFIRI-bevacizumab (102). En cuanto al valor predictivo de respuesta a anticuerpos anti-EGFR, la mayor parte de los estudios de cohortes reportados muestran una resistencia a los mismos aunque las diferencias no son estadísticamente significativas (29, 65, 85-87, 103-105), excepto en el estudio PICCOLO donde hay un detrimento en supervivencia libre de progresión (88). Estos datos han sido analizados conjuntamente en dos meta-análisis. El primero de ellos sugiere un valor predictivo negativo de esta mutación para el tratamiento con anti-EGFR (106). Por el contrario, el otro sugiere que no hay evidencia suficiente para descartar el uso de estas terapias en estos pacientes (107). La diferencia entre ambos radica en el número de estudios (10 frente a 8, respectivamente) y en la población analizada: mientras que en el primero se compara el resultado de los brazos de tratamiento sólo en *BRAF* mutado, en el segundo se tienen en cuenta también los no mutados. En el caso de los tumores con mutación de *BRAF* se están combinando anti-EGFR con inhibidores de

BRAF, de MEK y de PI3K (98). No obstante, no todas las mutaciones de *BRAF* confieren mal pronóstico: las mutaciones en codones 594/596 tienen un fenotipo distinto y mejor supervivencia que los *BRAF*V600E (108).

1.4.2.2 Alteraciones en la vía de *PI3KCA*

La vía de *PI3KCA* en condiciones normales se encarga de la apoptosis y de estimular el crecimiento celular y la proliferación. En cáncer colorrectal se han descrito principalmente alteraciones en *PI3KCA* y en *PTEN*. A día de hoy, no se recomienda realizar de forma rutinaria el análisis dado que los datos no son consistentes (50).

PI3KCA

Las mutaciones de *PI3KCA* 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 (109). En cuanto al papel pronóstico, diversos meta-análisis realizados han concluido que los tumores con mutación de *PI3KCA* presentan peor tasa de respuesta y de supervivencia libre de progresión aunque parece que mayoritariamente debido a la mutación del exón 20 (110-113). Sin embargo, existen datos contradictorios sobre su papel pronóstico respecto a otras mutaciones en *KRAS* o *BRAF* (109, 114). En cuanto al valor predictivo de respuesta a anti-EGFR, los datos publicados no son suficientes para considerar la mutación de *PI3KCA* como de resistencia a dicha terapia (169). Por otra parte, a pesar de que se ha postulado que el ácido acetilsalicílico reduce el riesgo de cáncer colorrectal y mejora la supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal con mutación de *PI3KCA*, no existen todavía estudios prospectivos (115, 116).

PTEN

PTEN es un gen supresor de tumores que evita la activación de esta vía. En el momento en que hay una pérdida o mutación de este gen, el resultado es que se produce una activación de la vía. Se ha reportado alteraciones de *PTEN* en el 10% de los casos. No hay claramente una asociación pronóstica de acuerdo a 4

revisiones sistemáticas (110, 111, 117, 118). En cuanto al valor predictivo de *PTEN* en terapia anti-EGFR también existen discrepancias: aunque hay estudios que mostraron falta de beneficio en caso de pérdida de *PTEN* (119), otros no mostraron diferencias significativas (120).

1.5 Biopsia líquida

Se conoce como biopsia líquida la posibilidad de determinar en cualquier fluido biológico (sangre, saliva, orina, entre otros) la presencia de algún biomarcador derivado de un tumor (DNA, RNA mensajero, microRNA, proteínas...) que permite el diagnóstico, seguimiento o caracterización de dicha neoplasia. Asimismo, estos biomarcadores pueden estar bien libres en plasma (es el caso del DNA libre circulante) o bien estar en sangre dentro de células tumorales circulantes, exosomas o plaquetas.

Las células tumorales circulantes (CTC) son originarias del tumor y pueden causar metástasis (121). La detección de CTC usando características físicas permite una eficiencia de captura elevada (superior al 80%) al detectar células más grandes que las células sanguíneas nucleadas (122). La otra alternativa consiste en detectar células en función de las moléculas de superficie. Destaca la plataforma conocida como CellSearch® (aprobada por la FDA) que permite detectar marcadores epiteliales como EPCAM, CK19, CEA, CK19, HER2, PSA o KLK2 (123). En cáncer colorrectal metastásico, se demostró que un mayor número de CTC al inicio de un tratamiento confería una peor supervivencia global y libre de progresión (124, 125). Datos similares se reportaron en cáncer de mama y próstata (126). Sin embargo este método tiene sus limitaciones dado que puede no detectar poblaciones celulares que cambian su fenotipo a la progresión o que la expresión de estas moléculas pueden cambiar según el microambiente (127).

Los exosomas son unas vesículas secretadas por las células en condiciones normales y patológicas de aproximadamente 30-100 nanómetros de diámetro con finalidad de comunicación intercelular dado que contienen DNA, RNA, proteínas y lípidos de la célula de origen (128). El exosoma juega un papel muy relevante en la generación de metástasis (129) y existen estudios que concluyen que su

contenido puede ser usado como un factor para predecir los sitios de metástasis (130). La medición cuantitativa de los exosomas puede correlacionar con la malignidad del tumor y su DNA ser un marcador surrogado del tejido sólido (131). Los exosomas tiene mayor estabilidad que el DNA libre pero su aislamiento y purificación es más complejo.

Las plaquetas educadas por el tumor son el producto de la confrontación con la célula tumoral que produce transferencia de biomoléculas (conocido como educación) (132). Asimismo, la activación de receptores de membrana por señales procedentes de las células tumorales pueden inducir cambios en el RNA (133). Esta capacidad hace que el análisis de su RNA pueda ser interesante para el diagnóstico y seguimiento del cáncer como ha demostrado un estudio en el que se pudo distinguir usando el análisis del RNA estas plaquetas con una exactitud del 96% y la localización del tumor primario en un 71% de casos (134).

Sin embargo, el marcador más importante en biopsia líquida es el DNA libre circulante (cfDNA) reportado ya en 1948 por parte de Mandel y Metais (135). La detección de DNA circulante en plasma es habitual en cáncer y en otras condiciones en las que se produce daño celular y necrosis (136). Sin embargo, el uso de esta herramienta para el diagnóstico y seguimiento del cáncer ha sido complicado debido a problemas para discriminar el cfDNA del DNA circulante tumoral (ctDNA) y la presencia de pequeñas cantidades de ctDNA en sangre (sólo un 1% del cfDNA). El ctDNA está libre y procede de células en apoptosis y de la necrosis tumoral (137, 138); presenta 166 pares de bases de las cuales 147 están envueltas alrededor del nucleosoma y el resto permite la unión a la histona H1 (139). La vida media del cfDNA tiene un rango descrito de 16 minutos a 2.5 horas (136). Para poder diferenciar el cfDNA del ctDNA se ha de tener en cuenta dos características: los fragmentos de ctDNA suelen ser más cortos y suelen presentar mutaciones o alteraciones epigenéticas (140).

1.5.1 Métodos para la detección del ctDNA

La detección de ctDNA precisa de técnicas muy sensibles por su baja cantidad en sangre. De hecho los estudios realizados con Sanger mostraron resultados inconsistentes sobre la presencia de ctDNA en sangre comparado con CTC (141).

Dos tecnologías han mejorado la detección de ctDNA en sangre: la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para amplificar el número de copias de DNA (142) y las técnicas de secuenciación masiva (NGS) que permiten realizar rápidamente múltiples lecturas de un fragmento de DNA. La tabla 4 recoge los principales métodos usados en biopsia líquida y sus ventajas y desventajas.

| Técnica | Límite de detección | Ventajas | Desventajas |
|---|----------------------------|---|--|
| PCR en tiempo real (específica para alelo) COLD PCR, ARMS | 1% | Bajo coste Fácil de llevar a cabo | Baja sensibilidad Pocos genes analizados de una vez (baja cobertura) Los genes deben estar previamente definidos |
| PCR digital ddPCR BEAMing | 0.02-0.05% | Alta sensibilidad y especificidad Coste razonable Fácil de realizar si se dispone de tecnología | Pocos genes analizados de una vez (baja cobertura) Los genes deben estar previamente definidos |
| Secuenciación masiva Amplicon based (Illumina, Ion Torrent...) Secuenciación exómica/genómica completa | 0.01-2% | Puede analizar a la vez muchos genes (alta cobertura) Se pueden analizar genes sin estar previamente definidos | Sensibilidad variable dependiendo de la técnica (mayor si Amplicon based) Más caro Más difícil de realizar |

Tabla 4. Principales características, ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de detección de cfDNA (143).

1.5.1.1 PCR en tiempo real

También conocida como PCR cuantitativa, es una variante de la PCR que amplifica y cuantifica de forma absoluta la cantidad de DNA presente. El término tiempo real se refiere a que esta medición se realiza después de cada ciclo de amplificación. Para ello, emplea un molde de DNA, un par de cebadores específicos, desoxinucleótidos, un tampón de reacción y una DNA polimerasa termoestable. A esta mezcla se añade un fluoróforo que en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permite medir la cantidad de productos generados (144). La

mayor parte de ellos son métodos que se basa en la detección de un determinado alelo. Destaca la tecnología ARMS basada en la utilización de oligonucleótidos específicos cebadores de PCR para la secuencia normal y para la mutada (145). Otro método empleado es la COLD-PCR (*coamplification at lower denaturation temperature*) cuyo principio es que un único nucleótido que no sea complementario puede alterar la temperatura en la que se rompe la cadena de DNA (146).

1.5.1.2 PCR digital

La dPCR es una PCR mejorada ya que lo que se realiza es dividir la reacción en múltiples pequeñas reacciones. Como en la rtPCR, a la muestra se le añaden cebadores, tampón, DNA polimerasas y sondas fluorescentes. Esta solución se divide en múltiples pocillos de tal manera que en cada uno de ellos se lleva a cabo una PCR. Dado que la partición de la muestra debería seguir una distribución de Poisson, se puede calcular a partir de las señales de fluorescencia la cantidad de DNA amplificado (142). Dos técnicas de dPCR son las más usadas: la droplet-based digital PCR (ddPCR) y el BEAMing (beads, emulsion, amplification and magnetics).

La ddPCR es una dPCR en la que la muestra se puede dividir aún más en pequeños compartimentos gracias al uso de una emulsión de aceite en agua. En este caso las moléculas de DNA contenidas en la muestra se compartimentalizan en pequeñas gotas en esta emulsión termoestable (147). Cada una de estas gotas tiene volúmenes de femto- a nanolitros. Tras la amplificación, cada gota contendrá un número idéntico de copias de la molécula de DNA (figura 3).

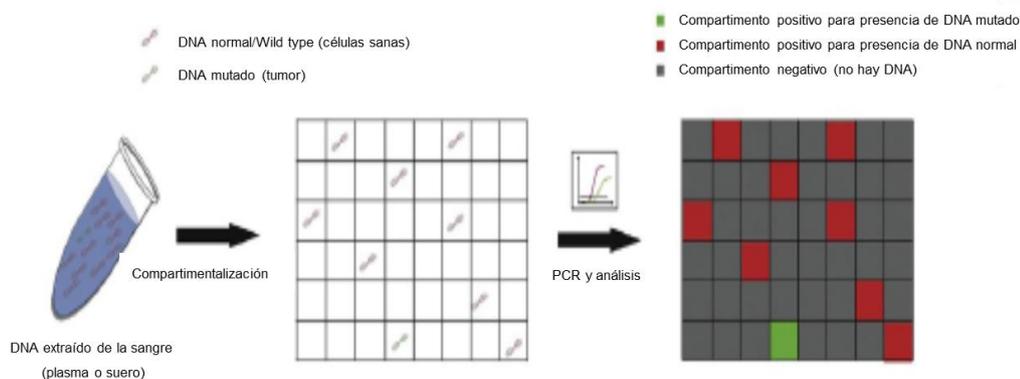


Figura 3. Principios de la PCR Digital (adaptado) (147).

Sin embargo, uno de los problemas de esta técnica es la falta de control sobre el tamaño de las gotas y su manipulación lo que limita el resultado cuantitativo. Para superar estas limitaciones, se han propuesto por un lado, tecnologías para microfluídos que permitan generar y manipular gotas menos dispersas al poder manipular volúmenes muy pequeños de líquido (del orden de 10^{-9} a 10^{-18} /L) (148) y por otro, el uso de microesferas magnéticas (magnetic beads) que permitan capturar el DNA amplificado y manipularlo tras la reacción de PCR: es la base del BEAMing (149). La sensibilidad de esta técnica es de una copia mutada entre 10000 copias sin mutar (150). Estas técnicas son altamente cuantitativas ya que permite conocer el número de copias mutadas respecto a las no mutadas. La fracción mutante alélica (MAF) es el cociente entre la cantidad de alelos mutados respecto a la totalidad de alelos de ese gen (151). También se puede medir en forma de concentración mutante alélica (copias del alelo mutado por mililitro).

1.5.1.3 Secuenciación masiva

La NGS permite realizar de forma paralela miles de operaciones de secuenciación. Los métodos de secuenciación masiva se basan en la catalización de una DNA polimerasa que incorpora un desoxiribonucleotido trifosfato marcado con un fluoróforo a la hebra molde en cada ciclo de tal manera que si es complementario, se produce una excitación del fluoróforo. Esto se realiza de forma paralela con millones de fragmentos de DNA. La NGS tiene 4 pasos fundamentales (152): la preparación de la librería, la amplificación, la secuenciación introduciendo los nucleótidos marcados con fluorescencia que emite una señal en la posición donde hibridan que es captada (es el caso de la tecnología Illumina) (153) o los iones de hidrógeno generados (Ion Torrent) (154) y el análisis de la información por medio de la bioinformática. Para aumentar la sensibilidad hasta al 0.1%, se está incorporando códigos de barras moleculares, de tal manera que durante la preparación de la librería se añade una secuencia única molecular lo que permite que al realizar la lectura se pueda analizar siempre desde el mismo punto (155).

1.5.2 Aplicabilidad de la determinación de DNA circulante en cáncer

Desde su introducción en la oncología, la detección de ctDNA en sangre ha sido postulada como aplicable en distintos supuestos. Recientemente se ha publicado un consenso americano sobre la determinación de ctDNA y su validez clínica y analítica al que se hará mención en cada uno de los siguientes apartados (156).

1.5.2.1 Estudio de las alteraciones moleculares para seleccionar el tratamiento y establecer pronóstico

Sin duda alguna, la principal aplicabilidad de la detección de ctDNA es la de caracterizar molecularmente el tumor y conocer factores pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento sin necesidad de biopsia sólida. Es por ello muy importante la concordancia con el tejido sólido. La detección de ctDNA depende de la sensibilidad de la técnica pero también del tipo de tumor, estadio y de la mutación estudiada. Bettegowda *et al* describieron en 2014 que la presencia de ctDNA por medio de PCR digital difería según el tipo tumoral (157): estaba presente en todos los casos incluidos de tumores de vejiga, colorrectal, esófago y ovario, en más del 75% de tumores de páncreas, mama y melanoma pero en menos del 10% de los gliomas. Asimismo, los estadios más avanzados tienen una mayor presencia de ctDNA y fragmentos de DNA mutados.

La mutación más caracterizada es *EGFR* en cáncer de pulmón con una especificidad del 96% y sensibilidad de 66% (158-162). Otra de las mutaciones mejor caracterizadas en ctDNA es la mutación de *KRAS* en cáncer colorrectal. Existen diversos estudios que han estudiado estos genes (tabla 5). La presencia de ctDNA en sangre (independientemente de la mutación analizada) ha sido considerada como un biomarcador pronóstico independiente: en el estudio de Thierry *et al* (174) o en el caso de los pacientes tratados dentro del ensayo clínico CORRECT con regorafenib (163) se ha observado que aquellos pacientes con altos niveles de ctDNA basales tienen una significativa menor supervivencia (164).

| Autor | Gen | Técnica | Corte MAF | N | Concordancia | Sensibilidad | Especificidad |
|------------------------|--------------------|------------------------------|----------------|-----|---------------|--------------|---------------|
| Bettegowda et al (157) | KRAS 12/13 | Safe Seq (dPCR) | NR | 206 | 95% | 87.2% | 99.2% |
| Taly et al (165) | KRAS 12/13 BRAF | Duplex/ Multiplex dPCR | NR | 50 | 84/74% 92% | NR | NR |
| Thierry et al (166) | KRAS 12/13 BRAF | Intplex (PCR cuantitativa) | 0.004 - 0.01 % | 95 | 96% 100% | 92% 100% | 98% 100% |
| Grasselli et al (167) | RAS | BEAMing | 0.02-0.04 % | 146 | 90% | 89% | 90% |
| Schmiegel et al (168) | RAS | BEAMing | 0.02 % | 98 | 91.8% | 90.4% | 93.5% |
| Vidal et al (169) | RAS | BEAMing | 0.02 % | 115 | 93% | 96.4% | 90% |
| Normanno et al (170) | RAS | BEAMing | 0.02 % | 92 | 78.3% | 69.7% | 81.3% |
| Bachet et al (171) | RAS | NGS | NR | 330 | 92.3% | 94.1% | 93% |

Tabla 5. Principales estudios de biopsia líquida en cáncer colorrectal y concordancia con tejido sólido (adaptada de (172))
(NR: No reportado).

Además de *EGFR* y *KRAS*, otros muchos genes han sido analizados en ctDNA en diversas patologías: *BRAF* y melanoma (173), *PI3KCA* y *ESR1* en mama (174, 175). Por otra parte, cada vez más se están realizando paneles de ctDNA con NGS para incluir también otros eventos genómicos como los reordenamientos (176, 177). En el caso del cáncer de pulmón, utilizando paneles de NGS con una concordancia por ejemplo de *EGFR* es del 80% (178). Sin embargo, la validez clínica del análisis de ctDNA es controvertida de acuerdo a la última revisión de expertos americanos (156). Por un lado, es necesario demostrar que la detección de ctDNA puede ser útil en estudios prospectivos, algo que a día de hoy todavía no ha sido reportado de forma definitiva. Por otro lado, es necesario demostrar que el ctDNA proporciona la misma información que el análisis genómico del tejido, es decir hay una alta concordancia.

1.5.2.2 Estudio de la heterogeneidad tumoral y de la evolución clonal como resistencia al tratamiento

Una de las características fundamentales de los tumores es la heterogeneidad tumoral tanto temporal como espacial (intertumoral e intratumoral) (179). Por ello, el resultado de las biopsias sólidas en cuanto a la detección de alteraciones en el DNA puede ser discordante. Esta limitación puede ser vencida gracias a la detección de ctDNA dado que al ser liberado de distintas regiones tumorales puede reflejar la heterogeneidad intratumoral y la evolución clonal (180, 181). En cáncer de pulmón, por ejemplo, un estudio ha demostrado que la recaída y las metástasis del mismo tumor son secundarias a una alteración clonal que aumenta su frecuencia(182). Algo similar se ha descrito en cáncer de mama (183) o en cáncer colorrectal.

La posibilidad de detectar resistencias al tratamiento tiene como paradigma el tratamiento con terapia anti-EGFR en pacientes sin mutación de *RAS* de cáncer colorrectal. En el año 2012, dos estudios independientes mostraron mutaciones de resistencia adquirida a esta terapia en varios pacientes (184) (185). Estudios de biopsia líquida han demostrado que cuando se retira el tratamiento anti-EGFR, los alelos mutados de *KRAS* comienzan a disminuir por lo que posteriormente se podría intentar realizar un retratamiento con estos fármacos (186). Por ello, se ha postulado que la determinación de ctDNA no sólo permite detectar estas mutaciones sino también conocer el momento de suspender y reintroducir la terapia anti-EGFR. Recientemente, Vidal *et al* detectaron en pacientes sin mutación de *RAS* previo a la progresión radiológica mutaciones en *KRAS* y *NRAS* en un 39% de casos (169). No obstante, la mutación de *RAS* no es la única alteración que se ha reportado en plasma como resistencia a la terapia anti-EGFR. De forma similar a lo que ocurre en tejido sólido (55, 187), se han detectado mutaciones de resistencia en sangre en el gen de *EGFR* (188) o mutaciones en *BRAF* o *PI3KCA* (189) o la amplificación de *ERBB2* (186). Por otra parte, no sólo la terapia anti-EGFR ha demostrado en cáncer colorrectal que puede inducir resistencia al tratamiento con la aparición en sangre de alteraciones moleculares. Recientemente, se han publicado datos en pacientes con mutación

de *BRAF* tratados con dabrafenib, trametinib y panitumumab en los que se detecta mediante BEAMing mutaciones en *RAS* a la progresión (190).

1.5.2.3 Monitorización de la enfermedad durante el tratamiento

Una de las aplicaciones de la detección de ctDNA es permitir monitorizar el efecto del tratamiento de una forma mínimamente invasiva. Diversos estudios han demostrado de forma retrospectiva que los cambios en el ctDNA correlacionan con la respuesta al tratamiento (136, 191) y pueden detectar respuestas de forma más precoz (192-194) que los métodos radiológicos convencionales. Existen diversos estudios retrospectivos que avalan este método para monitorizar la carga tumoral en distintos tumores como cáncer de pulmón no microcítico *EGFR* mutado (195) melanoma (196, 197), próstata (198), mama (194) u ovario (199). En el caso de cáncer colorrectal, existen distintos estudios que avalan que la reducción significativa de los niveles de ctDNA puede predecir una respuesta radiológica (200). Un estudio prospectivo demostró que aquellos que se consideraron “buenos respondedores” a nivel de plasma tenían una mejor tasa de respuestas y una mayor supervivencia libre de progresión y global (201). De forma similar, en el estudio de Vidal *et al* (169) se ha observado una reducción significativa del ctDNA en los pacientes con respuesta o estabilidad al tratamiento. Sin embargo, la validación de ctDNA como predictor de respuesta al tratamiento es más complicada y de momento no está realizada de acuerdo al consenso de expertos americanos (156). Primero, es necesario que los distintos métodos empleados sean uniformes y reproducibles. Por otra parte, se debe establecer cuál es la mejor unidad para medir la cantidad de ctDNA, si la fracción mutante alélica o la cantidad de variantes alélicas por unidad de plasma.

1.5.2.4 Detección precoz de metástasis y de recaídas tumorales

La detección de ctDNA puede permitir conocer precozmente las recaídas tumorales tras el tratamiento radical. Extrapolando de la leucemia, lo que permite detectar es la enfermedad mínima residual lo que podría permitir dividir a los individuos en aquellos con alto y bajo riesgo de recaída. Existen datos que avalan que los niveles de ctDNA en estadios precoces están asociados a recurrencia de

enfermedad y a una disminución en la supervivencia global en general (202) y más concretos en cáncer de mama (203), páncreas (204) y de pulmón (181). Sin embargo, la utilidad clínica de nuevo no está demostrada (156) dado que no hay estudios prospectivos ni estudios en los que se realicen pruebas de imagen cuando hay detección de ctDNA que confirmen que haya existencia ya de metástasis. Parece pues similar a lo que ocurre con los marcadores proteicos (CEA, CA 125, CA 15.3, PSA) que no han demostrado beneficios en supervivencia en la detección de recurrencias precoces en cáncer de mama y de ovario pero han abierto la esperanza en otros tumores como próstata (205, 206).

En el caso de cáncer colorrectal, el marcador tumoral CEA tiene muy baja sensibilidad en la detección de la enfermedad micrometastásica o en la enfermedad pulmonar (207). Por ello, la detección en sangre de ctDNA tras la cirugía podría ayudar a identificar la enfermedad mínima residual que puede predecir la recurrencia tumoral. Esta posibilidad de monitorizar el ctDNA tras la cirugía fue evaluada inicialmente en estadios avanzados tras cirugía de metástasis donde se observó la ausencia de recaída cuando se detectaba ctDNA por BEAMing tras la cirugía (136). Diferentes estudios retrospectivos pero con pequeña muestra han mostrado evidencia de que el ctDNA puede predecir la recaída aunque es difícil extraer conclusiones por la heterogeneidad de los métodos de análisis (mutación analizada y técnica empleada) y los estadios incluidos desde localizados a avanzados (208-211). Los datos más consistentes proceden de un estudio prospectivo tras resección de neoplasia de colon estadio II que realizó seguimiento de una mutación en ctDNA (la de mayor fracción mutante alélica) (212). En este estudio, se observó que prácticamente el 80% de los pacientes que no recibieron adyuvancia y ctDNA presente tras la cirugía recayeron y en aquellos que recibieron adyuvancia y se detectaba ctDNA sólo recayeron el 50% aunque prácticamente todos negativizaron ctDNA al acabar adyuvancia. Sin embargo, este estudio sólo se realizó el seguimiento de una mutación y no refleja la heterogeneidad tumoral. De forma similar, en un estudio en pacientes con tumores estadio II y III resecados se ha detectado por NGS que la presencia de ctDNA tras la cirugía muestra una menor supervivencia libre de enfermedad, tiempo a la recurrencia y supervivencia global respecto a aquellos con ctDNA no detectados, independientemente del estadio (213).

1.5.2.5 Detección precoz del cáncer

Sin duda alguna, este es el objetivo más ambicioso de la biopsia líquida aunque el menos avanzado y validado. El principal problema es la gran cantidad de falsos positivos que se pueden encontrar y la implicación que puede tener. Esto es debido entre otras razones a que algunas de estas alteraciones pueden ser importantes para la transformación de las células en tumorales pero por distintos motivos no llegan a ser efectivas. Existen datos interesantes en este contexto como la detección de la mutación de *TP53* en pacientes con carcinoma microcítico de pulmón (214) o mutación de *KRAS* en carcinoma de páncreas (215). Sin embargo, existe en estos estudios hasta un 10-20% de pacientes (casos controles) que presentan estas alteraciones.

Probablemente, el cáncer colorrectal sea una de las patologías donde el diagnóstico precoz ha mostrado mejores resultados en la supervivencia de los tumores pero son necesarios mejores métodos de screening. Uno de ellos podría ser la determinación de ctDNA. De hecho, hay estudios que muestran que los pacientes con cáncer colorrectal presentan niveles en DNA libre y circulante mayores que en pacientes sanos aunque no fueran diferencias estadísticamente significativas (216). Otra opción planteada en cáncer colorrectal ha sido medir en sangre secuencias de DNA no codificantes repetitivas cortas (ALU) o largas (LINE1). La secuencia ALU247 y ALU115 son más frecuentes en células tumorales y sanas respectivamente. Un estudio intentó utilizando 4 marcadores diferentes (ALU247, DNA total nuclear, DNA mitocondrial y CEA) establecer y validar de forma retrospectiva una firma en plasma que pudiera ser más frecuente en tumores que en pacientes sanos con un valor predictivo positivo de 81.1% (217). De forma similar, se ha evaluado en suero ALU115 y el cociente ALU247/ALU115 y parece existir un valor significativamente mayor de ambos en los pacientes con cáncer colorrectal (218). Además de estas secuencias, también se han analizado marcadores de metilación como SEPT9 aunque con una pobre sensibilidad del 63.9% y una especificidad del 88.4% para cáncer colorrectal (219).

2. Justificación

El cáncer colorrectal es una de las principales neoplasias en nuestro entorno con una incidencia elevada (1). Aunque la mayor parte de los pacientes son diagnosticados como tumores localizados, en torno al 20% de los casos presenta un debut metastásico y además un 30% de los tumores localizados recaen en los primeros 5 años. La supervivencia actual de cáncer colorrectal metastásico se encuentra en torno a 30 meses gracias a la mejora de las posibilidades quirúrgicas de la enfermedad metastásica así como el desarrollo de nuevas terapias sistémicas para el tratamiento de la enfermedad no resecable (220). Pese a todo, los resultados de supervivencia parecen insuficientes.

Una manera de mejorar estos resultados es conociendo de antemano los principales factores pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento con el fin de poder seleccionar tratamientos dirigidos y más eficaces a los pacientes. Entre ellos destaca las alteraciones de la vía de EGFR, principalmente *RAS* (presente en más de la mitad de los tumores de origen colorrectal y *BRAF* (presente en un 10%). El primero es considerado un factor predictivo de respuesta al tratamiento con terapia anti-EGFR (81, 83, 87, 103, 221), no así un factor pronóstico (69-75). En la actualidad, la determinación de las alteraciones en los genes *RAS* y *BRAF* se realizan mediante técnicas de PCR sobre biopsia tumoral (11).

Sin embargo, esta determinación no siempre es posible de realizar debido a que en muchas ocasiones la muestra tumoral es insuficiente para ello. Esto conlleva un riesgo adicional y un retraso en el inicio del tratamiento al tener que realizarse una nueva biopsia. Asimismo, la determinación de *RAS* y *BRAF* en tejido sólido tiene otra limitación relevante: la heterogeneidad (222). La presencia de mutaciones en estos genes puede variar entre el primario, las metástasis e incluso dentro de la misma localización tumoral. Para superar esto, ha emergido en los últimos años la conocida como biopsia líquida. Esta técnica permite detectar en cualquier fluido corporal, pero en especial en sangre, la presencia de alteraciones moleculares que provienen de las células tumorales. Pese a que es posible determinarlo de diversas maneras, la detección de DNA libre y circulante tumoral es la mejor de las opciones y la más empleada. En el caso específico de

cáncer colorrectal la presencia de ctDNA es prácticamente constante lo que permite su medición en gran número de casos (157). Diversos estudios han reportado una concordancia en torno al 90% entre la determinación de *RAS* en plasma y en tumor y han demostrado un valor predictivo de respuesta a la terapia anti-EGFR (167-169, 171).

Una manera de poder cuantificar esta mutación es midiendo la fracción mutante alélica que es el porcentaje de alelos mutados sobre el total de alelos en la muestra. Esta medida puede ser útil para establecer el pronóstico y predecir la respuesta al tratamiento. En el caso de *RAS* en tumor sólido la MAF no parece ser un factor pronóstico pero sí un factor predictivo de respuesta a anti-EGFR (223). En el caso de ctDNA, existen datos publicados de forma retrospectiva que muestran que la MAF de *RAS* en sangre es predictor de beneficio al tratamiento con FOLFIRI y cetuximab en el ensayo clínico CRYSTAL: parece que aquellos pacientes con una MAF entre 0.1 y menor del 5% se beneficiaban más del tratamiento. Sin embargo, el potencial valor pronóstico de la MAF de *RAS* en sangre no ha sido claramente establecido. Existen datos publicados que muestran una tendencia a una peor supervivencia global si la MAF de este gen en sangre es superior a 10% o al 1% (167, 169). Sin embargo, estos datos proceden de una población heterogénea en lo que respecta al tratamiento y al momento del análisis: en estos estudios las muestras de plasma se obtenían en diferentes estadios de la enfermedad y en distintos momentos del tratamiento y se analizaban de forma global.

En este trabajo, se reportan los resultados del análisis de una población tratada de forma homogénea en nuestro entorno de pacientes afectados de cáncer colorrectal metastásico a los cuales se les realizó la determinación de *RAS* en sangre. Dicha determinación se realizó de forma sistemática antes del inicio de una nueva línea de tratamiento sistémico. De esta manera, se intenta correlacionar la MAF de *RAS* en una población homogénea con otras variables clínicas que pudieran estar relacionadas con la presencia de una mayor MAF de *RAS* en sangre. Por otra parte, se explora la posibilidad de que la MAF de *RAS* pudiera tener un papel pronóstico al inicio de un tratamiento correlacionándose con supervivencia libre de progresión y global.

3. Hipótesis

3.1 Primaria

- La mutación de *RAS* puede ser detectada de forma cuantitativa en sangre y puede ser un factor pronóstico en cáncer colorrectal metastásico.

3.2 Secundarias

- La mutación de *RAS* puede ser detectada por métodos sensibles de PCR en plasma con una concordancia elevada con el tejido tumoral.
- La población *RAS* mutada en plasma tiene unas características similares a la población en la que se determina la mutación de *RAS* en muestra tumoral.
- La fracción mutante alélica de *RAS* puede variar en función de la línea de tratamiento y del momento de su análisis.
- La fracción mutante alélica de *RAS* puede estar correlacionada con diversas características clínicas.
- La fracción mutante alélica de *RAS* puede estar asociada a la carga tumoral y a las localizaciones metastásicas.
- La fracción mutante alélica de *RAS* puede estar asociada a la presencia de marcadores tumorales en sangre.
- La fracción mutante alélica de *RAS* puede predecir la respuesta al tratamiento.

4. Objetivos

4.1 Objetivo primario

- Analizar la correlación de la fracción mutante alélica de *RAS* en sangre al inicio de una línea de tratamiento sistémico con la supervivencia global.

4.2 Objetivos secundarios

- Analizar la concordancia de la presencia de mutación en *RAS* en plasma medida mediante BEAMing con la presencia de mutación de *RAS* en tejido tumoral medida mediante PCR en tiempo real.
- Evaluar las características clínico-patológicas y la supervivencia de los pacientes con mutación de *RAS* en sangre y su correlación con la población de estudio *RAS* mutada en tejido tumoral.
- Correlacionar la fracción mutante alélica de *RAS* en sangre con distintas variables clínico-patológicas y analíticas.
- Analizar si la fracción mutante alélica de *RAS* al inicio de un tratamiento puede predecir el éxito de un tratamiento en términos de supervivencia libre de progresión y respuesta radiológica por RECIST 1.1.

5. Material y Métodos

5.1 Tipo de estudio

Se trata de un estudio observacional basado en 110 pacientes afectos de cáncer colorrectal metastásico de 2 centros (Hospital Universitari Vall d'Hebron e Institut Català d'Oncologia de Bellvitge) a los que se les ha extraído muestras de sangre al inicio de un tratamiento sistémico. Previo a la extracción, los pacientes firman consentimiento informado aprobado por el CEIC de cada centro para el uso de las muestras de plasma y de sus datos clínicos con el fin de poder realizar análisis posteriores de factores pronósticos.

5.2 Selección de la muestra

La muestra global del estudio ha sido obtenida a partir de las muestras de plasma procedente de pacientes afectos con carcinoma colorrectal metastásico almacenadas en la seroteca de ambos centros participantes entre los años 2013 y 2016. Los pacientes incluidos durante 2016 y 2017 han sido seleccionados de forma prospectiva, todos procedentes del Hospital Universitari Vall d'Hebron. Todas las muestras han sido extraídas previamente a la administración de una nueva línea de tratamiento sistémico bien al diagnóstico de enfermedad metastásica o a la progresión. Se han excluido aquellos pacientes con muestras de plasma extraídas durante la administración de un tratamiento de la población de estudio.

Respecto al análisis de la población con mutación de *RAS* en plasma, se han excluido aquellos pacientes con enfermedad metastásica limitada al hígado que han sido sometidos a cirugía y/o han realizado tratamiento con terapia anti-EGFR previo a la extracción con el fin de homogeneizar la población en cuanto a pronóstico e impacto de los tratamientos. En la figura 4 se puede ver el diagrama de flujo de selección de esta población.

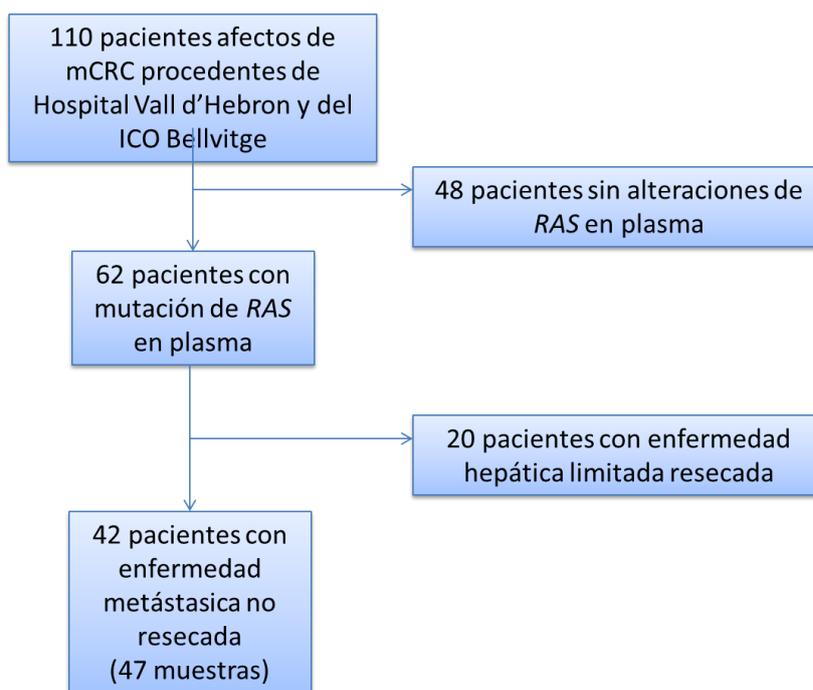


Figura 4. Diagrama de flujo para la selección de la población homogénea de pacientes con mutación de RAS en plasma.

5.3 Variables clínicas, patológicas, moleculares y de supervivencia

Las siguientes variables han sido recogidas y trasladadas a una base de datos:

-Datos epidemiológicos: fecha de nacimiento, edad, sexo.

-Datos clínicos: fecha de diagnóstico de cáncer colorrectal, estadiaje al diagnóstico según criterios TNM, cirugía del tumor primario (si/no), realización de tratamiento adyuvante tras cirugía del primario (si aplica), localización del tumor primario (colon derecho desde ciego hasta flexura esplénica; colon izquierdo incluyendo colon descendente y sigma; recto), sitios de localización metastásica (localización y número), CEA y CA 19.9 en el momento de la extracción de la muestra de plasma.

-Datos en relación al tratamiento realizado: líneas realizadas durante la enfermedad metastásica (número, tipo de quimioterapia y tratamiento biológico), cirugía realizada para enfermedad metastásica (hepática y/o pulmonar) y respuesta al tratamiento según criterios RECIST versión 1.1 (224).

-Datos moleculares de tejido sólido y sangre: se han recogido la fecha de obtención de muestra tumoral para la determinación de *RAS* y *BRAF*, la determinación cualitativa de las mismas en tejido tumoral, la fecha de obtención de la muestra de sangre, la línea en la que se recoge dicha muestra y el estado de la mutación de *RAS* en sangre de forma cuantitativa y cualitativa. Por último, se han recogido la presencia de otras alteraciones moleculares detectadas del programa de pre-screening molecular de ambos centros en tejido sólido.

-Datos de supervivencia: datos de inicio y fin de cada tratamiento en enfermedad metastásica, el estado del paciente (vivo/muerto) y la fecha de éxitus (en caso de aplicar) y de último seguimiento.

Se ha analizado la supervivencia libre de progresión (PFS) de cada tratamiento definida como el tiempo desde el inicio del mismo hasta la progresión o muerte.

La supervivencia global (OS) se ha definido como como el tiempo desde el diagnóstico de enfermedad metastásica de cáncer colorrectal hasta muerte o último seguimiento.

5.4 Análisis molecular de las muestras de tejido sólido

La determinación de la mutación de *RAS* en tejido tumoral fue realizada mediante práctica clínica habitual de ambos centros usando métodos de PCR en tiempo real.

Esta técnica emplea un molde de DNA, un par de cebadores específicos, desoxinucleótidos, un tampón de reacción adecuado y una DNA polimerasa termoestable. A esta mezcla se añade un fluoróforo que en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permite medir la cantidad de productos generados (144). Los métodos de fluorescencia pueden ser no específicos o específicos. Los primeros, se basan en el uso de moléculas que tienen afinidad por el DNA de doble cadena y al ser oxidados generan una señal fluorescente que es captada y es proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo. Es el caso por ejemplo del SYBR Green. Los segundos, consisten en transferir energía desde un donador fluorescente a un aceptor. Es el caso de los métodos basados en hidrólisis y por

hibridación. Los primeros se basan en sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un donador fluorescente y un aceptor: ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a la secuencia diana. Cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el donante y aceptor, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el donante sea liberada y capturada por el equipo. Estos métodos son muy seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su secuencia diana, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es por eso que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan. Los métodos por hibridación consisten en una sonda unida a un donante fluorescente que está en estrecha proximidad con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el donante como el aceptor presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibriden a su secuencia diana, el donante es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia.

En nuestro caso, se utilizó un método específico por hidrólisis. Se realiza una PCR en dos pasos. En el primer paso, se realiza la amplificación de cada muestra usando cebadores específicos para las mutaciones más frecuentes en cáncer colorrectal. Se utilizan 50ng de DNA para la amplificación durante 14 ciclos de 30 segundos a 95 grados, 30 segundos a su correspondiente temperatura de fusión y 30 segundos a 72 grados, incluyendo una fase final de extensión en un Mastercycle pros. El DNA amplificado es usado en la segunda fase de la PCR en esta ocasión mediante PCR en tiempo real utilizando la máquina Light Cycler® 480 (Roche Diagnostics, Applied Science) usando el protocolo habitual establecido por el fabricante. Para ello, se utilizan 1µL de DNA amplificado añadiéndose a 2µL de solución universal de PCR (Master Mix TaqMan®), 0.125 µL de 40X probes mix y 1.375 µL de agua. Los parámetros de temperatura para cada ciclo fueron los mismos para todos los alelos analizados: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 92°C por 15 segundos y fusión a 60°C durante 1 minuto. Posteriormente se aplica el Light Cycler® 480 Software v1.5 para determinar el genotipo de la muestra midiendo la distribución de intensidad de los tintes tras la PCR. La sensibilidad de esta técnica es de 1-5% (225). Las mutaciones analizadas se

encuentran reflejadas en la tabla 6. En el caso de ausencia de mutación de *RAS* se realizó la determinación de *BRAF* de acuerdo a kit de Cobas 4800 (Roche diagnosis) de acuerdo a protocolo establecido por fabricante para determinación de mutaciones en *BRAF V600*.

| GEN | EXÓN | CODÓN | CAMBIO | PROT | GEN | EXÓN | CODÓN | CAMBIO | PROT |
|-------------|------|-------|---------|-----------|-------------|------|-------|---------|-------|
| KRAS | 2 | 12 | 34G>T | G12C | NRAS | | | | |
| | 2 | 12 | 35G>T | G12V | | | | | |
| | 2 | 12 | 35G>A | G12D | | 2 | 12 | 34 G>T | G12C |
| | 2 | 12 | 34G>C | G12R | | 2 | 12 | 35 G>T | G12V |
| | 2 | 12 | 34G>A | G12S | | 2 | 12 | 35 G>A | G12D |
| | 2 | 12 | 35G>C | G12A | | 2 | 12 | 35 G>C | G12A |
| | 2 | 13 | 38G>A | G13D | | 2 | 13 | 37 G>C | G13R |
| | 3 | 58 | 173 C>T | T58I | | 3 | 59 | 175 G>A | A59T |
| | 3 | 59 | 176 C>G | A59G | | 3 | 61 | 181C>A | Q61K |
| | 3 | 59 | 175 G>A | A59T | | 3 | 61 | 182A>G | Q61R |
| | 3 | 61 | 183A>C | Q61H | | 3 | 61 | 183 A>T | Q61H |
| | 3 | 61 | 182 A>T | Q61L | | 3 | 61 | 182 A>T | Q61L |
| | 3 | 61 | 182 A>G | Q61R | | 4 | 117 | 351 A>C | K117N |
| | 3 | 61 | 181 C>A | Q61K | | 4 | 146 | 436G>A | A146T |
| | 4 | 117 | 351 A>C | K117N (1) | | 4 | 146 | 437 C>T | A146V |
| | 4 | 117 | 351 A>T | K117N (2) | | 4 | 146 | 436 G>C | A146P |
| | 4 | 146 | 436G>A | A146T | | | | | |
| | 4 | 146 | 437C>T | A146V | | | | | |
| | 4 | 146 | 436G>C | A146P | | | | | |

Tabla 6. Alteraciones moleculares detectadas mediante PCR en tiempo real en tejido sólido.

5.5 Análisis molecular de las muestras de sangre

El status de *RAS* en las muestras de plasma se realizó utilizando la tecnología BEAMing® (Sysmex).

Para este método se utilizan microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina que muestran en su superficie cebadores (*primers*) específicos para el alelo mutado y no mutado. Estas microesferas (*beads*) son emulsionadas con el DNA a analizar y todos los componentes necesarios para la amplificación. Cada uno de los compartimentos contiene una media de no más de una molécula a analizar y una microesfera. Tras la termociclación propia de la PCR, cada una de las microesferas está recubierta por miles de copias idénticas de la copia original del DNA a estudio. La emulsión se rompe entonces y las microesferas son recuperadas por un imán. Tras la desnaturalización del DNA, las microesferas son incubadas con sondas de oligonucleótidos unidas a sustancias fluorescentes. La separación de las microesferas según las secuencias es realizada por citometría de flujo, permitiendo una cuantificación de las distintas poblaciones. La sensibilidad de esta técnica está cifrada en que es capaz de detectar una copia mutada entre 10000 copias sin mutar (150).

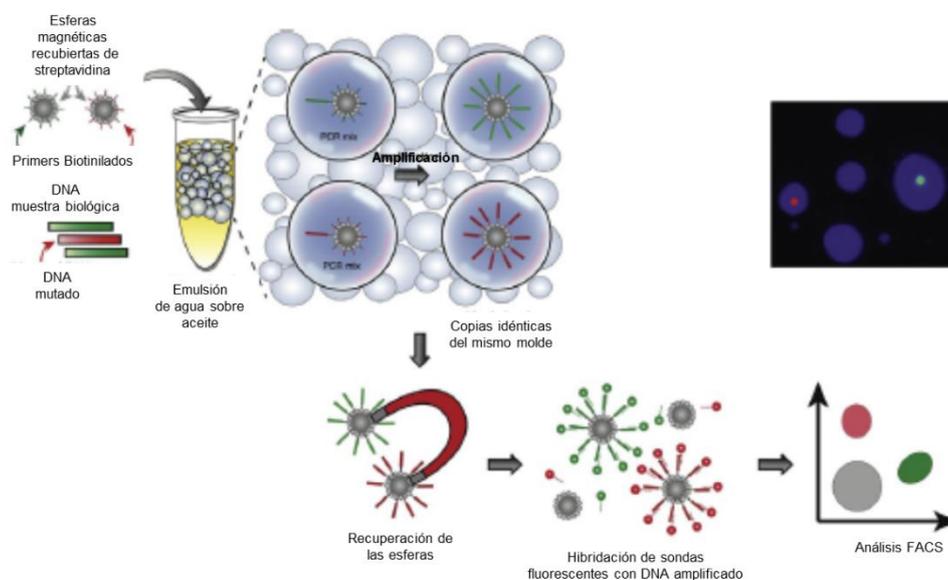


Figura 5. Resumen de la tecnología BEAMing (adaptado).

En este caso, se analizó un panel de mutaciones de *RAS* (CE-IVD) que se encuentra resumido en la Tabla 7. Las muestras de sangre de 10ml eran recogidas en tubo de EDTA. El plasma se aísla en la primera hora. Se realiza una centrifugación en dos pasos: la primera durante 10 minutos a 1600xg a

temperatura ambiente. El sobrenadante se recoge y se centrifuga de nuevo otra vez durante 10 minutos a temperatura ambiente esta vez a 3000x g para retirar las células que puedan quedar. El sobrenadante es el plasma que se transfiere para su congelación a -80 grados hasta su uso. Para realizar el análisis, primero es necesario realizar la purificación del cfDNA. Para ello, se utilizó el QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad de DNA fue medido usando un espectrofotómetro (NanoDrop 1000). Las muestras de cfDNA purificada son entonces testadas utilizando el Kit de OncoBEAM RAS (catalogo ZR150048) para cáncer colorrectal.

Los datos de citometría de flujo necesarios para el análisis del resultado del BEAMing fue realizado por Cube 6i Citómetro de flujo usando FCS Express™ Software. Una tasa de mutación detectada por encima de 0.02% era considerada como positiva. Para realizar el análisis del BEAMing, se requiere al menos 150ng de DNA. Se realiza pre-amplificación de múltiples loci en una reacción de PCR multiplex, seguida de una segunda preamplificación más específica al añadirse los cebadores de los amplicones que se quieren analizar. Posteriormente, se realiza la PCR en emulsión sobre la superficie de micro-esferas magnéticas en emulsion de aceite en agua realizándose varios ciclos térmicos. El siguiente paso es la hibridación a las sondas fluorescentes específicas para cada mutación seguido de la citometría de flujo para cuantificar el resultado del producto de la PCR mediante el citómetro de flujo permitiendo calcular la ratio de alelos mutados frente a alelos no mutados. Se define fracción mutante alélica (MAF) como el número de micro-esferas con DNA mutado dividido del total de micro-esferas analizadas.

| GEN | EXON | MUTACIÓN |
|-------------|------|----------------|
| KRAS | 2 | G12S/R/C/D/A/V |
| | 2 | G13D |
| | 3 | A59T |
| | 3 | Q61L/H/R |
| | 4 | K117N |
| | 4 | A146T/V |
| NRAS | 2 | G12S/R/C/D/A/V |
| | 2 | G13D/R/V |
| | 3 | A59T |
| | 3 | Q61K/L/R/H |
| | 4 | K117N |
| | 4 | A164T |

Tabla 7. Mutaciones detectadas por medio de BEAMing en plasma.

5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el software R 3.4.1, R studio (v. 1.0.153) y el paquete de supervivencia CRAN R. Los datos son resumidos por frecuencia en el caso de las variables categóricas y por media y rango en el caso de variables continuas. Se define supervivencia libre de progresión (PFS), la supervivencia global (OS), mejor respuesta y fracción mutante alélica (MAF) según queda reflejada en esta misma sección previamente. Todas las muestras fueron analizadas de forma ciega a los objetivos del estudio.

En la primera parte, se realiza un análisis descriptivo de la población global del estudio. Para ello, se recogen los variables más relevantes. Asimismo, se establece la relación entre la determinación de *RAS* en plasma y tejido sólido usando para ello el coeficiente *kappa* de Cohen con el fin de estimar el grado de concordancia. Por último, se estima la curva de supervivencia mediante Kaplan-Meier para la población global y en función del estado de *RAS* en plasma y tejido.

En la segunda parte, se determina la correlación de distintas variables clínicas con los niveles de MAF. La significación de esta correlación fue determinada

usando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis: valores de p inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Estas variables fueron línea de tratamiento, localización del tumor primario, número de sitios de metástasis, lugar de metástasis y respuesta radiológica por criterios RECIST 1.1. En el caso de la correlación entre MAF y los marcadores tumorales (CEA y CA 19.9) se estableció dicha correlación mediante el test de Pearson para variables cuantitativas: valores de p inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Posteriormente, se correlaciona la MAF con distintos cortes de la variable cuantitativa. El corte óptimo de MAF de 5.8% al que se hará mención en los resultados, se calculó en base a los datos recogidos usando la función de R conocida como *cutp* del paquete *survMisc*. Esta función permite determinar el corte de forma objetiva y la estimación de su significación estadística bajo la hipótesis que el corte elegido no predice la supervivencia (226). Se calculan Hazard Ratios (HR) e intervalos de confianza (IC) al 95% para este corte optimizado, MAF del 1% y del 10%. Las curvas de supervivencia se estiman usando el método de Kaplan-Meier. Para los principales objetivos, se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox uni y multivariante. La significación estadística de las curvas de supervivencia se estimó mediante tests de log-rank. Un valor de p inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

6. Resultados

6.1 Características basales de la población de estudio

Un total de 110 pacientes afectados de carcinoma colorrectal metastásico y a los que se les había extraído en algún momento previo al inicio de un tratamiento sistémico una muestra de sangre fueron incluidos en el estudio. En total se recogieron 115 muestras al tener 4 pacientes muestras recogidas en varios momentos de la enfermedad.

Las principales características de la población de estudio se encuentran reflejadas en la tabla 8. La media de edad al diagnóstico de cáncer colorrectal metastásico es de 62 años (rango de 30 a 83 años, desviación típica 11.6) de los cuales 33 eran mujeres y 77 hombres. La mayor parte de los pacientes fueron diagnósticos en estadio metastásico (81%) frente a un 10% de pacientes que fueron diagnosticados con afectación exclusivamente mural del intestino (estadio II) y un 9% con afectación ganglionar locorregional (estadio III) y que recayeron posteriormente. En cuanto a la localización del tumor primario, son similares entre las tres principales categorías: colon derecho, colon izquierdo y recto (35, 40 y 35 pacientes, respectivamente).

En cuanto a los lugares de metástasis, la mayor parte de los pacientes tenían una única localización metastásica (49 pacientes), frente a 40 pacientes con dos localizaciones, 15 con tres localizaciones y 6 con 4 o más. Respecto al lugar de metástasis en el momento de la extracción de la muestra de sangre, la mayor parte de los pacientes presentaban al menos metástasis hepáticas (89 pacientes, 80.9% del total). Un total de 37 pacientes (33.64%) presentaban al menos metástasis pulmonares y 26 pacientes (23.64%) presentaban al menos metástasis peritoneales. Sin embargo, la mayor parte de los pacientes presentaban al menos más de dos diferentes lugares de metástasis. La combinación más frecuente es metástasis hepáticas y pulmonares seguida de la afectación hepática y ganglionar. El resto de localizaciones están descritas en la tabla 8. Destacar que ningún paciente de esta cohorte presentaba metástasis cerebrales y sólo un paciente lesiones óseas.

Respecto a los tratamientos realizados en primera línea, la mayor parte de los pacientes recibieron tratamiento con FOLFOX (84 pacientes) frente a FOLFIRI (19 pacientes). Otros tratamientos recibidos en primera línea fueron FOLFOXIRI en un caso, capecitabina en 2 pacientes, 5-fluorouracilo, oxaliplatino-raltitrexed e incluso tratamiento dentro de ensayo clínico con dabrafenib-trametinib en el caso de dos pacientes que presentaban mutación en *BRAF V600E*. En la mitad de los pacientes se asoció al tratamiento de quimioterapia, tratamiento biológico con anti-angiogénico (en este caso, bevacizumab) (29) o inhibidor de EGFR (tanto cetuximab como panitumumab) (26). En la otra mitad, no se añadió en primera línea estos tratamientos por distintas razones como la no indicación del mismo por la quimioterapia empleada, estado funcional del paciente o no disponibilidad en el centro de tratamiento. En cuanto a la segunda línea, un total de 22 pacientes (20%) no recibió tratamiento al fallecer durante la primera línea mientras que 33 pacientes (30%) no la recibieron al estar en el momento del análisis sin progresión a la primera línea. De los que recibieron tratamiento de segunda línea, 13 pacientes recibieron tratamiento con FOLFOX/XELOX y 35 con FOLFIRI. El resto recibieron tratamientos dentro de ensayo clínico (3 pacientes) capecitabina (2 pacientes) e irinotecan (2 pacientes). Respecto al tratamiento biológico de segunda línea 16 de los 35 pacientes con FOLFIRI recibieron tratamiento anti-angiogénico (bevacizumab o aflibercept) (10 pacientes) o anti-EGFR (de nuevo cetuximab o panitumumab) (6 pacientes). En el caso de los pacientes con FOLFOX, solo 3 pacientes recibieron tratamiento con anti-angiogénico y en todos ellos se administró bevacizumab.

| Variable | Número total de pacientes (110) (%) |
|--|-------------------------------------|
| Edad media al diagnóstico mCRC | 62 años (30-83) |
| Sexo | |
| Hombre | 77 (70%) |
| Mujer | 33 (30%) |
| Estadio al diagnóstico de CRC | |
| II | 11 (10%) |
| III | 10 (9.09%) |
| IV | 89 (80.91%) |
| Localización del tumor primario | |
| Colon derecho | 35 (31.82%) |
| Colon izquierdo | 40 (36.36%) |
| Recto | 35 (31.82%) |
| Número de sitios metastásicos | |
| 1 | 49 (44.55%) |
| 2 | 40 (36.36%) |
| 3 | 15 (13.64%) |
| ≥4 | 6 (5.46%) |
| Lugar de localización de metástasis | |
| Exclusivamente hígado | 33 (30%) |
| Exclusivamente pulmón | 4 (3.63%) |
| Exclusivamente peritoneo | 8 (7.23%) |
| Exclusivamente ganglios | 5 (4.54%) |
| Hígado y pulmón | 19 (17.27%) |
| Hígado y peritoneo | 4 (3.63%) |
| Hígado y ganglios | 14 (12.72%) |
| Hígado, pulmón y ganglios | 8 (7.23%) |
| Hígado, ganglios, peritoneo y pulmón | 5 (4.54%) |
| Peritoneo y ganglios | 4 (3.63%) |
| Otros | 6 (5.45%) |
| Tratamiento de primera línea | |
| FOLFOX | 84 (76.36%) |
| FOLFIRI | 19 (17.27%) |
| Otros | 7 (6.37%) |
| Tratamiento biológico primera línea | |
| Anti-angiogénico | 29 (26.36%) |
| Anti-EGFR | 26 (23.63%) |
| No | 55 (50%) |
| Tratamiento de segunda línea | |
| FOLFOX | 13 (11.82%) |
| FOLFIRI | 35 (31.81%) |
| Otros | 7 (6.36%) |
| No por éxito | 22 (20%) |
| No por no haber progresado | 33 (30%) |

Tabla 8. Características generales de la población global de estudio.

6.2 Determinación de RAS en tejido tumoral de la población global

La determinación de RAS en tejido tumoral pudo ser realizada en todos los pacientes del estudio por técnicas de PCR en tiempo real como parte de la práctica clínica habitual. En cuanto al origen de la muestra, en 92 pacientes (83.64%) era del tumor primario frente a 17 pacientes (15.45%) que la determinación se realizó en metástasis. En un caso no se supo establecer por los informes de anatomía patológica si la determinación se realizó en primario o metástasis.

En cuanto a los resultados, se encuentran recogidos en la tabla 9. Destaca que en 49 pacientes (44.54%) no se encontró alteración en ninguno de los exones y codones analizados de RAS. De esos pacientes, en 7 de ellos (6.36% del total de la población) presentaban mutación en *BRAF* V600. La mutación más detectada en tejido tumoral fue en *KRAS* codón 12 en 32 pacientes (29.09% de la población global, 52.45% en los pacientes con mutación en RAS) seguida de *KRAS* codón 13 en 11 pacientes (10% de la población global, 18% de la población con mutación en RAS). El resto de mutaciones detectada fueron mutaciones de *KRAS* en exón 2 y 4 y en *NRAS* en exón 2 y 3 como se puede observar en la tabla 9.

Asimismo, en dos pacientes se detectaron dos mutaciones concomitantes en la biopsia sólida: en uno se detectó mutación de *KRAS* en codón 12 con *NRAS* también en codón 12; en otro se detectó mutación de *KRAS* en codón 12 y *NRAS* en codón 61. Es por ello que en esta tabla hay un total de 112 determinaciones recogidas aunque el porcentaje total se ha realizado sobre el número de pacientes totales que son 110.

| Variable | Número de pacientes (%) |
|-----------------------------|-------------------------|
| Origen de la muestra | |
| Primario | 92 (83.64%) |
| Metástasis | 17 (15.45%) |
| Desconocido | 1 (0.91%) |
| Mutación encontrada | |
| No mutación | 42 (32.18%) |
| <i>BRAF</i> V600E | 7 (6.36%) |
| <i>KRAS</i> codón 12 | 32 (29.09%) |
| <i>KRAS</i> codón 13 | 11 (10%) |
| <i>KRAS</i> codón 61 | 2 (1.82%) |
| <i>KRAS</i> codón 117 | 1 (0.91%) |
| <i>KRAS</i> codón 146 | 5 (4.54%) |
| <i>NRAS</i> codón 12 | 4 (3.63%) |
| <i>NRAS</i> codón 59 | 1 (0.91%) |
| <i>NRAS</i> codón 61 | 7 (6.36%) |

Tabla 9. Determinación de *RAS* en tejido tumoral.

6.3 Determinación de *RAS* en plasma de la población global

La determinación de *RAS* en plasma se realizó en todos los pacientes mediante la técnica de BEAMing. En cuanto al momento en el que se extrajo la muestra de sangre para el análisis de la mutación de *RAS* a la mayor parte de los pacientes se les realizó al menos previamente a iniciar la primera línea de tratamiento (91 pacientes, 82.72%). Las muestras de sangre se extrajeron en segunda y tercera línea de tratamiento en 11 y 9 pacientes respectivamente (10 y 8.13%). Destacar que en 3 pacientes se realizó la determinación de *RAS* previo al inicio de primera y segunda línea y en otro paciente, se le realizó la determinación de *RAS* al principio de las 3 líneas.

En cuanto a los resultados de dicha determinación, en 48 pacientes no se encontró ninguna alteración de *RAS* en plasma (43.63%). De nuevo, la alteración más frecuente observada fue en *KRAS* codón 12 en 32 pacientes (29.09% de la población global, 52.45% de la población *RAS* mutado en plasma), seguida del codón 13 de *KRAS* (12 pacientes, 10.91% de la población global, 19.67% de la población *RAS* mutado en plasma). El resto de mutaciones menos frecuentes se recogen en la tabla 10. De nuevo, en un caso se detectaron dos alteraciones a la vez: mutación de *KRAS* y *NRAS* en codón 12. Por eso, hay un total de 111 mutaciones aunque el porcentaje se ha calculado en base a los 110 pacientes totales.

| Variable | Número de pacientes (%) |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Momento de biopsia líquida | |
| 1º línea | 88 (80%) |
| 2º línea | 10 (9.09%) |
| 3º línea o posteriores | 8 (7.27%) |
| 1º y 2º línea | 3 (2.73%) |
| 1º, 2º y 3º línea | 1 (0.91%) |
| Mutación encontrada | |
| No mutación | 48 (43.63%) |
| KRAS codón 12 | 32 (29.09%) |
| KRAS codón 13 | 12 (10%) |
| KRAS codón 61 | 4 (3.64%) |
| KRAS codón 117 | 1 (0.91%) |
| KRAS codón 146 | 5 (4.54%) |
| NRAS codón 12 | 3 (2.73%) |
| NRAS codón 61 | 6 (8.18%) |

Tabla 10. Determinación de RAS en plasma.

6.4 Concordancia de la determinación de RAS en tejido tumoral y sangre

Se estableció la concordancia de la determinación de RAS en biopsia sólida según el método utilizado habitualmente (PCR en tiempo real) y la determinación de RAS mediante biopsia líquida. Los resultados se encuentran resumidos en la tabla 11 (sólo RAS) y tabla 12 (desglosado por KRAS y NRAS). Para este análisis, se tuvo en cuenta una única muestra de plasma por paciente dado que no se observaron cambios en la determinación cualitativa de las mutaciones en la evolución de estos pacientes.

| | RAS EN TEJIDO N=110 (%) | | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | Mutado | No mutado | Total | |
| RAS EN PLASMA N=110 (%) | Mutado | 56 (50.9%) | 6 (5.45%) | 62 (56.35%) |
| | No Mutado | 5 (4.55%) | 43 (39.1%) | 48 (43.65%) |
| | Total | 61 (55.45%) | 49 (44.55%) | 110 (100%) |

Tabla 11. Correlación entre la determinación de RAS en tejido sólido y plasma.

En la población de estudio, la proporción de concordancia observada entre la determinación de RAS en plasma y biopsia sólida es del 90%. El índice estimado Kappa de Cohen es de 0.80 (IC 95% 0.68-0.91). De acuerdo a la clasificación de

Landis y Koch este índice refleja prácticamente perfecta concordancia (227). La sensibilidad de la determinación de *RAS* en plasma es del 91.80% y la especificidad es del 87.76%. El valor predictivo positivo es de 90.32%. El valor predictivo negativo es de 89.58%.

Si desglosamos esta concordancia por mutaciones en *KRAS* y *NRAS*, la concordancia es del 91.82% y del 96.36% respectivamente. El índice estimado Kappa de concordancia es de 0.84 (IC 95% 0.74-0.94) y de 0.84 (IC 95% 0.67-1.02) lo que implica que hay una excelente concordancia entre la determinación de *KRAS* y *NRAS* entre sangre y tejido sólido. La sensibilidad y especificidad de la determinación de *KRAS* en plasma es del 91% y 89.8% respectivamente. Respecto a la de *NRAS* en plasma, la sensibilidad es del 75% y la especificidad del 100%.

| KRAS EN TEJIDO N=110 (%) | | | | |
|---------------------------------|-----------|-------------|-------------|--------------|
| KRAS EN PLASMA N=110 (%) | | Mutado | No mutado | Total |
| | Mutado | 48 (43.64%) | 6 (5.45%) | 54 (49.09%) |
| | No Mutado | 3 (2.73%) | 53 (48.18%) | 56 (50.91%) |
| | Total | 51 (46.37%) | 59 (53.63%) | 110 (100%) |
| NRAS EN TEJIDO N=110 (%) | | | | |
| NRAS EN PLASMA N=110 (%) | | Mutado | No mutado | |
| | Mutado | 9 (8.18%) | 0 | 9 (8.18%) |
| | No Mutado | 3 (2.73%) | 98 (89.09%) | 101 (91.81%) |
| | Total | 12 (10.91%) | 98 (89.09%) | 110 |

Tabla 12. Correlación entre la correlación de *KRAS* y *NRAS* en tejido sólido y plasma.

En un total de 11 pacientes, la determinación entre plasma y tejido sólido ha sido discordante. Estos casos quedan resumidos en la tabla 13. Destaca que en aquellos casos con mutación en plasma y no en tejido tumoral, la fracción mutante alélica es muy baja (0.04-1.22).

| RAS PLASMA | RAS TUMOR | MAF PLASMA |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| RAS WT | KRAS 12 | 0.00% |
| RAS WT | KRAS 12 | 0.00% |
| RAS WT | KRAS 12 | 0.00% |
| RAS WT | NRAS 61 | 0,00% |
| RAS WT | NRAS 59 | 0,00% |
| KRAS 12 | RAS WT | 0.06% |
| KRAS 12 | RAS WT | 1.22% |
| KRAS 12 | RAS WT | 0.04% |
| KRAS 13 | BRAF V600E | 0.05% |
| KRAS 61 | RAS WT | 0.17% |
| KRAS 61 | RAS WT | 0.15% |

Tabla 13. Casos discordantes entre biopsia líquida y sólida en determinación de RAS.

6.5 Supervivencia de la población global y en función de RAS

Se analiza la supervivencia de todos los pacientes de la cohorte desde el diagnóstico independientemente del estado de RAS, si se ha realizado cirugía de metástasis y del tratamiento realizado. La supervivencia media de los pacientes de este estudio es de 28.4 meses (IC 95% 22.7-35.4) como se puede observar en la figura 6.

Respecto a la supervivencia, en función del estado de RAS en plasma, la mediana de supervivencia de los pacientes RAS mutados es de 26.7 meses (IC 95% 16.4-32.5) frente a la de los pacientes RAS nativo que es de 35.4 meses (IC 95% 27.8-44.2) como se puede observar en la figura 7. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.354$). La HR para la curva de supervivencia global fue de 1.26 (IC 95% 0.75- 2.12) a favor de RAS salvaje.

Por otra parte, se analiza la supervivencia en función del estado de RAS en tejido sólido como se observa en la figura 8. En este caso, la mediana de supervivencia de los pacientes RAS mutados es de 26.7 meses (IC 95% 16.5-36.6) algo inferior a la de los no mutados que es de 31 meses (IC 95% 22.7-42.9), diferencias que, no obstante, no fueron estadísticamente significativas ($p=0.89$). La HR para esta curva de supervivencia fue de 1.04 (IC 95% 0.62-1.74).

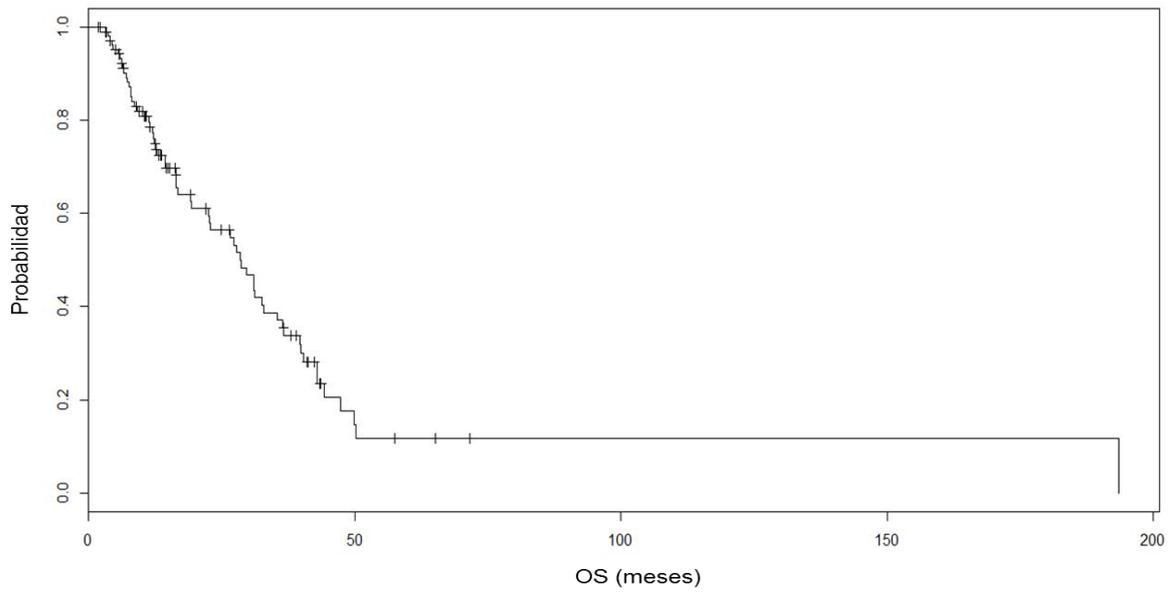


Figura 6. Supervivencia global de la población de estudio.

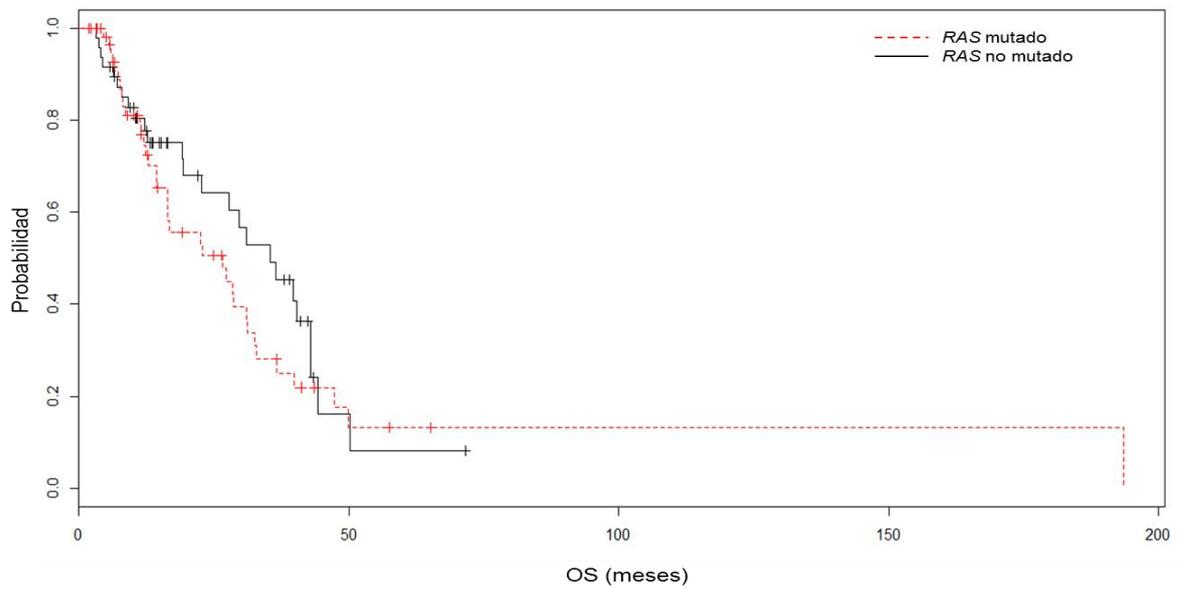


Figura 7. Supervivencia global de la población en función de status de la mutación de RAS en plasma.

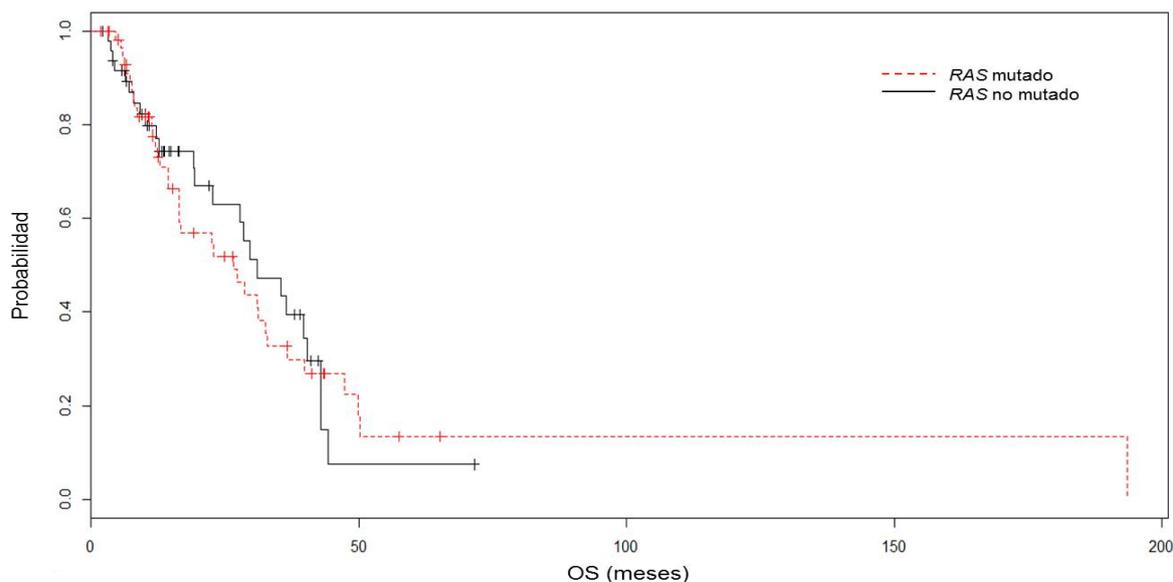


Figura 8. Supervivencia global de la población en función de status de la mutación de RAS en tejido sólido.

6.6 Características de la población con mutación de RAS en plasma

Tal y como se ha comentado en la sección material y métodos, se ha intentado seleccionar una población homogénea de pacientes. Para ello, se excluyeron los pacientes sin mutación de RAS en plasma (48 pacientes) y aquellos que realizaron tratamiento con terapia anti-EGFR previo a la extracción de la muestra y los pacientes que tenían enfermedad hepática limitada que fue reseca (20 pacientes). En total, el análisis de esta población se compone de 47 muestras de plasma procedentes de 42 pacientes dado que en 4 pacientes se ha extraído una muestra de sangre en más de un momento de la enfermedad (3 en primera y segunda línea, 1 paciente en primera, segunda y tercera línea).

Las principales características de la población se encuentran reflejadas en la tabla 14. Estos datos han sido desglosados por líneas de tratamiento siendo la mayor parte de las muestras extraídas en primera línea (29 muestras, 61.7% del total). En cuanto a la mutación más frecuente en esta población destaca KRAS exón 2 y más concretamente en el codón 12, donde en primera y segunda línea suponen más de la mitad de los casos. La segunda mutación más frecuente detectada en

plasma es también de *KRAS* en exón 2 pero en el codón 13. Además de esta mutación hay mutaciones en *KRAS* exón 3 (codón 61) y exón 4 (codón 117 y 141) así como mutaciones en *NRAS* (codón 12 del exón 2 y codón 61 del exón 3).

La mayor parte de los pacientes tenían tumores de colon izquierdo y recto (69, 58 y 50% en primera, segunda y tercera línea, respectivamente). En primera línea, la distribución de la localización tumoral es muy representativa de la distribución en la realidad clínica. Asimismo, la mayor parte de los pacientes presentaban al menos dos lugares diferentes de localización metastásica (65%, 91% y 67% en primera, segunda y tercera línea respectivamente). En cuanto a la localización metastásica, destaca que en los 3 momentos de extracción de la biopsia líquida, la mayor parte de los pacientes tienen afectación al menos hepática (82%, 84% y 83% para primera, segunda y tercera línea respectivamente). De nuevo, como en la población general del estudio, la distribución de metástasis más frecuente es la enfermedad hepática exclusiva (principalmente en primera línea con un 28% de las muestras procedentes de pacientes con esta característica). Sin embargo, como la mayor parte de los pacientes tienen al menos dos localizaciones metastásicas destaca que una cuarta parte de las muestras tanto de primera como de segunda línea procedían de pacientes que tenían metástasis pulmonares y hepáticas.

En cuanto a los tratamientos recibidos por parte de la población *RAS* mutada en plasma, la mayor parte de los pacientes en los que se analizó en primera línea recibieron quimioterapia basada en FOLFOX: solo en un paciente se optó por la opción de FOLFIRI y en dos por capecitabina. Por el contrario, en segunda línea aunque la mayoría de los pacientes recibió tratamiento con FOLFIRI, existe una mayor diversidad en el tratamiento. En el caso de la tercera línea, los pacientes recibieron diferentes tratamientos: un paciente recibió retratamiento con FOLFOX, un paciente recibió tratamiento con cetuximab dentro de ensayo clínico para mutación de *KRAS G13D* y el resto tratamiento dentro de ensayo clínico con inhibidores de MEK o inmunoterapia.

| | 1ª línea (29) N (%) | 2ª línea (12) N (%) | 3ª línea (6) N (%) |
|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Género | | | |
| Hombre | 19 (65%) | 7 (58%) | 4 (67%) |
| Mujer | 10 (35%) | 5 (42%) | 2 (33%) |
| RAS (mutación) | | | |
| <i>KRAS</i> 12 | 16 (55%) | 7 (58%) | 2 (33%) |
| <i>KRAS</i> 13 | 6 (21%) | 3 (25%) | 2 (33%) |
| <i>KRAS</i> (otras) | 3 (10%) | 1 (8%) | 2 (33%) |
| <i>NRAS</i> 12 | 1 (4%) | 0 | 0 |
| <i>NRAS</i> 13 | 0 | 0 | 0 |
| <i>NRAS</i> (otras) | 3 (10%) | 1 (8%) | 0 |
| N. localizaciones metastásicas | | | |
| 1 | 10 (35%) | 1 (8%) | 2 (33%) |
| 2 | 16 (55%) | 7 (58%) | 1 (17%) |
| 3+ | 3 (10%) | 4 (33%) | 3 (50%) |
| Localización de metástasis | | | |
| Exclusivamente hígado | 8 (28%) | 2 (17%) | 0 |
| Exclusivamente pulmón | 0 | 0 | 0 |
| Exclusivamente peritoneo | 1 (3%) | 0 | 0 |
| Exclusivamente ganglios | 1 (3%) | 1 (8%) | 0 |
| Hígado y pulmón | 7 (24%) | 3 (25%) | 1 (17%) |
| Hígado y peritoneo | 2 (7%) | 0 | 0 |
| Hígado y ganglios | 5 (17%) | 2 (17%) | 0 |
| Hígado, pulmón y ganglios | 1 (3%) | 1 (8%) | 3 (50%) |
| Hígado, ganglios, peritoneo y pulmón | 1 (3%) | 2 (17%) | 1 (17%) |
| Peritoneo y ganglios | 2 (7%) | 0 | 0 |
| Otros | 1 (1%) | 1 (8%) | 1 (17%) |
| Localización tumor primario | | | |
| Derecho | 9 (31%) | 5 (42%) | 3 (50%) |
| Izquierdo | 12 (41%) | 0 | 1 (17%) |
| Recto | 8 (28%) | 7 (58%) | 2 (33%) |
| Estadio al diagnóstico | | | |
| II | 1 (3%) | 1 (8%) | 2 (33%) |
| III | 2 (6%) | 1 (8%) | 2 (33%) |
| IV | 26 (90%) | 10 (83%) | 2 (33%) |
| Tratamiento recibido | | | |
| FOLFOX | 26 (90%) | 3 (25%) | 1 (17%) |
| FOLFIRI | 1 (3%) | 7 (58%) | 0 |
| Anti-angiogénicos | 9 (31%) | 5 (42%) | 0 |
| Otros | 2 (7%) | 2 (17%) | 5 (83%) |

Tabla 14. Principales características de la población homogénea a estudio con mutación de *RAS* en plasma.

6.7 Distribución de la MAF en la población *RAS* mutado

Se ha analizado en la población con mutación de *RAS* en plasma la fracción mutante alélica. La mediana de la MAF de *RAS* en esta población es de 9.9% con un rango desde 0.0014 a 52.4%. La distribución de la MAF en cada muestra analizada queda reflejada en la figura 9.

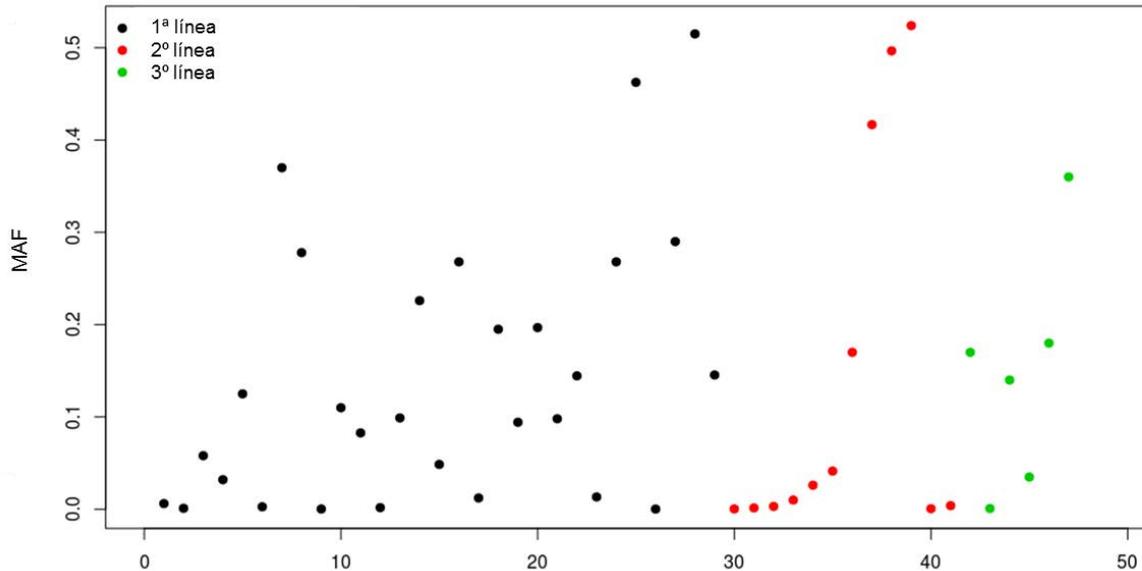


Figura 9. Distribución de la fracción mutante alélica por paciente.

6.8 Distribución y correlación de la MAF de *RAS* por línea

Se analizaron por separado la MAF de *RAS* en cada una de las líneas en las que se llevó a cabo la extracción de la muestra. La tabla 15 refleja la mediana y la distribución teniendo en cuenta 3 puntos de corte: menos del 1%, entre 1 y 10% y más del 10%. La media de MAF fue ligeramente más elevada en primera y tercera línea con respecto a la segunda línea.

| | 1º línea | 2º línea | 3º línea |
|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Mediana MAF | 9.9%(0.014-51.5%) | 1.8%(0.03-52.4%) | 12.4%(0.08-36%) |
| MAF | | | |
| <1% | 6 (21%) | 6 (50%) | 1 (17%) |
| 1-10% | 9 (31%) | 2 (17%) | 1 (17%) |
| >10% | 14 (48%) | 4 (33%) | 4 (66%) |

Tabla 15. Distribución de la MAF en función de la línea de tratamiento.

En lo que respecta a la correlación de la MAF de RAS con la línea cabe destacar que la correlación no fue estadísticamente significativa ($p=0.374$) pero se describe una tendencia a una MAF más baja en la segunda línea donde la mediana de MAF es inferior a 2% (figura 10).

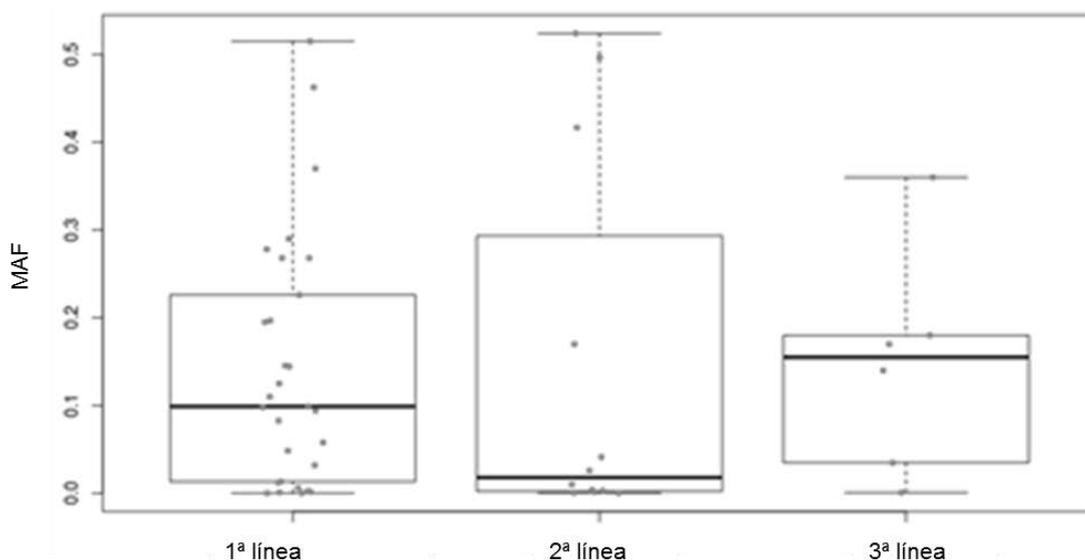


Figura 10. Distribución gráfica de la MAF de RAS por línea.

6.9 Correlación entre la MAF de RAS y la localización del tumor primario

Se analizó la correlación entre la MAF en tumores de colon derecho (que incluye colon ascendente, ciego y colon transversal) y tumores de colon izquierdo (descendente, sigma y recto). La distribución de la MAF en ambos grupos se puede ver en la figura 11. La mediana de MAF de RAS en tumores de colon derecho es de 12.5% (rango 0.03-51.5%) frente a 8.3% (rango 0.01-52.4%). Sin

embargo, no se observó correlación estadísticamente significativa entre localización y MAF ($p=0.329$).

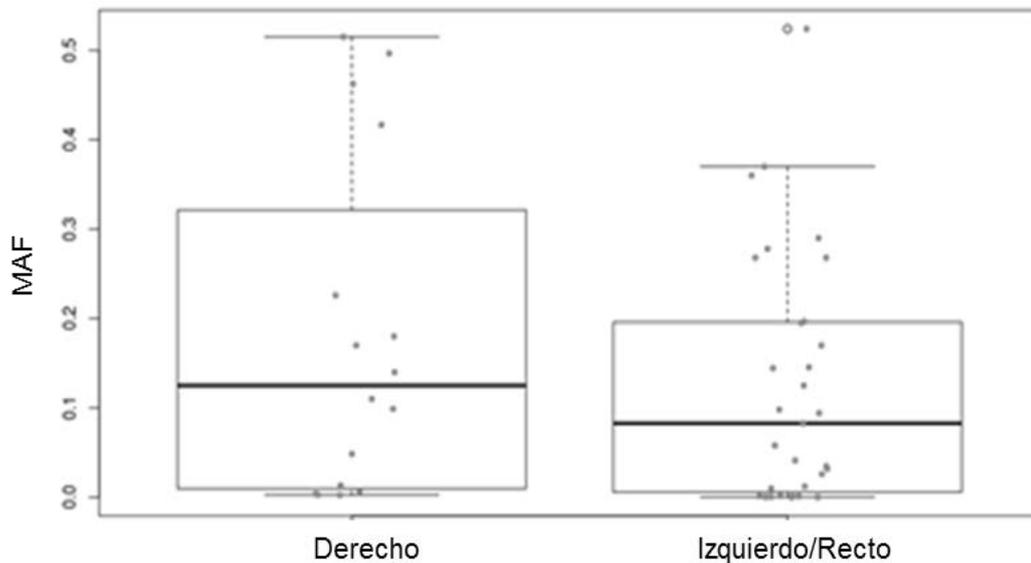


Figura 11. Distribución de la MAF de *RAS* por localización de tumor primario.

6.10 Correlación entre la MAF de *RAS* y el número de sitios de metástasis

Se analizó la distribución y correlación de la MAF de *RAS* con el número de sitios metastásicos (uno, dos o tres o más localizaciones afectadas). La distribución de la MAF se puede ver en la figura 12. En el caso de una localización, la mediana de los valores de MAF de *RAS* fue de 14% (rango 0.01-51.5%); en dos localizaciones la mediana fue de 9.4% (rango 0.01-49.6%); en tres o más localizaciones la mediana fue de 0.2% (0.01-52.4%). De nuevo, no se observa correlación estadísticamente significativa entre el número de localizaciones metastásicas y la MAF ($p=0.323$).

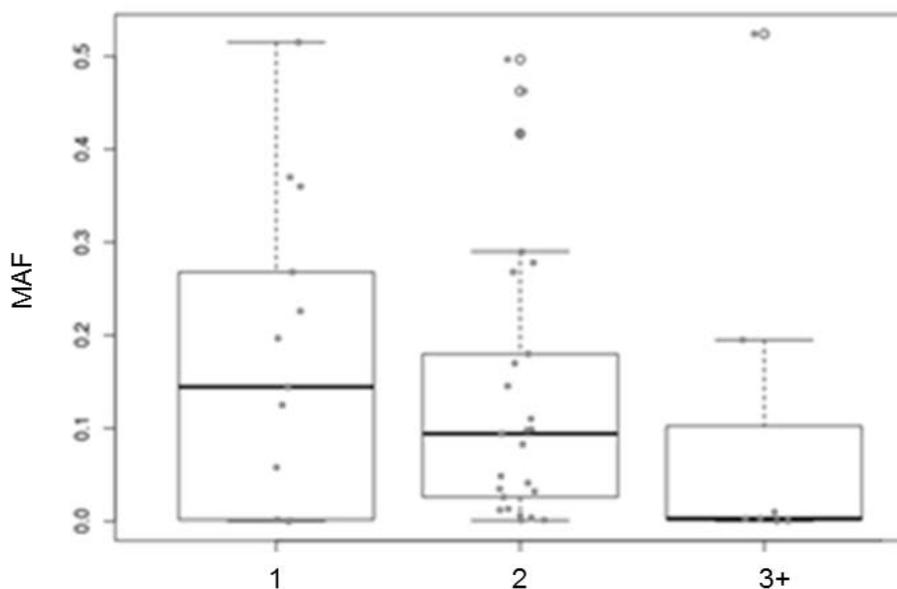


Figura 12. Distribución de la MAF de RAS por número de localizaciones metastásicas.

6.11 Correlación entre la MAF de RAS y la localización de las metástasis

Se analizó la distribución y la correlación de la MAF según la localización de las metástasis. La figura 13 muestra la distribución teniendo en cuenta que en algunos pacientes había más de una localización metastásica. Las medianas de la MAF en las muestras de pacientes con metástasis hepáticas fue de 9.8% (rango 0.01-52.4%), con metástasis pulmonares 3.5% (rango 0.01-46.25%), con afectación ganglionar 9.5% (rango 0.01-52.4%) y con metástasis peritoneales 0.3% (rango 0.01-10%). En este caso, la mediana de MAF de RAS fue significativamente menor en los pacientes con metástasis peritoneales comparado con aquellos con metástasis hepáticas ($p=0.0003$), pulmonares ($p=0.044$) o ganglionares ($p=0.025$). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre la MAF y la presencia de metástasis hepáticas y pulmonares o las pulmonares y ganglionares.

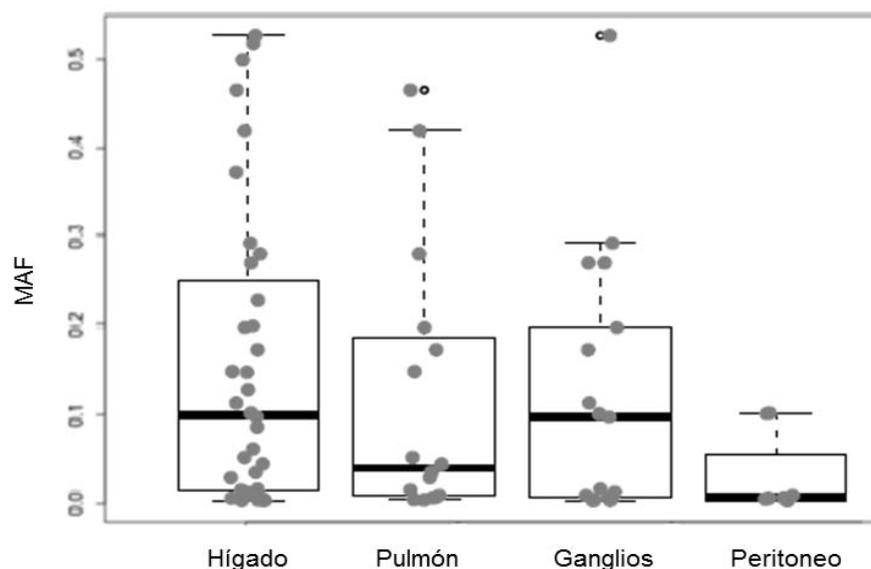


Figura 13. Distribución de la MAF de *RAS* por localización metastásica.

6.12 Correlación entre la MAF de *RAS* y los marcadores tumorales

Se realizó un análisis de correlación entre los marcadores tumorales CEA y CA19.9 con la MAF. Hay que tener en cuenta que estos valores no estaban disponibles en todos los pacientes. No parece existir una correlación estadísticamente significativa entre la MAF y los marcadores tumorales en el caso de CEA (cor: 0.056, $p=0.792$) como se puede observar en la figura 14. De forma similar, en el caso de CA 19.9 (cor: 0.232, $p=0.311$) tampoco se observan diferencias. Sin embargo, parece que hay una tendencia a mayores niveles de CA 19.9 y CEA en aquellas muestras con mayores niveles de MAF.

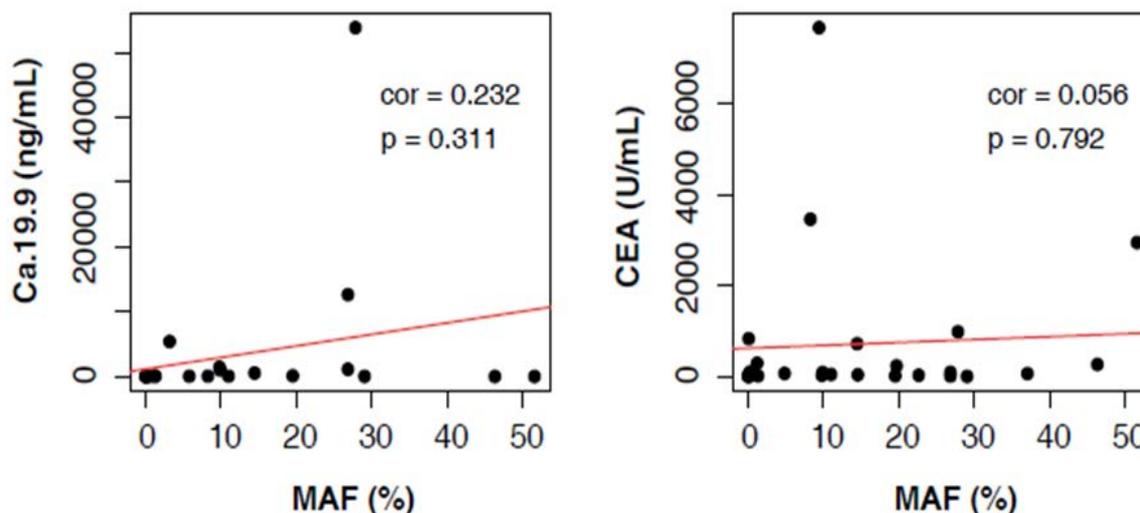


Figura 14. Correlación entre CEA 19.9 y CEA con la MAF (%).

6.13 Correlación de la MAF con respuesta al tratamiento

Se analizó la distribución de la MAF en función de la mejor respuesta al tratamiento en la línea en la que se realizó el análisis del plasma. La distribución se puede observar en la figura 15. La mediana de MAF en el grupo de pacientes con progresión al tratamiento fue de 29% (rango 0.01-52.4%), con estabilidad fue de 4.9% (rango de 0.01-51.5%), con respuesta al tratamiento fue de 2.6 % (rango de 0.01-26.8%). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0.007$ en el global de la población independientemente de la línea siendo significativamente mayor en pacientes con progresión de la enfermedad como mejor respuesta comparando con respuesta parcial) ($p=0.002$); asimismo los pacientes con progresión como mejor respuesta también mostraron significativamente MAF mayor comparados con los pacientes con enfermedad estable ($p=0.014$).

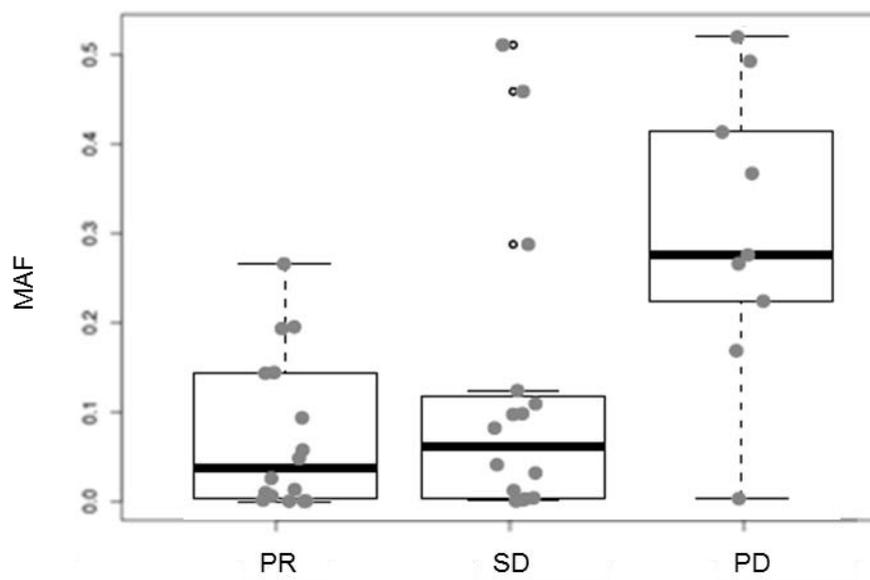


Figura 15. Correlación de MAF con mejor respuesta al tratamiento.
(PR: respuesta parcial; SD: enfermedad estable; PD: progresión de la enfermedad).

6.14 Impacto de la MAF de *RAS* en primera línea

6.14.1 Impacto en PFS y OS según corte optimizado

En primera línea de tratamiento, usando el corte optimizado de 5.8% tal y como se ha explicado en la sección material y métodos, la PFS no fue estadísticamente significativa mejor para las muestras con una MAF menor de 5.8%. Sin embargo, hay una tendencia a una menor PFS para los pacientes con MAF $\geq 5.8\%$ como se puede observar en la figura 16. En cuanto a la mediana de PFS fue de 321 días (10.7 meses) en los pacientes con MAF en plasma inferior a 5.8% *versus* 209 días (7 meses) en los que presentaban MAF $\geq 5.8\%$ en plasma. En el caso de la curva de supervivencia libre de progresión, la HR fue de 2.2 (IC 95% 0.94-7.20; $p=0.06$).

Respecto a la OS, parece existir una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con MAF $\geq 5.8\%$ y los que presentan MAF $< 5.8\%$ como se observa en la figura 17. La mediana de OS fue de 801 días (26.7 meses) en los pacientes con MAF en plasma inferior a 5.8% *versus* 343 días (11.4 meses) en los pacientes con MAF en plasma superiores a 5.8%. La HR de esta curva de supervivencia fue en este caso de 3.5 (IC 95% 2.08-43.1; $p=0.0006$).

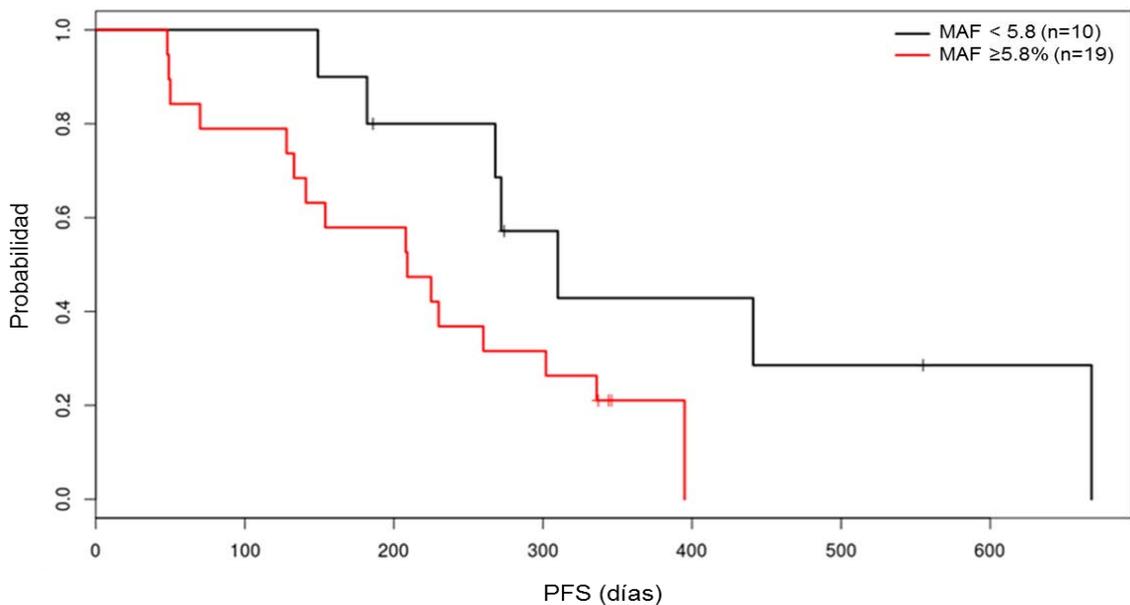


Figura 16. Supervivencia libre de progresión en primera línea de acuerdo al corte óptimo de la MAF (5.8%).

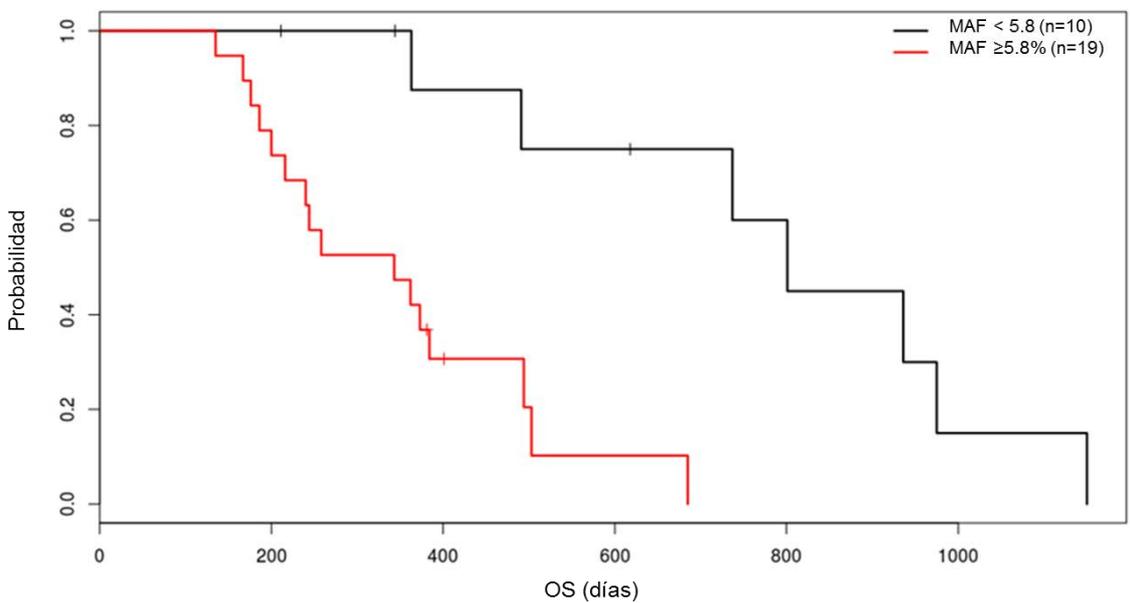


Figura 17. Supervivencia global en primera línea en función del corte optimizado de MAF (5.8%).

6.14.2 Impacto en PFS y OS según corte de MAF del 1%

En el caso del corte del 1%, los datos son similares a los obtenidos con el corte de 5.8%.

A pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas, hay una tendencia a una peor PFS en aquellos pacientes con $MAF \geq 1\%$. En cuanto a la mediana de PFS fue de 376 días (12.5 meses) en los pacientes con MAF en plasma inferior a 5.8% *versus* 225 días (7.5 meses) en los que presentaban MAF $\geq 5.8\%$ en plasma; en este caso la HR de la curva de PFS fue de 2.24 (IC 95% 0.93-13.3; $p=0.06$) (figura 18).

Respecto a la OS, los pacientes con $MAF < 1\%$ presentan una mayor OS que aquellos con $MAF \geq 1\%$. La mediana de OS fue de 936 días (31.2 meses) en los pacientes con MAF en plasma inferior a 1% *versus* 343 días (11.4 meses) en los pacientes con MAF en plasma igual o superior a 1%. La HR para esta supervivencia global fue de 3.38 (IC 95% 1.85-38.47; $p=0.0002$) (figura 19).

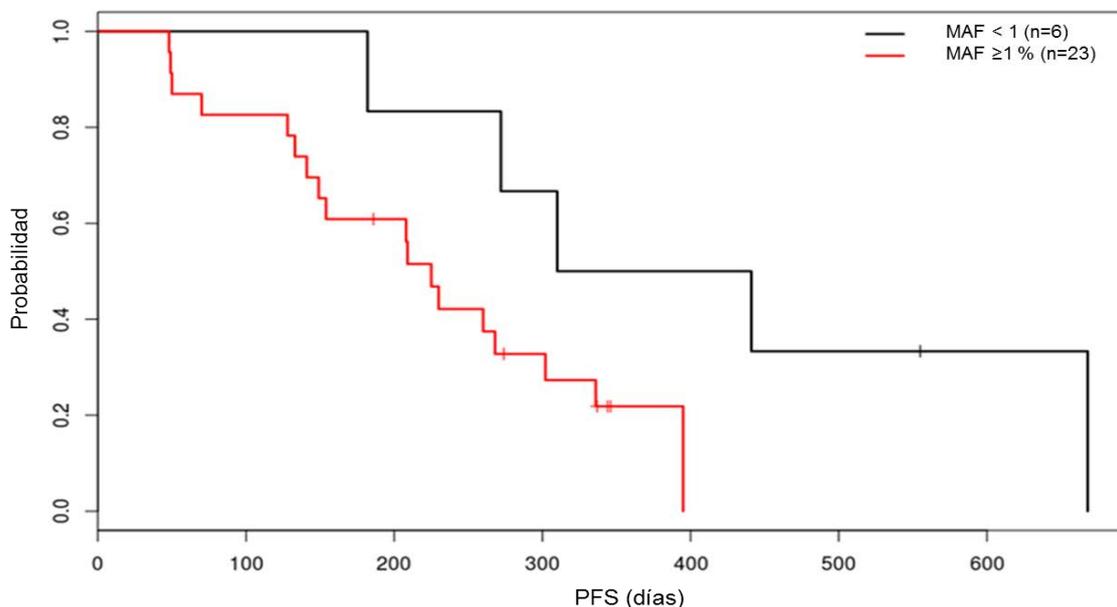


Figura 18. Supervivencia libre de progresión en primera línea de acuerdo al corte del 1%.

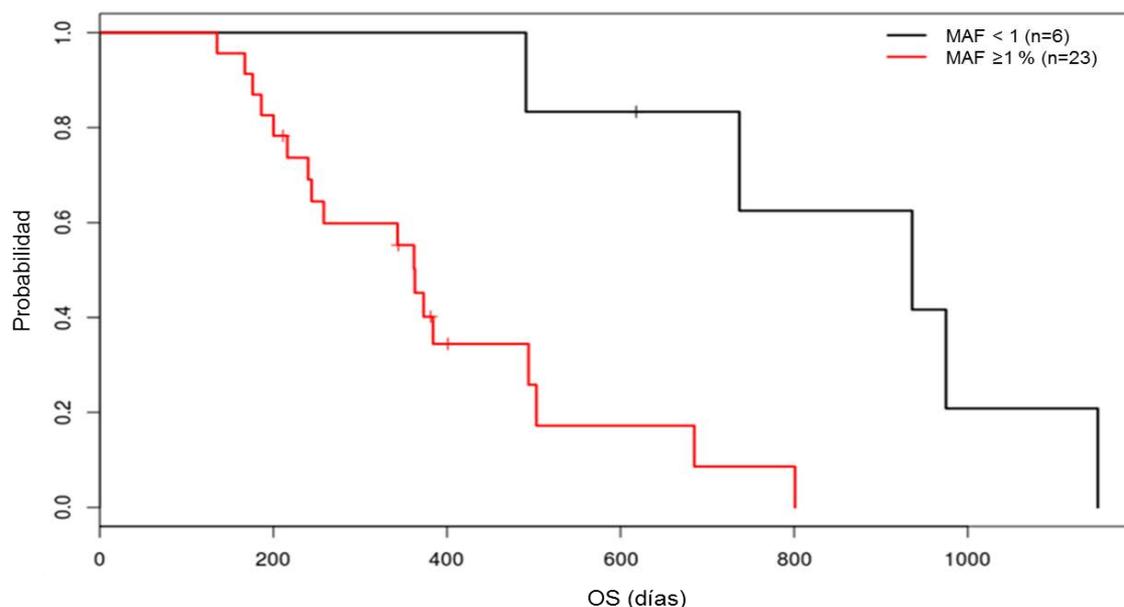


Figura 19. Supervivencia global en primera línea de acuerdo al corte del 1%.

6.14.3 Impacto en PFS y OS según corte de MAF del 10%.

De nuevo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en términos de PFS aunque hay una tendencia a una PFS más prolongada en aquellos pacientes con MAF <10% aunque menos que en el resto de cortes como se observa en la figura 20. En cuanto a la mediana de PFS fue de 268 días (8.9 meses) en los pacientes con MAF en plasma inferior a 10% *versus* 228 días (7.6 meses) en los que presentaban MAF ≥10% en plasma; en este caso la HR para la PFS de esta población fue de 1.66 (IC 95% 0.733-4.19; p=0.2).

Con respecto a la OS, se observa que los pacientes con MAF ≥10% en sangre tienen una peor supervivencia (figura 21). En cuanto a la mediana de OS fue de 732 días (24.1 meses) en los pacientes con MAF en plasma inferior a 10% *versus* 362 días (11.9 meses) en los pacientes con MAF ≥10% en plasma; en este caso la HR de la curva de supervivencia fue de 2.27 (IC 95% 1.061-7.918; p=0.03).

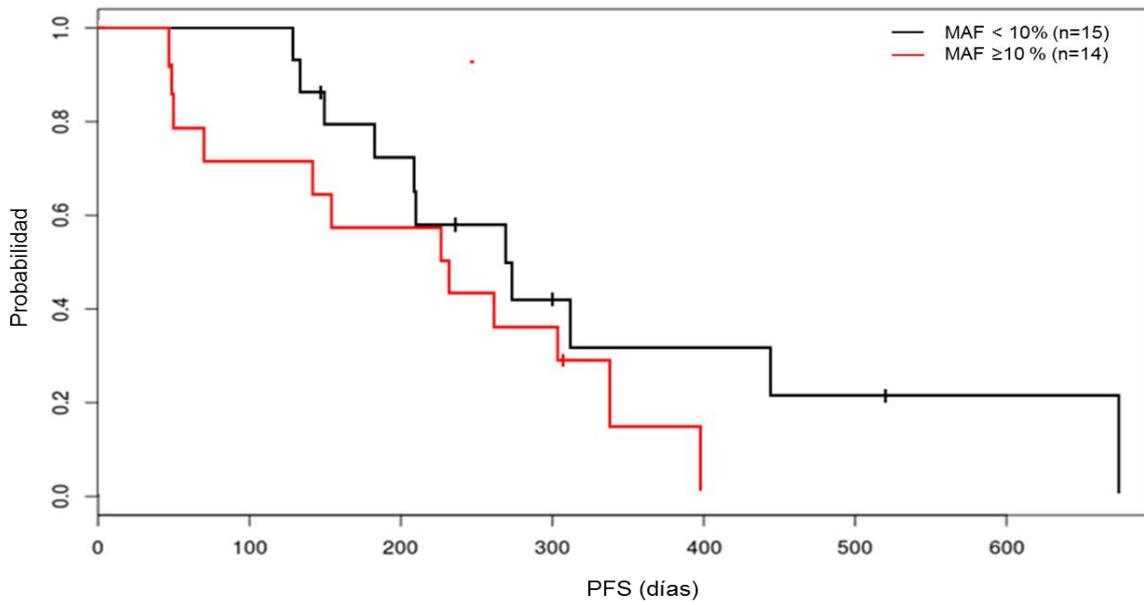


Figura 20. Supervivencia libre de progresión en primera línea de acuerdo al corte del 10%.

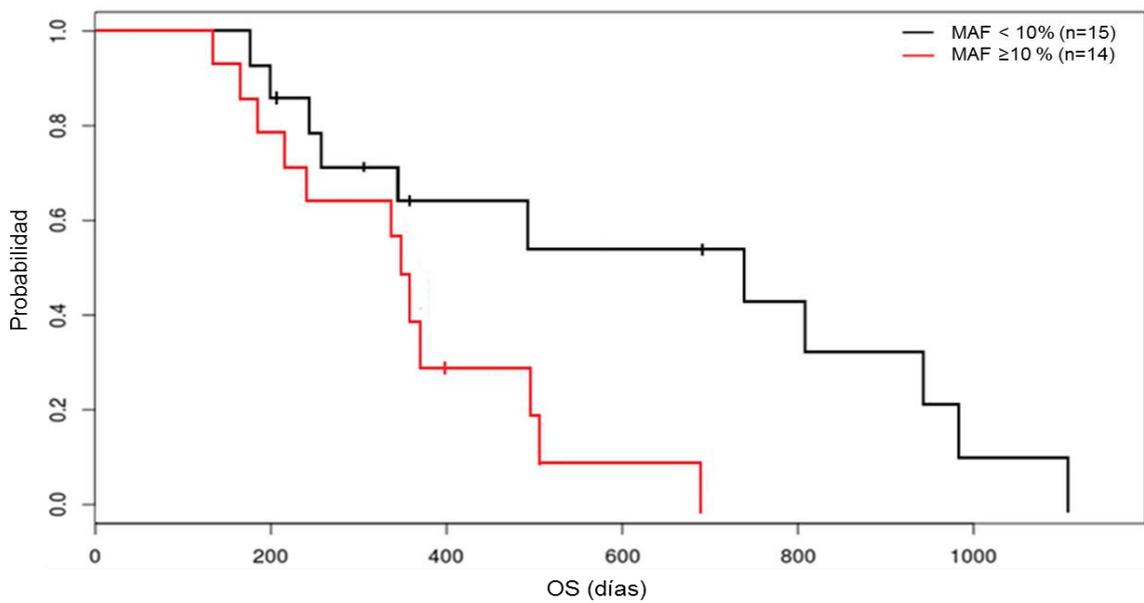


Figura 21. Supervivencia global en primera línea de acuerdo al corte del 10%.

6.15 Impacto de la MAF de RAS en pronóstico en segunda línea

6.15.1 Impacto en PFS y OS según corte optimizado (5.8%)

En este caso, la PFS fue estadísticamente significativamente menor para los pacientes con MAF $\geq 5.8\%$ como se observa en la figura 24. La mediana de PFS en los pacientes con muestras de plasma con MAF $\geq 5.8\%$ fue de 24 días (0.8 meses) *versus* 312 días (10.4 meses) en aquellos pacientes con MAF $< 5.8\%$. En esta curva de PFS, la HR de 6.6 (IC 95% 4.33-21.5; $p < 0.0001$) a favor de éstos últimos (figura 22).

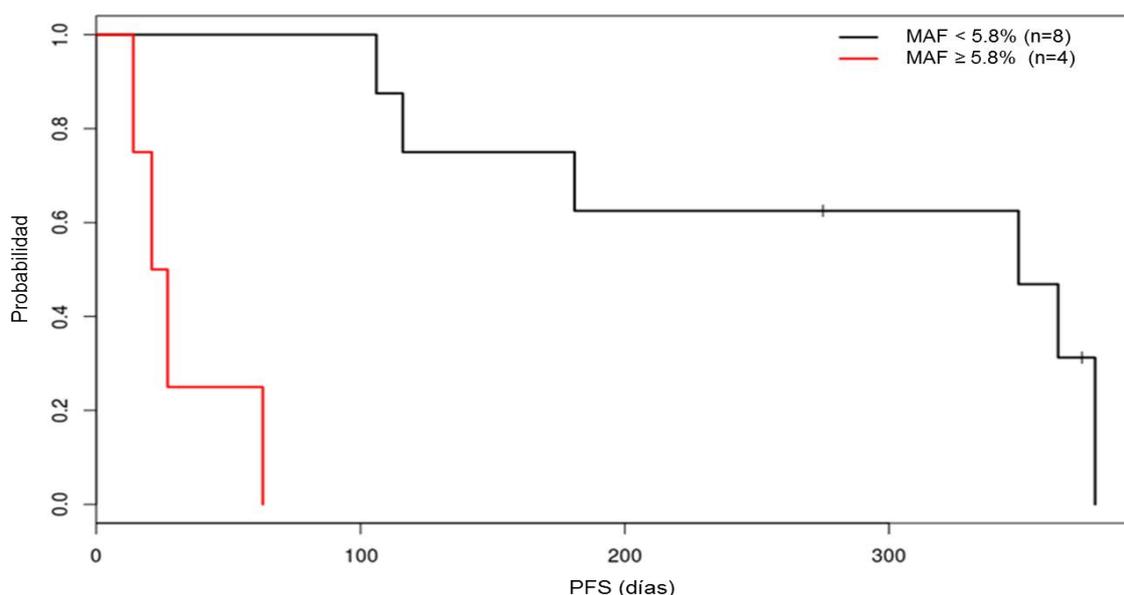


Figura 22. Supervivencia libre de progresión en segunda línea de acuerdo al corte optimizado del 5.8%.

De nuevo, utilizando el punto de corte optimizado de 5.8%, la OS fue significativamente mayor en aquellos pacientes con muestras de plasma con MAF $< 5.8\%$ como se puede observar en la figura 23. La mediana de OS en los pacientes con muestras de plasma con MAF $< 5.8\%$ fue de 1258 días (41.9 meses) *versus* 222 días (7.4 meses) en los pacientes con MAF $\geq 5.8\%$. La HR para la curva de OS fue de 6.6 (IC 95% 4.33-21.5; $p < 0.0001$) a favor de MAF $< 5.8\%$.

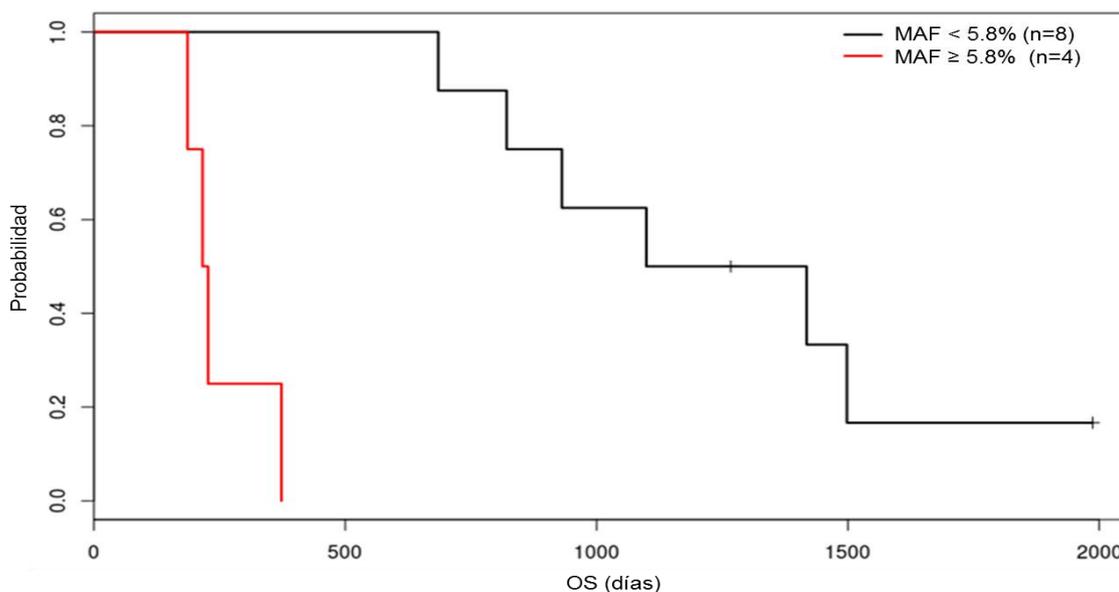


Figura 23. Supervivencia global en segunda línea de acuerdo al corte optimizado del 5.8%.

6.15.2 Impacto en PFS y OS según corte del 1%

En el caso de la PFS, los pacientes con muestras con $MAF < 1\%$ tienen una mejor PFS que los que presentan $MAF \geq 1\%$ como se observa en la figura 24. En este caso, la mediana de PFS de los pacientes con $MAF < 1\%$ es de 356 días (11.9 meses) *versus* 45 días (1.5 meses) en los pacientes con $MAF \geq 1\%$ siendo en este caso la HR de la curva de PFS de 7.06 (IC 95% 1.368-36.5; $p=0.0075$).

En el caso de la OS, de nuevo los pacientes con muestras con $MAF < 1\%$ tienen una mejor OS que los que presentan $MAF \geq 1\%$ como se observa en la figura 25. En este caso, la mediana de OS de los pacientes con $MAF < 1\%$ es de 1258 días (41.9 meses) *versus* 300 días (9.9 meses) en los pacientes con $MAF \geq 1\%$ siendo en este caso la HR de la curva de OS de 4.29 (IC 95% 0.96-19.15; $p=0.043$).

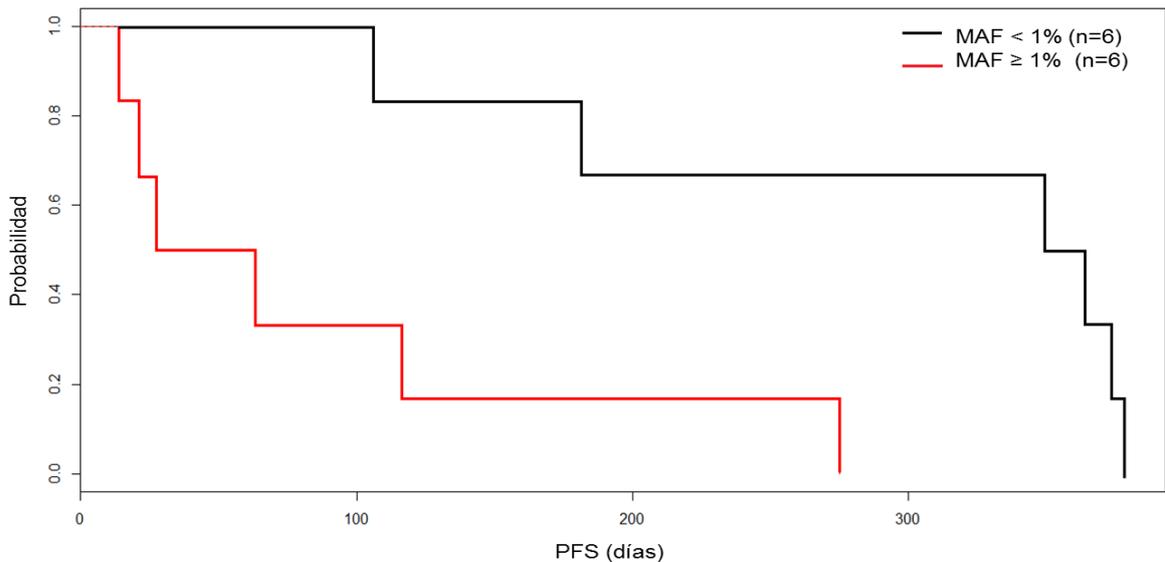


Figura 24. Supervivencia libre de progresión en segunda línea de acuerdo al corte del 1%.

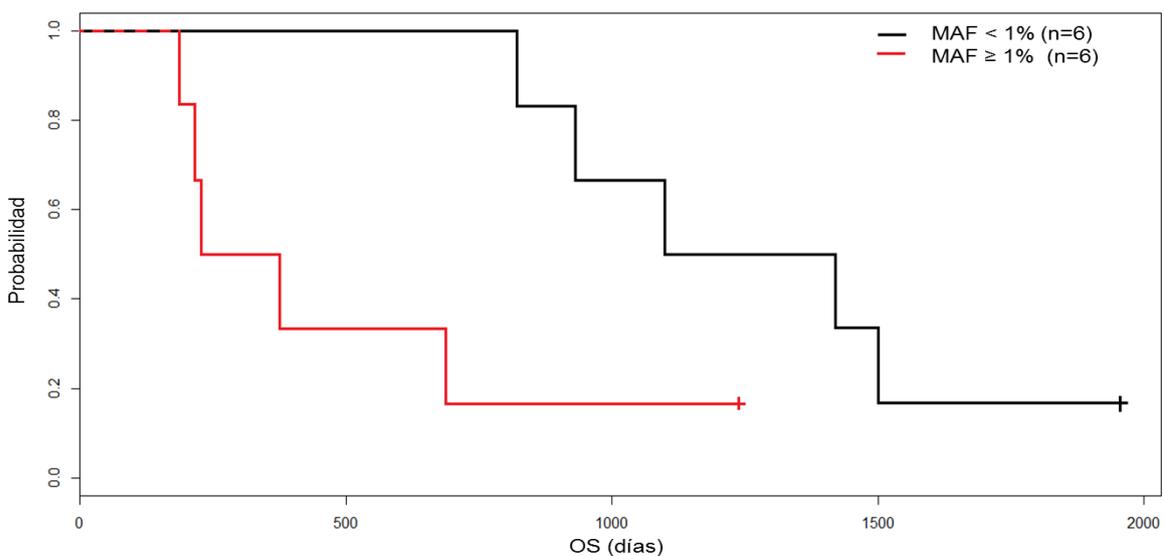


Figura 25. Supervivencia global en segunda línea de acuerdo al corte del 1%.

6.15.3 Impacto en PFS y OS según corte del 10%

En el corte del 10% las curvas de PFS y OS son idénticas a la de 5.8% dado que no existen muestras en segunda línea con MAF entre 5.8 y 10% y por ello no se reproducen al ser las curvas de Kaplan-Meier idénticas al corte del 5.8%

6.16 Impacto de la MAF de *RAS* en pronóstico en tercera línea

En tercera línea no se ha podido demostrar diferencias estadísticamente significativas ni en PFS ni en OS con el corte optimizado del 5.8%, ni del 1 ni del 10% debido probablemente a que sólo hay 6 muestras de plasma analizadas y a la poca representatividad de las mismas aunque de nuevo existe una tendencia a peor OS y PFS en los pacientes con MAF más altos en plasma. En el caso del punto optimizado del 5.8% las gráficas se representan en las figuras 26 y 27.

En cuanto a la mediana de PFS fue de 195 días (6.5 meses) en los pacientes con MAF en plasma inferior a 5.8% *versus* 83.5 días (2.8 meses) en los que presentaban MAF superior o igual a 5.8% en plasma; en esta curva de PFS la HR fue de 3.93 (IC 95% 0.03-2.37; $p=0.198$).

La mediana de OS fue de 3244 días (108 meses) en los pacientes con MAF en plasma inferior a 5.8% *versus* 769 días (25.6 meses) en los pacientes con MAF en plasma igual o superiores a 5.8%. La HR de esta curva de OS fue de 1.97 (IC 95% 0.05-4.74; $p=0.546$).

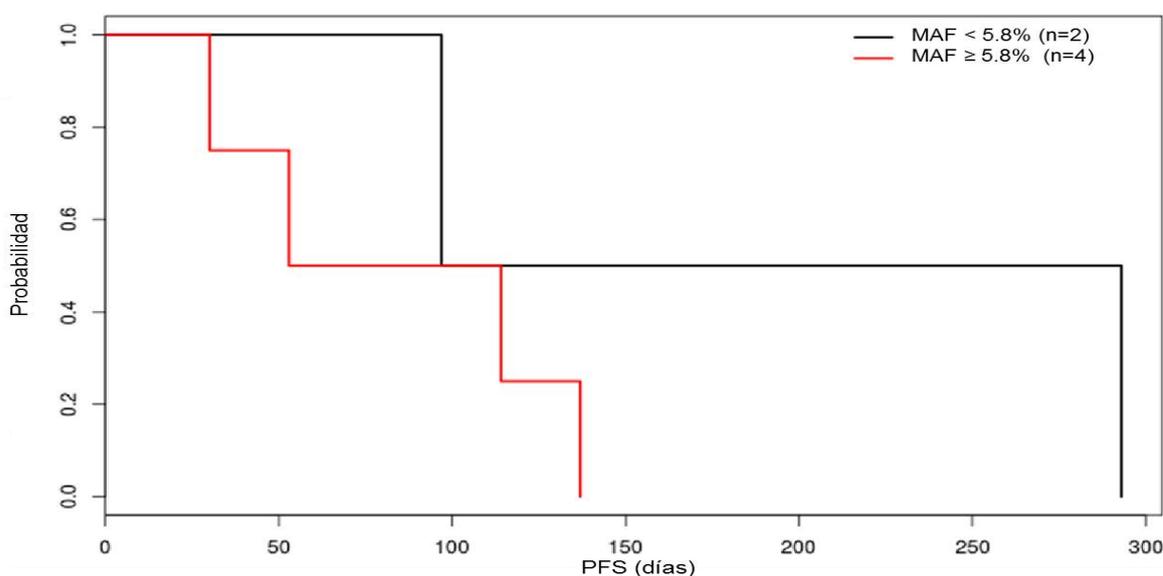


Figura 26. Supervivencia libre de progresión en tercera línea de acuerdo al corte optimizado del 5.8%.

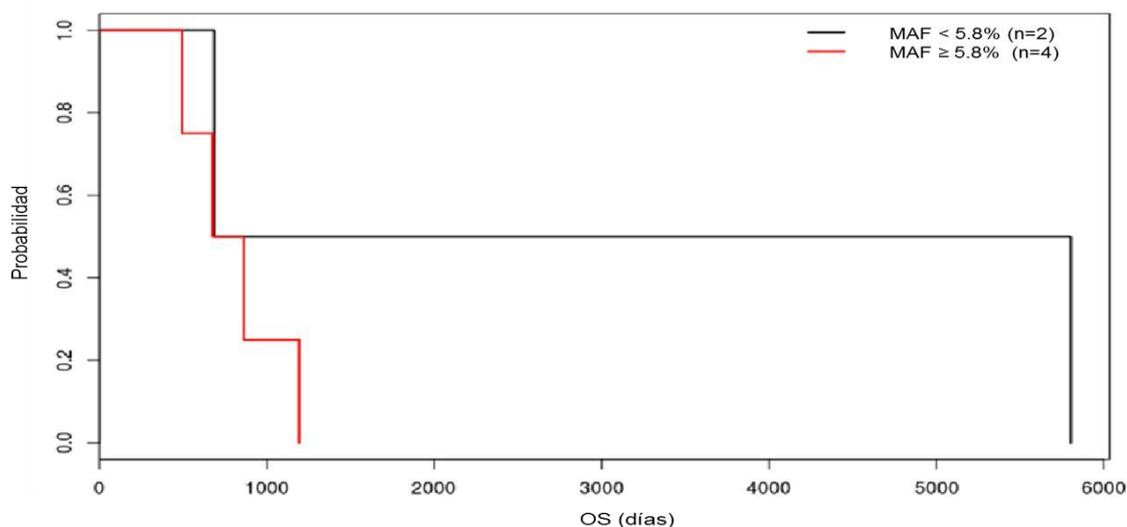


Figura 27. Supervivencia global en tercera línea de acuerdo al corte optimizado del 5.8%.

6.17 Análisis multivariante en primera línea para PFS y OS

Se realizó por último un análisis multivariado de Cox en la cohorte de primera línea incluyendo como variables la MAF de *RAS*, localización tumoral, número de sitios metastásicos, género y niveles de CEA. El factor pronóstico más fuerte fue la MAF de *RAS* como se puede observar en la tabla 16; en el caso de PFS (HR 3.74; IC 95% 1.01-13.92; $p=0.049$) y en OS (HR 2.73; IC 95% 2.35-182.53; $p=0.006$). El resto no fueron estadísticamente significativos.

| Factor riesgo | PFS | | | OS | | |
|---------------|------|-------------|---------|------|-------------|---------|
| | HR | IC 95% | p-valor | HR | IC 95% | p-valor |
| Género | 2.37 | 0.77 – 7.38 | 0.135 | 1.20 | 0.33 – 4.38 | 0.778 |
| Lateralidad | 0.54 | 0.17 – 1.74 | 0.303 | 0.32 | 0.08 – 1.19 | 0.088 |
| CEA | 0.99 | 0.99 – 1.00 | 0.656 | 0.99 | 0.99 – 1.00 | 0.711 |
| N. metástasis | 1.04 | 0.32 – 3.37 | 0.947 | 1.05 | 0.30 – 3.70 | 0.935 |
| MAF | 3.74 | 1.01–13.92 | 0.049 | 2.73 | 2.35– 182.5 | 0.006 |

Tabla 16. Análisis multivariante de Cox en primera línea para distintos factores pronósticos en PFS y OS.

7. Discusión

En este trabajo se presenta el análisis global de una población de pacientes de cáncer colorrectal tratados de forma similar en dos centros de referencia en los cuáles se ha realizado determinación del status de *RAS* en tejido sólido y en sangre estableciendo así su correlación. Asimismo, se ha estudiado el impacto de dicha mutación de forma cuantitativa en sangre en cuanto a pronóstico y correlación con otras variables clínico-patológicas. A continuación, se discuten las principales características de la muestra y limitaciones del estudio, así como los principales resultados y su comparación con estudios similares presentados en el último año.

7.1 Selección de la muestra

La muestra seleccionada se compone de 110 pacientes mayoritariamente en primera línea a los que se les ha extraído una muestra de sangre en la que se ha analizado la presencia de la mutación de *RAS*. Destaca que sólo en 4 pacientes se han obtenido muestras en al menos 2 momentos diferentes de la enfermedad no pudiéndose establecer una correlación directa entre muestras del mismo paciente. En cuanto a los resultados sobre la MAF de *RAS* obtenidos de la población *RAS* mutada en sangre, el número de muestras analizadas en total fueron 47 de un total de 42 pacientes. En realidad, el número de muestras con mutación de *RAS* era mayor (67 muestras) pero en el análisis se excluyeron aquellos pacientes que habían sido sometidos a cirugía de enfermedad hepática dado que esta cirugía impacta en el pronóstico del paciente y puede modificar la supervivencia de los pacientes. Asimismo, se dividen estas muestras en el momento en el que se ha extraído la muestra de plasma. Con esta selección, se intenta homogeneizar los pacientes en cuanto a los tratamientos recibidos e intentar minimizar el impacto de los tratamientos previos. De hecho, en los estudios publicados hasta la fecha en los que se analiza el impacto de la MAF en pronóstico, la población es heterogénea incluyendo pacientes que han sido sometidos a cirugía de enfermedad metastásica y en diferentes líneas. No obstante, pese a excluir algunos pacientes, el número de muestras analizadas es

como se explicará posteriormente similar a la presentada en los pocos trabajos publicados donde se analiza de forma exploratoria el impacto de la MAF en pronóstico.

7.2 Principales limitaciones del estudio

El estudio tiene dos principales limitaciones. El primero es el tamaño muestral. Los estudios realizados de biopsia líquida que analizan la concordancia entre distintas técnicas en sangre y tejido sólido han incluido de forma retrospectiva mayoritariamente entre 95 pacientes y 146 pacientes por lo que la muestra de nuestro estudio es similar a estudios previos realizados (166-169). Solo un estudio prospectivo publicado en este ámbito ha analizado hasta 300 muestras (267). A pesar de que el número de pacientes incluidos es similar a otros estudios similares de biopsia líquida en cáncer colorrectal, a la hora de analizar el impacto en supervivencia de la MAF el número de pacientes es limitado sobretudo en segunda (12 muestras) y tercera línea (6 muestras) donde los resultados deben tomarse con mayor cautela como se explicará más adelante en esta discusión.

La segunda limitación es el carácter retrospectivo del estudio. A pesar de que existen 39 muestras (lo que supone un tercio del total) que fueron recogidas con los datos clínico-patológicos de forma prospectiva, la mayor parte de las mismas proceden de los pacientes a los que se les había extraído sangre y se había almacenado en la seroteca de los centros participantes, por lo que, en este caso, los datos extraídos son retrospectivos. Este hecho hace que tengamos que valorar con cautela los resultados obtenidos dado que este tipo de estudios presentan probablemente diferentes sesgos como de selección o de informe u otros factores de confusión no controlados. No obstante, hay que tener en cuenta que se han incluido todas las muestras disponibles sin excluirse del análisis global ninguna muestra y que la obtención de los datos clínicos-patológicos y de supervivencia se han recogido de forma independiente previamente a obtener los resultados de la MAF en plasma, lo cual minimiza los posibles sesgos de selección e información.

7.3 Características de la población de estudio

En cuanto a las características de los pacientes estudiados es similar a la de población afecta de carcinoma colorrectal metastásico. La edad media de 62 años algo inferior a la media al diagnóstico en el mundo occidental que se encuentra en torno a 68 años para cáncer de colon y 62 para cáncer de recto (228). En cuanto a la distribución por sexo es más frecuente en hombres, algo que concuerda con los datos publicados donde según el área geográfica, la incidencia en mujeres suele ser hasta un 30-40% menor que en hombres (1, 228).

Respecto a la localización del tumor primario, la distribución encontrada es similar a la publicada en series más amplias como el estudio nacional sueco donde se objetivaba una distribución de 31%, 29% y 41% para tumores de colon derecho, izquierdo y recto teniendo en cuenta todos los estadios; teniendo en cuenta sólo los estadios metastásicos como en nuestro estudio se objetivan 35.7%, 30% y 34.3% respectivamente (229). Sin embargo, las estadísticas publicadas en 2017 en Estados Unidos muestran una distribución diferente con un 41% de tumores proximales, un 22% distales y un 28% de recto en la población global independientemente del estadio analizado (228). En cuanto a la localización de las metástasis, hasta un tercio de pacientes presentan exclusivamente enfermedad hepática algo que concuerda con otras series más amplias donde la localización única más frecuente de metástasis es el hígado (230). Asimismo, prácticamente un 75% de los pacientes presentaban al menos metástasis hepáticas, algo también observado en series más amplias (299).

En lo que se refiere a los tratamientos realizados, destaca que la mayor parte de los pacientes reciben en primera línea tratamiento con FOLFOX (76.3%) seguido de FOLFIRI (17.2%) y FOLFOXIRI (0.9%) lo que supone que prácticamente el 95% de la población del estudio recibe tratamiento óptimo en primera línea de acuerdo a las guías europeas (11). El resto de pacientes reciben tratamientos para paciente frágiles como capecitabina, tratamientos para paciente con cardiopatía isquémica como oxaliplatino-raltitrexed y dos pacientes participan en ensayos clínicos con inhibidores de BRAF al presentar mutación de *BRAF V600E*.

7.4 Determinación de RAS en tejido tumoral y biopsia líquida

En el caso de este estudio, la determinación de RAS en tejido tumoral se realiza mediante técnica de PCR en tiempo real mientras que la determinación de RAS en plasma se realiza mediante BEAMing. En la actualidad, la determinación de RAS en tejido tumoral está recomendada realizarla por técnicas de PCR en tiempo real, PCR digital o NGS y se recomienda utilizar el tumor primario o metástasis hepáticas como ocurrió en nuestra serie (11). El panel debe incluir al menos las mutaciones de KRAS exones 2, 3 and 4 (codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146) y NRAS exones 2, 3 y 4 (codones 12, 13, 59, 61 y 117). En cuanto a la distribución de las alteraciones un 32% de pacientes no presentan alteraciones en estos genes ni en BRAF, proporción similar a la observada en distintos estudios. La proporción de mutación de BRAF es del 6.36% similar a la reportada en población metastásica (98). Respecto a la mutación de RAS supone un 61.46%; la alteración en el exón 2 de KRAS es sin duda la más prevalente: supone el 39.09% de la población total y más de la mitad de la población mutada, también similar a otras series reportadas en tejido sólido.

En el caso de las alteraciones encontradas en plasma, a día de hoy no hay una recomendación clara por parte de las guías españolas, europeas o americanas de la técnica a emplear y las alteraciones a analizar. Los primeros estudios planteados analizaron la mutación de KRAS y BRAF usando técnicas de PCR cuantitativa incluyendo sólo 7 alteraciones de KRAS (todas de codón 12 y 13) (166). Los estudios más recientes incluyen técnicas como el BEAMing de nuestro estudio (167-170) o NGS (171) que incluyen el RAS extendido recomendado en la biopsia sólida y que ha sido analizado en nuestro estudio. En cuanto a la distribución de estas mutaciones en la muestra de este estudio, teniendo en cuenta que no se realiza detección de BRAF es muy similar a la observada en biopsia sólida destacando de nuevo un 56.4% de la población global con mutación en RAS extendido, principalmente en exón 2 y 3 de KRAS en más de la mitad de los casos. Esta frecuencia es ligeramente superior a los 4 estudios publicados más importantes publicados que analizan RAS extendido en plasma: 39% (167), 51.3% (170), 51% (168) y 45% (171).

7.5 Concordancia entre la mutación de *RAS* en tejido sólido y plasma

En este estudio se ha establecido la concordancia entre la determinación de *RAS* en tejido sólido mediante PCR en tiempo real y plasma mediante BEAMing observándose una concordancia global del 90%, con un índice *kappa* de 0.80, lo que indica prácticamente perfecta concordancia. La sensibilidad y especificidad es del 91.8% y 87.8% respectivamente. Si desglosamos por *KRAS* y *NRAS* dicha concordancia es del 91.8% y 96.3%, con un índice *kappa* de 0.84 para cada una, lo que implica una excelente concordancia. Varios estudios previos y en paralelo a éste han analizado esta concordancia por estas dos técnicas con resultados similares al nuestro. En el caso del estudio de Grasselli *et al*, la concordancia entre ambas técnicas fue prácticamente superponible (89.7%, *kappa*: 0.8) a la de nuestro estudio analizándose en ese estudio también la concordancia entre BEAMing de tejido tumoral y plasma (88.5%, *kappa*: 0.79). La sensibilidad y especificidad en este estudio fue del 90% y 89% respectivamente, muy similar a lo observado en nuestra cohorte (167). De forma similar, en el estudio de Schmiegel *et al*, también se evaluó la concordancia entre PCR en tiempo real en tumor sólido y BEAMing en plasma, detectándose una concordancia global del 91.8% aunque conviene destacar que en este estudio se habían incluido un 8% de pacientes sin enfermedad metastásica. Al excluir estos pacientes, la concordancia global sube hasta 92.8% (168). En el estudio de Vidal *et al*, la concordancia observada entre BEAMing en plasma y PCR en tiempo real en tumor fue ligeramente superior (93%, *kappa*: 0.84) a la de nuestro estudio (169). Un estudio retrospectivo a partir de las muestras de plasma extraídas del estudio CAPRI-GOIM liderado por Normanno *et al* ha analizado como en los 3 estudios previos la concordancia entre plasma y tejido sólido ofreciendo en este caso una concordancia global claramente inferior a nuestro estudio y a los tres previamente mencionados (78.3%), probablemente debido al menor número de muestras con mutación de *RAS* con respecto al resto de estudios analizados (170). Otros estudios han analizado de forma prospectiva la concordancia entre determinación de *RAS* en plasma y tejido sólido con otras técnicas. En el caso del estudio de Thierry *et al*. (166) se analizó la concordancia sólo de 7 mutaciones puntuales de *KRAS* (todas

del codón 2) y de *BRAF* V600E empleando en este caso una PCR cuantitativa (Intplex). La concordancia global de este estudio (96%) fue más elevada respecto a los previos, muy probablemente por analizarse menos mutaciones. La sensibilidad fue del 93% y la especificidad del 98%. En el caso del estudio prospectivo de Bachet *et al.* la técnica utilizada tanto en tejido sólido como en plasma fue NGS (179). En este caso, la concordancia fue bastante menor respecto a nuestro estudio y previos con BEAMing (85.2%; *kappa*: 0.71) con una sensibilidad también menor del 76% y una especificidad del 98.2%. Al realizarse NGS, en este estudio, se puede excluir aquellos pacientes en los que no se detecta ctDNA en plasma. Al excluir estos pacientes, la concordancia aumenta hasta 94.8% (*kappa*: 0.89) así como la sensibilidad aumenta hasta 92.9%.

Respecto a los casos discordantes, en este estudio se han reportado 11 casos. En los 6 casos en los que se ha detectado mutación en plasma y no en tumor se ha objetivado que eran casos en los que la MAF era baja (de 0.04% a 1.22%) y en uno de los casos era un tumor con mutación de *BRAF* en tejido sólido. Este hecho ha sido observado en otros estudios de concordancia. Así, por ejemplo, en el estudio de Vidal *et al* se observó una tendencia hacia niveles más bajos de MAF de *RAS* en plasma en los casos discordantes (media de 0.281% para discordantes vs 2.317% para los concordantes). Asimismo, en el análisis por pacientes todos tenían una MAF inferior a 1% salvo un paciente que era superior. Otra apreciación realizada en este estudio en los que había esta discordancia es que todos los pacientes en el momento de la extracción de la muestra de sangre ya habían sido resecados del tumor primario. En el estudio de Grasselli *et al*, los casos discordantes por presencia de mutación en plasma no observada en tejido sólido fueron analizados más exhaustivamente que en nuestro estudio. Se analizaron otras muestras del paciente de otra metástasis o extraída en tejido sólido en otro momento y en el 55.5% de los casos, se detectó la misma mutación que en plasma lo que hace concluir a los autores el papel de la biopsia líquida en cáncer colorrectal para superar la limitación de la heterogeneidad temporal y espacial. En el caso del estudio de Schmiegel *et al* también se profundizó más sobre estas discrepancias reanalizándose las muestras discordantes en tejido sólido mediante BEAMing pudiéndose detectar gracias a esta técnica en uno de tres pacientes analizados la mutación que se observaba en plasma aunque en

este caso la MAF en sangre era del 2.86%. En el caso de la NGS del estudio de Bachet *et al* los casos discordantes parecían presentar de forma más probable metástasis metacrónicas y carcinomatosis peritoneal y significativamente menor probabilidad de tener metástasis hepática. Respecto a la hipótesis generada en nuestro estudio y en los de otros de que las muestras tumorales sin alteración de *RAS* en tejido sólido pero sí en plasma pueda ser debido a que la MAF fuera baja, en este caso con NGS no se corroboró dicha hipótesis ya que la MAF media fue de 20.3% para este grupo de muestras discordantes con un rango muy amplio que llegaba hasta incluso el 80%.

Respecto a los casos discordantes en lo que respecta a mutación presente en tejido sólido pero no en plasma, en este estudio fueron 5 casos: 3 *KRAS* codón 12 y 2 *NRAS* codón 59 y 61. Sin embargo, no se ha podido explicar completamente la negatividad de estos casos en plasma tal como sucede en alguno de los otros estudios. En el estudio de Grasselli *et al* dicha discordancia fue observada en una proporción similar de casos (6 casos de 15 discordantes) y en este caso se atribuyó estas discordancias a una menor carga tumoral en 2 pacientes, la obtención de la muestra en curso de quimioterapia en dos casos y en un caso existía discordancia en la determinación de DNA entre diferentes técnicas en tumor sólido. En el caso del estudio de Vidal *et al* sólo se objetivaron dos casos con esta discordancia. En el estudio de Schmiegel *et al* hay 4 casos con esta discordancia y no se ha podido tampoco explicar estas diferencias. Aunque los niveles de CEA parecían más bajos en alguno de estos pacientes, no se ha podido concluir que la concentración de CEA esté relacionada con la posibilidad de detectar una mutación en plasma. En el estudio de Bachet *et al*. se han reportado los datos de discordantes en cuanto a mutación de *RAS* en tejido tumoral pero no en plasma.

7.6 Supervivencia global de la población de estudio global y por mutación de *RAS* según tejido y plasma

La mediana de supervivencia global de la población de estudio es de 28.4 meses independientemente del estado de *RAS*, datos similares a los obtenidos en estudios clínicos recientes de primera línea en cáncer colorrectal (102, 231). Con

respecto a la supervivencia global en base al estado de *RAS* la mediana de la supervivencia global de pacientes *RAS* mutados por plasma y tejido muestra que la presencia de la mutación de *RAS* no es un factor pronóstico ni en sangre ni en tejido dado que, aunque hay una tendencia a una menor supervivencia en los pacientes *RAS* mutados, estas diferencias no son estadísticamente significativas en ningún caso. Esta observación es congruente con estudios previos de *RAS* como factor pronóstico ya que no existen datos en la literatura suficientemente sólidos para considerarlo un factor pronóstico (114-121). Asimismo, las supervivencias reportadas para la población *RAS* nativa y mutada en plasma y tejido similar están en la línea de diversos ensayos clínicos (91, 103). En el caso de la mutación de *RAS* en plasma, la tendencia es mayor a una peor supervivencia pero no es estadísticamente significativa. En este caso, hay menos evidencia disponible sobre el impacto de *RAS* en plasma pero hay estudios que han mostrado que la mutación de *KRAS* en plasma pudiera tener impacto en supervivencia global de forma independiente (232). En otros estudios sin embargo, no se ha podido demostrar como en el nuestro diferencias en supervivencia global entre pacientes con mutación de *RAS* en plasma (263) ni en supervivencia libre de progresión (265).

7.7 Características de la población *RAS* mutada en plasma seleccionada

En el caso de este estudio la población *RAS* mutada en sangre ha sido seleccionada para intentar homogeneizar la muestra y eliminar posibles factores que puedan interferir en el pronóstico. Por ello, se han excluido muestras de pacientes que habían sido sometidos a cirugía de enfermedad principalmente hepática dado que es conocido que la cirugía estas metástasis puede mejorar la supervivencia global del cáncer colorrectal metastásico. Asimismo, se han excluido muestras de pacientes que recibieron terapia con anti-EGFR debido a que dicha terapia no han mostrado beneficio en supervivencia en tumores con mutación de *RAS* según un meta-análisis de diversos estudios (67). Incluso algunos estudios han mostrado un efecto detrimental (66), tendencia observada pero no confirmada estadísticamente en este meta-análisis. Las características de la población seleccionada no difieren significativamente de la población global

RAS mutada de este estudio en cuanto a sexo, localizaciones metastásicas ni localización del tumor primario. Asimismo, el tratamiento escogido (primera línea FOLFOX y segunda FOLFIRI, mayoritariamente) está también en línea con los tratamientos realizados. La mayor parte de las muestras de plasma analizadas (61.7%) son de pacientes previo a iniciar primera línea de tratamiento. La frecuencia de muestras en pacientes previamente no tratados para cáncer colorrectal metastásico fue de 41%, 71% y 71% en los estudios de Grasselli, Vidal y Schmiegel respectivamente, frecuencias similares sobretodo en el caso de las dos últimas a la de este estudio (167-169).

7.8 Distribución de la MAF de RAS en la población seleccionada y correlación con el momento de análisis

La mediana de la MAF de RAS de esta población fue de 9.9% con un rango desde 0.0014 a 52.4% siendo este mismo valor la mediana en primera línea. Respecto a la distribución de la MAF en la muestra en relación a otros estudios similares, destaca que se trata de una mediana de MAF de RAS superior a la del estudio de Grasselli *et al* (2%) o a la del estudio de Vidal *et al* (1.8%) pero similar a la del trabajo de Schmiegel *et al* (6.8%) (167-169). En este último estudio (que como se ha mencionado previamente, también incluía pacientes con tumores localizados en los que la MAF es menor), se analiza la distribución en tumores con estadio IV recientemente diagnosticado. En este grupo, se objetiva una mediana de MAF prácticamente superponible a la de nuestro trabajo (9.63%) en los diagnosticados recientemente como estadios IV. En nuestra población de primera línea sólo 3 pacientes han sido incluidos tras recidiva de tumores localizados por lo que los datos muestran cierta congruencia con los de este estudio.

En este estudio, se ha observado una MAF de RAS inferior en segunda línea respecto a la primera línea (1.8% vs 9.9%, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias no han sido estadísticamente significativas. Aunque en ninguno de los estudios similares a éste se han comparado la MAF de RAS según la línea de tratamiento, sí que hay un dato constante en todos ellos congruente con este trabajo: la MAF de RAS en plasma es menor en aquellos pacientes que han sido

tratados previamente. En el estudio de Vidal *et al* esta observación sí es estadísticamente significativa (0.17% para los previamente tratados *versus* 4.17% para los no tratados; $p=0.0007$). Estos datos son concordantes con estudios previos en los que se ha demostrado que los niveles de ctDNA pueden modificarse con el tratamiento de quimioterapia observándose por ejemplo, en un estudio de Tie *et al* hasta una reducción media de 5.7 veces respecto a los niveles basales previo al segundo ciclo de quimioterapia (200). En la práctica clínica habitual, los pacientes cuando alcanzan la segunda línea de tratamiento suelen presentar una menor carga tumoral como consecuencia de los tratamientos recibidos por lo que podría justificarse la razón de esta MAF más baja. No obstante, en nuestro estudio no se ha podido observar correlación entre la carga tumoral y la MAF en segunda línea.

7.9 Correlación de la MAF de RAS con la lateralidad del tumor primario e impacto en pronóstico

En este estudio se observó una ligera mayor MAF en tumores de colon derecho respecto a recto y colon izquierdo aunque dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas (12.5% *versus* 8.3%). Este punto no ha sido analizado previamente y no está reportado en la bibliografía actualmente aunque pudiera deberse a que los tumores de colon derecho suelen ser más voluminosos y tener más enfermedad metastásica.

Por otra parte, en el análisis multivariante no se demostró tampoco impacto en supervivencia global y libre de progresión al contrario que en estudios recientes. Un meta-análisis reciente ha demostrado que los tumores que se originan en el lado izquierdo del colon tienen una reducción relativa del riesgo de muerte del 19% (233). De forma similar un meta-análisis de 6 estudios de primera y segunda línea en tumores sin mutación de RAS ha demostrado un peor pronóstico en términos de supervivencia global y libre de progresión para los tumores con origen en el lado derecho del colon (234). Sin embargo, parece que bajo este concepto de lateralidad subyace un conjunto de aspectos biológicos y genéticos más complejo que se está estudiando. Esta discrepancia entre este estudio y las publicaciones previas es debido a la pequeña muestra y a una diferencia

importante de poblaciones: mientras en este estudio sólo se incluyen tumores con mutación de *RAS* en los otros estudios mencionado o bien no se tiene en cuenta el estado mutacional o bien sólo tumores sin mutación en *RAS*.

7.10 Correlación de la MAF de *RAS* con número y localización de sitios de metástasis

En este estudio no se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre la mediana de MAF de *RAS* y el número de localizaciones metastásicas aunque se ha observado paradójicamente una tendencia a una menor MAF cuanto más número de localizaciones (14%, 9.4% y 0.2% respectivamente). Más interesante es la correlación de la MAF con la localización metastásica. Destaca sobretodo que la mediana de la MAF fue estadísticamente significativa menor en pacientes con metástasis peritoneales con respecto a hepáticas, pulmonares o ganglionares. Por otra parte, existe una mayor MAF en el caso de las metástasis hepáticas (9.8%) y ganglionares (9.4%). Esta mediana de MAF menor en pacientes con metástasis peritoneales y mayor en pacientes con metástasis hepáticas ha sido corroborada en otros estudios como el de Vidal *et al* en el que se ha objetivado una MAF mediana de 0.1% y 4.81%, respectivamente. En este estudio destaca también una mediana de los valores de MAF de *RAS* menores en pulmón, una tendencia también observada en nuestro estudio (3.5%). De forma similar, en el estudio llevado a cabo por Bachet *et al* se demostró también que la presencia de metástasis hepáticas parece predecir una mayor cantidad de ctDNA por lo que una mayor MAF de *RAS* podría ir en línea con estos resultados obtenidos en plasma mediante NGS.

7.11 Correlación de la MAF de *RAS* con CEA y CA 19.9 e impacto en pronóstico

En este estudio no se ha detectado correlación significativa entre la MAF de *RAS* y los marcadores tumorales aunque parece que hay una tendencia a mayores niveles de ambos marcadores tumorales con valores mayores de MAF. Esta correlación entre MAF y marcadores tumorales no ha sido evaluada previamente por ninguno de los estudios previamente mencionados. Sin embargo, hay un

estudio que ha objetivado de forma significativa que la presencia de una mutación de *RAS* en tejido está más relacionado con bajos niveles de CEA (235). En el caso del CEA en el estudio de concordancia de Schmiegel *et al* lo que se analizó es si la presencia del CEA predecía detectar una mutación de *RAS*, algo que no se pudo demostrar. Asimismo, tampoco se pudo demostrar correlación entre CEA y MAF de *RAS*. En el análisis multivariante, el CEA no ha mostrado impacto en supervivencia global ni libre de progresión. Los marcadores tumorales no han sido establecidos a día de hoy como factor pronóstico en cáncer colorrectal aunque hay estudios recientes que muestran un peor pronóstico en caso de valores de CA 19.9 elevados (236).

7.12 Correlación de la MAF de *RAS* con respuesta al tratamiento

Uno de los datos más interesantes de este estudio está en relación a la correlación de la MAF con la respuesta al tratamiento. Se ha observado que aquellos pacientes con progresión como mejor respuesta al tratamiento presentan significativamente una mediana de MAF en plasma al inicio del tratamiento superior (29%) a aquellos que presentan estabilidad (4.9%) o respuesta (2.6%) lo que indica que la MAF podría predecir en los pacientes la respuesta al tratamiento. Hasta el momento, no se han propuesto marcadores predictivos en sangre de respuesta al tratamiento. Por primera vez, este estudio indica que la MAF de *RAS* en cáncer colorrectal podría ser un biomarcador que potencialmente podría identificar aquellos pacientes que se beneficien del tratamiento antes de iniciarlo. Este hallazgo es similar a lo que se ha observado en cáncer de pulmón con mutación de *EGFR* (237). Varios estudios han demostrado por otra parte que la cantidad inicial o la disminución con el tratamiento de *EGFR* en plasma o de su mutación de resistencia T790M podrían predecir la respuesta al tratamiento. De forma similar, la reducción del ctDNA con la inmunoterapia podría predecir la respuesta al tratamiento (238). De forma antagónica sin embargo, se ha observado que el aumento de la MAF en melanoma *BRAF* mutado en la primera semana puede predecir la respuesta a la inmunoterapia (197). Esto es debido principalmente a que en melanoma *BRAF* mutado la destrucción del tumor produce lisis tumoral con salida del ctDNA en plasma.

El resto de estudios similares al nuestro, no han analizado la correlación entre respuesta y MAF aunque sí se ha observado que los cambios en la MAF de *RAS* están ligados a la respuesta al tratamiento. Así, en el estudio de Vidal *et al* se analizó los cambios en la mutación de *RAS* en 21 pacientes y se objetivó que aquellos pacientes con una respuesta al tratamiento en la primera reevaluación radiológica o una estabilidad radiológica con respuesta clínica a las 8-12 semanas presentaban una caída muy importante de la MAF de *RAS* (mediana de 100% y 99% respectivamente). Sin embargo, esta caída de la MAF de *RAS* era significativamente menor en aquellos que presentaban progresión. Asimismo, en aquellos pacientes con respuesta se observó un aumento de la MAF en el momento de la progresión.

7.13 Correlación de la MAF de *RAS* con pronóstico

Sin duda, el hallazgo más relevante e innovador de esta tesis es que la estimación de la MAF en *RAS* en biopsia líquida se correlaciona con el pronóstico en esta población de cáncer colorrectal metastásico. Este estudio aporta por primera vez evidencia clara de que aquellos pacientes con niveles basales en primera línea más altos de MAF de *RAS* en ctDNA tienden a la progresión de forma más rápida y significativamente tienen una supervivencia global más corta. Esto se corrobora utilizando para ello diferentes puntos de corte de MAF: el corte del 5.8% se ha calculado mediante una función estadística que permite determinar el corte de forma objetiva y la estimación de su significación estadística bajo la hipótesis que el corte elegido no predice la supervivencia. Los cortes del 1 y 10% han sido tomados de acuerdo a estudios previos en los cuales se ha analizado de forma exploratoria la MAF como predictor pronóstico. En cualquier caso, utilizando cualquiera de estos cortes, los resultados son similares: en primera línea hay una tendencia a una supervivencia libre de progresión más larga y una significativa mayor supervivencia global en los pacientes con MAF de *RAS* más bajos. Parece, por tanto, que la MAF podría ser una variable continua que se correlaciona de forma inversa con supervivencia: a mayor MAF, menor supervivencia. En primera línea, se ha llevado a cabo un análisis multivariante con otros probables factores pronósticos y se ha observado que la MAF de *RAS* es el único factor pronóstico tanto para supervivencia libre de progresión y global. Con

respecto a la segunda línea, parece que en este caso hay diferencias estadísticamente significativas pese a que sólo se tratan de 12 casos: los pacientes con muestras de plasma con MAF de *RAS* más elevados tienen una supervivencia menor y progresan antes. En el caso de tercera línea, dichas diferencias no se observan, probablemente porque la población sea poco representativa (6 muestras).

La determinación de mutaciones en plasma y su impacto en pronóstico ha sido estudiada en otros tumores. Así, por ejemplo en cáncer de pulmón con mutación de *EGFR* se ha observado justamente lo contrario en varios estudios: aquellos pacientes con mayor cantidad de mutación de *EGFR* presentaron una mejor supervivencia libre de progresión y global aunque en este caso el tratamiento empleado era inhibidores de EGFR por lo que tiene sentido esta observación (239, 240). Por contra, el grupo español de cáncer de pulmón ha demostrado en un estudio de 41 pacientes afectados de este tumor con mutación de EGFR, mostró que la fracción mutante alélica de T790M (mutación de resistencia) predice un peor pronóstico en cuanto a supervivencia global y libre de enfermedad (241). Sin embargo, no hay constancia de estudios que analicen el impacto de la fracción mutante alélica de un gen en plasma en pronóstico en otros tumores distintos al colorrectal.

El impacto de la fracción mutante alélica en tejido sólido ha sido estudiado previamente en cáncer colorrectal. Un estudio liderado por nuestro grupo no ha podido demostrar un impacto en pronóstico de la MAF de *KRAS* en tejido sólido (242). Por otra parte, el impacto de las determinaciones de biopsia líquida en pronóstico ha sido analizado en cáncer colorrectal previamente. Así, el estudio de Grasselli *et al* sirvió para generar una hipótesis de este estudio. En dicho estudio, se analizó la supervivencia global de acuerdo a la mutación de *RAS* observándose que no había diferencias estadísticamente significativas como en nuestro estudio entre detección de *RAS* o no en plasma. Sin embargo, se observó que había una significativa menor supervivencia entre los pacientes con muestras de MAF $\geq 1\%$ con respecto a los que no presentaban *RAS* en plasma. De hecho, la MAF $\geq 1\%$ fue considerada un factor pronóstico en el análisis multivariante de este estudio. De forma similar, en el estudio de Vidal *et al* se analizó el impacto en el punto de corte del 1% en una cohorte de 22 pacientes de características

heterogéneas y con un seguimiento de al menos 3 años. En este caso, el impacto fue significativo tanto en supervivencia global y libre de progresión: aquellos con MAF $\geq 1\%$ vivían menos y progresaban antes. En cualquier caso, en la literatura hay reportados varios estudios en diferentes líneas que muestran que los niveles altos de ctDNA pueden predecir la respuesta al tratamiento (163, 164).

Sin embargo, estos estudios tienen más limitaciones que nuestro estudio; por un lado son estudios al igual que el nuestro retrospectivos y con una muestra pequeña. Sin embargo, nuestro estudio presenta una clara ventaja respecto a los demás. La población seleccionada es homogénea en cuanto a tratamientos recibidos, está dividida según las líneas recibidas y sólo se incluyen pacientes en los que se ha determinado la MAF de *RAS* de forma basal y no durante el tratamiento dado que el mismo puede cambiar los niveles de *RAS* en plasma. Por otra parte, se tiene que tener en cuenta que este estudio se ha realizado sólo en pacientes con tumores de colon *RAS* mutados que reciben tratamiento de quimioterapia, por lo que sería interesante realizar un análisis más extenso a una población sin mutación de *RAS* y que se trate con terapias, por ejemplo, anti-EGFR.

8. Conclusiones

1. La determinación de *RAS* en plasma puede ser analizada de forma sensible y específica mediante la técnica de BEAMing con una alta concordancia (90%) con la PCR en tiempo real en tejido sólido por lo que podría ser utilizada en el estudio de esta mutación en pacientes con cáncer colorrectal.
2. La fracción mutante alélica de *RAS* no presenta correlación significativa con las principales variables clínicas tales como localización del tumor primario, número de localizaciones metastásicas o los valores de CEA y CA 19.9.
3. Por el contrario, se ha observado correlación entre la fracción mutante alélica de *RAS* y la localización de las metástasis siendo significativamente menor en pacientes con metástasis peritoneales.
4. La fracción mutante alélica de *RAS* en plasma basal puede predecir la respuesta al tratamiento: es significativamente menor en los pacientes que presentan una respuesta al tratamiento y los pacientes con fracciones mutantes alélicas de *RAS* más altas tienden a tener un menor intervalo libre de progresión.
5. La fracción mutante alélica de *RAS* puede ser un factor pronóstico en términos de supervivencia global: es significativamente mayor en los pacientes que presentan en plasma una menor fracción mutante alélica de *RAS* en primera y segunda línea de tratamiento. En primera línea, de hecho, es un factor independiente respecto a otras variables pronósticas.

9. Líneas de futuro

Esta tesis doctoral es la consecuencia del trabajo realizado por parte de la unidad de tumores gastrointestinales del Hospital Universitario Vall d'Hebron sobre biopsia líquida. Como se ha comentado en la discusión de esta tesis, el trabajo realizado por Grasselli *et al*, fue una de las más relevantes publicaciones de este grupo en el ámbito de la biopsia líquida en cáncer colorrectal. Ese trabajo ha servido de generador de hipótesis para esta tesis doctoral que a su vez espera servir de generador de hipótesis para futuros proyectos de investigación y por qué no, futuras tesis doctorales.

Respecto a las líneas de futuro más inmediatas, se han compartido los datos obtenidos del análisis de la fracción mutante alélica en plasma con otros centros internacionales para corroborar en una cohorte más amplia la hipótesis principal de nuestro estudio: la fracción mutante alélica de *RAS* en los pacientes con cáncer colorrectal *RAS* mutado puede ser un factor pronóstico. Asimismo, se ha realizado un estudio en esta muestra sobre la carga tumoral según el volumen de enfermedad hepática y la fracción mutante alélica de *RAS*.

En lo que respecta a la validación prospectiva de esta hipótesis, se tiene intención de elaborar un proyecto multicéntrico en pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal en los próximos meses usando para ello la tecnología de PCR digital.

Por último, una de las líneas de investigación que se abre a partir de esta tesis y de las muestras que se han utilizado para el análisis, es la posibilidad de analizar otros genes en sangre que pudieran tener impacto pronóstico en los pacientes con cáncer colorrectal. Para ello, se procederá a realizar en las muestras de plasma en las que haya suficiente cantidad a realizar secuenciación masiva y a correlacionar su impacto en pronóstico de forma similar a esta tesis doctoral.

10. Referencias bibliográficas

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-91. Epub 2016/01/29.
2. Turati F, Bravi F, Di Maso M, Bosetti C, Polesel J, Serraino D, et al. Adherence to the World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research recommendations and colorectal cancer risk. *Eur J Cancer*. 2017;85:86-94. Epub 2017/09/12.
3. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, et al. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2018. Epub 2018/03/22.
4. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quiros JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(7):799-825. Epub 2017/01/18.
5. Issa IA, Noureddine M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World J Gastroenterol*. 2017;23(28):5086-96. Epub 2017/08/16.
6. Rex DK, Boland CR, Dominitz JA, Giardiello FM, Johnson DA, Kaltenbach T, et al. Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients from the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(7):1016-30. Epub 2017/05/31.
7. Segura PP, Fombella JP, Lorenzo BP, Martin MR, Lopez PG. SEOM guide to primary and secondary prevention of cancer: 2014. *Clin Transl Oncol*. 2014;16(12):1072-8. Epub 2014/11/02.
8. AJCC. TMN of colorectal carcinoma. 2017; Available from: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Pages/8EUpdates.aspx#>.
9. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandala M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 6:vi64-72. Epub 2013/10/23.
10. Aranda E, Aparicio J, Alonso V, Garcia-Albeniz X, Garcia-Alfonso P, Salazar R, et al. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer 2015. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(12):972-81. Epub 2015/12/17.
11. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1386-422. Epub 2016/07/07.
12. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rodel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl_4):iv22-iv40. Epub 2017/09/09.
13. Gonzalez-Flores E, Losa F, Pericay C, Polo E, Rosello S, Safont MJ, et al. SEOM Clinical Guideline of localized rectal cancer (2016). *Clin Transl Oncol*. 2016;18(12):1163-71. Epub 2016/12/03.
14. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevich Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(11):1114-23. Epub 2006/09/15.
15. Andre T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(19):3109-16. Epub 2009/05/20.
16. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(2):229-37.
17. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(13):1670-6.
18. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(12):2013-9.
19. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2014;371(17):1609-18.

20. Díaz-Rubio E, Gómez-España A, Massutí B, Sastre J, Abad A, Valladares M, et al. First-line XELOX plus bevacizumab followed by XELOX plus bevacizumab or single-agent bevacizumab as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer: the phase III MACRO TTD study. *The oncologist*. 2012;17(1):15-25.
21. Koopman M, Simkens L, May AM, Mol L, van Tinteren H, Punt CJA. Final results and subgroup analyses of the phase 3 CAIRO3 study: Maintenance treatment with capecitabine + bevacizumab versus observation after induction treatment with chemotherapy + bevacizumab in metastatic colorectal cancer (mCRC). *ASCO Meeting Abstracts*. 2014;32(15_suppl):3504-.
22. Hegewisch-Becker S, Graeven U, Lerchenmuller C, Killing B, Depenbusch R, Steffens C, et al. 498O Maintenance strategy with fluoropyrimidines (FP) plus bevacizumab (BEV), BEV alone or no treatment, following a 24-week first-line induction with FP, Oxaliplatin (OX) and BEV for patients with metastatic colorectal cancer: mature data and subgroup analysis. *Ann Onc*. 2014;25(suppl_4):iv167-a-.
23. Koeberle D, Betticher DC, von Moos R, Dietrich D, Brauchli P, Baertschi D, et al. Bevacizumab continuation versus no continuation after first-line chemotherapy plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer: a randomized phase III non-inferiority trial (SAKK 41/06). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015.
24. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Österlund P, Greil R, Van Cutsem E, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(1):29-37.
25. Masi G, Salvatore L, Boni L, Loupakis F, Cremolini C, Fornaro L, et al. Continuation or reintroduction of bevacizumab beyond progression to first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final results of the randomized BEBYP trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015.
26. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(12):1539-44.
27. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(28):3499-506.
28. Tabernero J, Cohn AL, Obermannova R, Bodoky G, Garcia-Carbonero R, Ciuleanu T-E, et al. RAISE: A randomized, double-blind, multicenter phase III study of irinotecan, folinic acid, and 5-fluorouracil (FOLFIRI) plus ramucirumab (RAM) or placebo (PBO) in patients (pts) with metastatic colorectal carcinoma (CRC) progressive during or following f. *ASCO Meeting Abstracts*. 2015;33(3_suppl):512-.
29. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014;25(7):1346-55.
30. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalberg JR, Tu D, Au H-J, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;357(20):2040-8.
31. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;360(14):1408-17.
32. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013;381(9863):303-12.
33. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, Yoshino T, Garcia-Carbonero R, Mizunuma N, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(20):1909-19. Epub 2015/05/15.
34. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509-20. Epub 2015/06/02.
35. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, et al. 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;18(9):1182-91. Epub 2017/07/25.

36. Kohne CH, Cunningham D, Di Costanzo F, Glimelius B, Blijham G, Aranda E, et al. 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;13(2):308-17. Epub 2002/03/12.
37. Diaz R, Aparicio J, Girones R, Molina J, Palomar L, Segura A, et al. Analysis of prognostic factors and applicability of Kohne's prognostic groups in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line irinotecan or oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Colorectal Cancer.* 2005;5(3):197-202. Epub 2005/10/04.
38. Sanoff HK, Sargent DJ, Campbell ME, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, et al. Five-year data and prognostic factor analysis of oxaliplatin and irinotecan combinations for advanced colorectal cancer: N9741. *J Clin Oncol.* 2008;26(35):5721-7. Epub 2008/11/13.
39. Siena S, Rivera F, Taieb J, Peeters M, Prenen H, Koukakis R, et al. 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;17(1):50-7 e8. Epub 2017/11/04.
40. Yonemura Y, Canbay E, Ishibashi H. Prognostic factors of peritoneal metastases from colorectal cancer following cytoreductive surgery and perioperative chemotherapy. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:978394. Epub 2013/05/28.
41. Wang JY, Tang R, Chiang JM. Value of carcinoembryonic antigen in the management of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1994;37(3):272-7. Epub 1994/03/01.
42. Baek JY, Yeo HY, Chang HJ, Kim KH, Kim SY, Park JW, et al. Serpin B5 is a CEA-interacting biomarker for colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2014;134(7):1595-604. Epub 2013/10/12.
43. Selcukbiricik F, Bilici A, Tural D, Erdamar S, Soyluk O, Buyukunal E, et al. Are high initial CEA and CA 19-9 levels associated with the presence of K-ras mutation in patients with metastatic colorectal cancer? *Tumour Biol.* 2013;34(4):2233-9. Epub 2013/04/30.
44. Levy M, Visokai V, Lipska L, Topolcan O. Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma.* 2008;55(2):138-42. Epub 2008/02/02.
45. Sasaki A, Kawano K, Inomata M, Shibata K, Matsumoto T, Kitano S. Value of serum carbohydrate antigen 19-9 for predicting extrahepatic metastasis in patients with liver metastasis from colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2005;52(66):1814-9. Epub 2005/12/13.
46. Lin PC, Lin JK, Lin CC, Wang HS, Yang SH, Jiang JK, et al. Carbohydrate antigen 19-9 is a valuable prognostic factor in colorectal cancer patients with normal levels of carcinoembryonic antigen and may help predict lung metastasis. *Int J Colorectal Dis.* 2012;27(10):1333-8. Epub 2012/03/20.
47. Yang SH, Lin JK, Lai CR, Chen CC, Li AF, Liang WY, et al. Risk factors for peritoneal dissemination of colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2004;87(4):167-73. Epub 2004/08/31.
48. Mitsuyama Y, Shiba H, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Iida T, et al. Carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 are prognostic predictors of colorectal cancer with unresectable liver metastasis. *Oncol Lett.* 2012;3(4):767-71. Epub 2012/06/29.
49. Mekenkamp LJ, Heesterbeek KJ, Koopman M, Tol J, Teerenstra S, Venderbosch S, et al. Mucinous adenocarcinomas: poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2012;48(4):501-9. Epub 2012/01/10.
50. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2017;35(13):1453-86. Epub 2017/02/07.
51. Spindler KL, Lindebjerg J, Nielsen JN, Olsen DA, Bisgard C, Brandslund I, et al. Epidermal growth factor receptor analyses in colorectal cancer: a comparison of methods. *Int J Oncol.* 2006;29(5):1159-65. Epub 2006/10/04.
52. Shia J, Klimstra DS, Li AR, Qin J, Saltz L, Teruya-Feldstein J, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol.* 2005;18(10):1350-6. Epub 2005/04/16.
53. Vallbohmer D, Zhang W, Gordon M, Yang DY, Yun J, Press OA, et al. Molecular determinants of cetuximab efficacy. *J Clin Oncol.* 2005;23(15):3536-44. Epub 2005/05/24.
54. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 2005;23(9):1803-10. Epub 2005/01/29.

55. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med.* 2012;18(2):221-3. Epub 2012/01/25.
56. Arena S, Siravegna G, Mussolin B, Kearns JD, Wolf BB, Misale S, et al. MM-151 overcomes acquired resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancers harboring EGFR extracellular domain mutations. *Science Translational Medicine.* 2016;8(324):324ra14-ra14.
57. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Finocchiaro G, Skokan M, Gajapathy S, Carnaghi C, et al. Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2008;99(1):83-9. Epub 2008/06/26.
58. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol.* 2007;25(22):3238-45. Epub 2007/08/01.
59. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.* 2005;6(5):279-86. Epub 2005/05/03.
60. Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, et al. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2009;27(30):5068-74. Epub 2009/09/10.
61. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):459-65. Epub 2003/06/05.
62. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer research.* 2007;67(6):2643-8.
63. Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer research.* 2006;66(8):3992-5.
64. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(10):1626-34.
65. Bokemeyer C, Kohne C-H, Ciardiello F, Lenz H-J, Heinemann V, Klinkhardt U, et al. Treatment outcome according to tumor RAS mutation status in OPUS study patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) randomized to FOLFOX4 with/without cetuximab. *ASCO Meeting Abstracts.* 2014;32(15_suppl):3505-.
66. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *The New England journal of medicine.* 2013;369:1023-34.
67. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland a, Kichenadasse G, McKinnon Ra, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2014(August 2014):1-27.
68. Tejpar S, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Bokemeyer C, Van Cutsem E. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol.* 2012;30(29):3570-7. Epub 2012/06/27.
69. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(9):675-84. Epub 1998/05/20.
70. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer.* 2001;85(5):692-6. Epub 2001/09/05.
71. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(10):1261-70. Epub 2011/03/09.
72. Nash GM, Gimbel M, Cohen AM, Zeng ZS, Ndubuisi MI, Nathanson DR, et al. KRAS mutation and microsatellite instability: two genetic markers of early tumor development that influence the prognosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(2):416-24. Epub 2009/10/09.

73. Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, Win AK, Baron JA, Lindor NM, et al. *KRAS*-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. *Br J Cancer*. 2013;108(8):1757-64. Epub 2013/03/21.
74. Imamura Y, Morikawa T, Liao X, Lochhead P, Kuchiba A, Yamauchi M, et al. Specific mutations in *KRAS* codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 *BRAF* wild-type colorectal cancers. *Clin Cancer Res*. 2012;18(17):4753-63. Epub 2012/07/04.
75. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of *Ki-ras* mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9(11):1193-7. Epub 2000/11/30.
76. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, *BRAF* mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*. 2009;58(1):90-6. Epub 2008/10/04.
77. Wang C, van Rijnsoever M, Grieu F, Bydder S, Elsaleh H, Joseph D, et al. Prognostic significance of microsatellite instability and *Ki-ras* mutation type in stage II colorectal cancer. *Oncology*. 2003;64(3):259-65. Epub 2003/04/17.
78. Ogino S, Meyerhardt JA, Irahara N, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, et al. *KRAS* mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res*. 2009;15(23):7322-9. Epub 2009/11/26.
79. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of *KRAS* and *BRAF* in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(3):466-74. Epub 2009/12/17.
80. Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, Hechtman JF, Kemeny N, Saltz L, et al. Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring *NRAS* Mutations. *Clin Cancer Res*. 2017;23(16):4753-60. Epub 2017/04/28.
81. Ciardiello F, Lenz H-J, Kohne C-H, Heinemann V, Tejpar S, Melezinek I, et al. Treatment outcome according to tumor *RAS* mutation status in CRYSTAL study patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) randomized to FOLFIRI with/without cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(15_suppl):3506-.
82. Van Cutsem E, Lenz H-J, Köhne C-H, Heinemann V, Tejpar S, Melezinek I, et al. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and *RAS* Mutations in Colorectal Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;JCO.2014.59.4812--JCO.2014.59.4812-.
83. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(14):1408-17. Epub 2009/04/03.
84. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22(7):1535-46.
85. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet*. 2011;377(9783):2103-14.
86. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, et al. Final results from a randomized phase 3 study of FOLFIRI {+/-} panitumumab for second-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014;25(1):107-16.
87. Peeters M, Oliner KS, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, et al. Analysis of *KRAS/NRAS* Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(24):5469-79. Epub 2015/09/06.
88. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, Maughan T, Richman S, Gwyther S, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with *KRAS* wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(8):749-59.
89. Patterson SD, Peeters M, Siena S, Van Cutsem E, Humblet Y, Van Laethem J-L, et al. Comprehensive analysis of *KRAS* and *NRAS* mutations as predictive biomarkers for single agent panitumumab (pmab) response in a randomized, phase III metastatic colorectal cancer (mCRC) study (20020408). *ASCO Meeting Abstracts*. 2013;31(15_suppl):3617-.

90. Karthaus MSLRF. Updated overall survival (OS) analysis of novel predictive *KRAS/NRAS* mutations beyond *KRAS* exon 2 in PEAK: A 1st-line phase 2 study of FOLFOX6 plus panitumumab (pmab) or bevacizumab (bev) in metastatic colorectal cancer (mCRC). *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990). 2013;49(S516).
91. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon J-L, Hecht JR, et al. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(21):2240-7.
92. Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, Nelson GD, Alberts SR, Sinicrope FA, et al. Patient and tumor characteristics and *BRAF* and *KRAS* mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(7):8. Epub 2014/06/14.
93. Clancy C, Burke JP, Kalady MF, Coffey JC. *BRAF* mutation is associated with distinct clinicopathological characteristics in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2013;15(12):e711-8. Epub 2013/10/12.
94. Ogino S, Brahmandam M, Cantor M, Namgyal C, Kawasaki T, Kirkner G, et al. Distinct molecular features of colorectal carcinoma with signet ring cell component and colorectal carcinoma with mucinous component. *Mod Pathol*. 2006;19(1):59-68. Epub 2005/08/25.
95. Naguib A, Mitrou PN, Gay LJ, Cooke JC, Luben RN, Ball RY, et al. Dietary, lifestyle and clinicopathological factors associated with *BRAF* and *K-ras* mutations arising in distinct subsets of colorectal cancers in the EPIC Norfolk study. *BMC Cancer*. 2010;10:99. Epub 2010/03/18.
96. Yaeger R, Cercek A, Chou JF, Sylvester BE, Kemeny NE, Hechtman JF, et al. *BRAF* mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2014;120(15):2316-24. Epub 2014/04/17.
97. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, et al. Impact of *BRAF* mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011;117(20):4623-32. Epub 2011/04/02.
98. Sanz-Garcia E, Argiles G, Elez E, Tabernero J. *BRAF* mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives. *Ann Oncol*. 2017;28(11):2648-57. Epub 2017/10/19.
99. Richman SD, Seymour MT, Chambers P, Elliott F, Daly CL, Meade AM, et al. *KRAS* and *BRAF* mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5931-7. Epub 2009/11/04.
100. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. Mismatch repair status and *BRAF* mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res*. 2014;20(20):5322-30. Epub 2014/08/21.
101. Seligmann JF, Fisher D, Smith CG, Richman SD, Elliott F, Brown S, et al. Investigating the poor outcomes of *BRAF*-mutant advanced colorectal cancer: analysis from 2530 patients in randomised clinical trials. *Ann Oncol*. 2017;28(3):562-8. Epub 2016/12/21.
102. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol*. 2015;16(13):1306-15. Epub 2015/09/05.
103. Stintzing S, Miller-Phillips L, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Decker T, Kiani A, et al. Impact of *BRAF* and *RAS* mutations on first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab: analysis of the FIRE-3 (AIO KRK-0306) study. *Eur J Cancer*. 2017;79:50-60. Epub 2017/05/04.
104. Tveit KM, Guren T, Glimelius B, Pfeiffer P, Sorbye H, Pyrhonen S, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(15):1755-62.
105. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. *K-ras* mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;359(17):1757-65.
106. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al. Predictive role of *BRAF* mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2015;51(5):587-94. Epub 2015/02/13.

107. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, et al. Meta-analysis of *BRAF* mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for *RAS* wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1888-94. Epub 2015/05/20.
108. Cremolini C, Di Bartolomeo M, Amatu A, Antoniotti C, Moretto R, Berenato R, et al. *BRAF* codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Ann Oncol*. 2015;26(10):2092-7. Epub 2015/07/15.
109. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The Lancet Oncology*. 2010;11(8):753-62.
110. Baas JM, Krens LL, Guchelaar HJ, Morreau H, Gelderblom H. Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review. *Oncologist*. 2011;16(9):1239-49. Epub 2011/07/12.
111. Lin JS, Webber EM, Senger CA, Holmes RS, Whitlock EP. Systematic review of pharmacogenetic testing for predicting clinical benefit to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Am J Cancer Res*. 2011;1(5):650-62. Epub 2011/07/23.
112. Yang ZY, Wu XY, Huang YF, Di MY, Zheng DY, Chen JZ, et al. Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with *KRAS* wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cancer*. 2013;133(8):1914-25. Epub 2013/03/16.
113. Mao C, Yang ZY, Hu XF, Chen Q, Tang JL. *PIK3CA* exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in *KRAS* wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2012;23(6):1518-25. Epub 2011/11/01.
114. Bando H, Yoshino T, Shinozaki E, Nishina T, Yamazaki K, Yamaguchi K, et al. Simultaneous identification of 36 mutations in *KRAS* codons 61 and 146, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* in a single reaction by multiplex assay kit. *BMC Cancer*. 2013;13:405. Epub 2013/09/07.
115. Domingo E, Church DN, Sieber O, Ramamoorthy R, Yanagisawa Y, Johnstone E, et al. Evaluation of *PIK3CA* Mutation As a Predictor of Benefit From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Therapy in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(34):4297-305.
116. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, et al. Aspirin use, tumor *PIK3CA* mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med*. 2012;367(17):1596-606. Epub 2012/10/26.
117. Shen Y, Yang J, Xu Z, Gu DY, Chen JF. Phosphatase and tensin homolog expression related to cetuximab effects in colorectal cancer patients: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(21):2712-8. Epub 2012/06/13.
118. Wang ZH, Gao QY, Fang JY. Loss of *PTEN* expression as a predictor of resistance to anti-EGFR monoclonal therapy in metastatic colorectal cancer: evidence from retrospective studies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69(6):1647-55. Epub 2012/05/23.
119. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. *PIK3CA* mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 2009;69(5):1851-7. Epub 2009/02/19.
120. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet J-B, Lecomte T, et al. Analysis of *PTEN*, *BRAF*, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type *KRAS* metastatic colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(35):5924-30.
121. Masuda T, Hayashi N, Iguchi T, Ito S, Eguchi H, Mimori K. Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer. *Mol Oncol*. 2016;10(3):408-17. Epub 2016/02/24.
122. Harouaka R, Kang Z, Zheng SY, Cao L. Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther*. 2014;141(2):209-21. Epub 2013/10/19.
123. Lianidou ES, Strati A, Markou A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014;51(3):160-71. Epub 2014/03/20.
124. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(7):1223-9. Epub 2009/03/14.
125. Sastre J, Maestro ML, Gomez-Espana A, Rivera F, Valladares M, Massuti B, et al. 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. Epub 2012/05/31.

126. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol*. 2010;2010:617421. Epub 2009/12/18.

127. Grover PK, Cummins AG, Price TJ, Roberts-Thomson IC, Hardingham JE. Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1506-16. Epub 2014/03/22.

128. Guo W, Gao Y, Li N, Shao F, Wang C, Wang P, et al. Exosomes: New players in cancer (Review). *Oncol Rep*. 2017;38(2):665-75. Epub 2017/06/20.

129. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012;18(6):883-91. Epub 2012/05/29.

130. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015;527(7578):329-35. Epub 2015/11/03.

131. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*. 2014;24(6):766-9. Epub 2014/04/09.

132. Nilsson RJ, Balaj L, Hulleman E, van Rijn S, Pegtel DM, Walraven M, et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood*. 2011;118(13):3680-3. Epub 2011/08/13.

133. McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(8):717-27. Epub 2014/08/02.

134. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*. 2015;28(5):666-76. Epub 2015/11/04.

135. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948;142(3-4):241-3. Epub 1948/02/01. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme.

136. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-90. Epub 2008/08/02.

137. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579-86. Epub 2014/01/23.

138. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001;61(4):1659-65. Epub 2001/03/14.

139. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet*. 2016;12(7):e1006162. Epub 2016/07/20.

140. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. 2016;164(1-2):57-68. Epub 2016/01/16.

141. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of mutations in *EGFR* in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med*. 2008;359(4):366-77. Epub 2008/07/04.

142. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):9236-41. Epub 1999/08/04.

143. Khakoo S, Georgiou A, Gerlinger M, Cunningham D, Starling N. Circulating tumour DNA, a promising biomarker for the management of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;122:72-82. Epub 2018/02/21.

144. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(2):209-19. Epub 2005/04/19.

145. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet*. 2001;Chapter 9:Unit 9 8. Epub 2008/04/23.

146. Li J, Makrigiorgos GM. COLD-PCR: a new platform for highly improved mutation detection in cancer and genetic testing. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 2):427-32. Epub 2009/03/18.

147. Perkins G, Lu H, Garland F, Taly V. Droplet-Based Digital PCR: Application in Cancer Research. *Adv Clin Chem*. 2017;79:43-91. Epub 2017/02/19.

148. Zonta E, Garlan F, Pecuchet N, Perez-Toralla K, Caen O, Milbury C, et al. Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159094. Epub 2016/07/16.
149. Li M, Diehl F, Dressman D, Vogelstein B, Kinzler KW. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods*. 2006;3(2):95-7. Epub 2006/01/25.
150. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, Vogelstein B, Dressman D. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods*. 2006;3(7):551-9. Epub 2006/06/23.
151. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(4):223-38. Epub 2017/02/25.
152. Kamps R, Brandao RD, Bosch BJ, Paulussen AD, Xanthoulea S, Blok MJ, et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2). Epub 2017/02/02.
153. Illumina®. [cited 2018]; Available from: <http://www.illumina.com>.
154. Ion-Torrent®. [cited 2018]; Available from: <http://www.thermofisher.com>.
155. Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):547-55. Epub 2016/03/29.
156. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol*. 2018;JCO2017768671. Epub 2018/03/06.
157. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24. Epub 2014/02/21.
158. Mok T, Wu YL, Lee JS, Yu CJ, Sriuranpong V, Sandoval-Tan J, et al. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21(14):3196-203. Epub 2015/04/02.
159. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, et al. Noninvasive detection of response and resistance in *EGFR*-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res*. 2014;20(6):1698-705. Epub 2014/01/17.
160. Li X, Ren R, Ren S, Chen X, Cai W, Zhou F, et al. Peripheral blood for epidermal growth factor receptor mutation detection in non-small cell lung cancer patients. *Transl Oncol*. 2014;7(3):341-8. Epub 2014/09/03.
161. Kukita Y, Uchida J, Oba S, Nishino K, Kumagai T, Taniguchi K, et al. Quantitative identification of mutant alleles derived from lung cancer in plasma cell-free DNA via anomaly detection using deep sequencing data. *PLoS One*. 2013;8(11):e81468. Epub 2013/11/28.
162. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, et al. Gefitinib treatment in *EGFR* mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of *EGFR* status. *J Thorac Oncol*. 2014;9(9):1345-53. Epub 2014/08/15.
163. Tabernero J, Lenz HJ, Siena S, Sobrero A, Falcone A, Ychou M, et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(8):937-48. Epub 2015/07/18.
164. El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M, et al. Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin Cancer Res*. 2016;22(12):3067-77. Epub 2016/02/06.
165. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem*. 2013;59(12):1722-31. Epub 2013/08/14.
166. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med*. 2014;20(4):430-5. Epub 2014/03/25.
167. Grasselli J, Elez E, Caratu G, Matito J, Santos C, Macarulla T, et al. Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2017;28(6):1294-301. Epub 2017/04/04.
168. Schmiegel W, Scott RJ, Dooley S, Lewis W, Meldrum CJ, Pockney P, et al. Blood-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in colorectal cancer patients: concordance

- of results from circulating tumor DNA and tissue-based RAS testing. *Mol Oncol*. 2017;11(2):208-19. Epub 2017/01/21.
169. Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2017;28(6):1325-32. Epub 2017/04/19.
170. Normanno N, Esposito Abate R, Lambiase M, Forgione L, Cardone C, Iannaccone A, et al. RAS testing of liquid biopsy correlates with the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus cetuximab in the CAPRI-GOIM trial. *Ann Oncol*. 2018;29(1):112-8. Epub 2017/09/28.
171. Bachet JB, Bouche O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia ML, Meurisse A, et al. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol*. 2018. Epub 2018/02/14.
172. Nakamura Y, Yoshino T. Clinical Utility of Analyzing Circulating Tumor DNA in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2018. Epub 2018/04/28.
173. Ascierto PA, Minor D, Ribas A, Lebbe C, O'Hagan A, Arya N, et al. Phase II trial (BREAK-2) of the *BRAF* inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(26):3205-11. Epub 2013/08/07.
174. Baselga J, Im SA, Iwata H, Cortes J, De Laurentiis M, Jiang Z, et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(7):904-16. Epub 2017/06/04.
175. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, Pearson A, Tarazona N, et al. Analysis of *ESR1* mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7(313):313ra182. Epub 2015/11/13.
176. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014;20(5):548-54. Epub 2014/04/08.
177. Paweletz CP, Sacher AG, Raymond CK, Alden RS, O'Connell A, Mach SL, et al. Bias-Corrected Targeted Next-Generation Sequencing for Rapid, Multiplexed Detection of Actionable Alterations in Cell-Free DNA from Advanced Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2016;22(4):915-22. Epub 2015/10/16.
178. Schwaederle MC, Patel SP, Husain H, Ikeda M, Lanman RB, Banks KC, et al. Utility of Genomic Assessment of Blood-Derived Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(17):5101-11. Epub 2017/05/26.
179. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883-92. Epub 2012/03/09.
180. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CK, Nuciforo P, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol*. 2014;25(9):1729-35. Epub 2014/07/11.
181. Abbosh C, Birnbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*. 2017;545(7655):446-51. Epub 2017/04/27.
182. Yang M, Topaloglu U, Petty WJ, Pagni M, Foley KL, Grant SC, et al. Circulating mutational portrait of cancer: manifestation of aggressive clonal events in both early and late stages. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):100. Epub 2017/05/06.
183. Murtaza M, Dawson SJ, Pogrebniak K, Rueda OM, Provenzano E, Grant J, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat Commun*. 2015;6:8760. Epub 2015/11/05.
184. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of *KRAS* mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012;486(7404):532-6. Epub 2012/06/23.
185. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012;486(7404):537-40. Epub 2012/06/23.
186. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med*. 2015;21(7):795-801. Epub 2015/06/02.

187. Arena S, Bellosillo B, Siravegna G, Martinez A, Canadas I, Lazzari L, et al. Emergence of Multiple EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(9):2157-66. Epub 2015/01/28.
188. Van Emburgh BO, Arena S, Siravegna G, Lazzari L, Crisafulli G, Corti G, et al. Acquired RAS or EGFR mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nat Commun.* 2016;7:13665. Epub 2016/12/09.
189. Toledo RA, Cubillo A, Vega E, Garralda E, Alvarez R, de la Varga LU, et al. Clinical validation of prospective liquid biopsy monitoring in patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI-cetuximab. *Oncotarget.* 2017;8(21):35289-300. Epub 2016/11/17.
190. Corcoran RB, Andre T, Atreya CE, Schellens JHM, Yoshino T, Bendell JC, et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with *BRAF(V600E)*-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2018;8(4):428-43. Epub 2018/02/13.
191. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DW, Kaper F, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med.* 2012;4(136):136ra68. Epub 2012/06/01.
192. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, De Pas TM, Chiari R, Del Grammastro M, et al. Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of *EGFR* Mutations in Plasma of NSCLC Patients. *J Thorac Oncol.* 2015;10(10):1437-43. Epub 2015/08/22.
193. Schreuer M, Meersseman G, Van Den Herrewegen S, Jansen Y, Chevolet I, Bott A, et al. Quantitative assessment of *BRAF V600* mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. *J Transl Med.* 2016;14:95. Epub 2016/04/21.
194. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(13):1199-209. Epub 2013/03/15.
195. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired *EGFR* C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring *EGFR* T790M. *Nat Med.* 2015;21(6):560-2. Epub 2015/05/06.
196. Cabel L, Riva F, Servois V, Livartowski A, Daniel C, Rampanou A, et al. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1996-2001. Epub 2017/05/02.
197. Lee JH, Long GV, Boyd S, Lo S, Menzies AM, Tembe V, et al. Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Ann Oncol.* 2017;28(5):1130-6. Epub 2017/03/23.
198. Wyatt AW, Azad AA, Volik SV, Annala M, Beja K, McConeghy B, et al. Genomic Alterations in Cell-Free DNA and Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* 2016;2(12):1598-606. Epub 2016/05/06.
199. Parkinson CA, Gale D, Piskorz AM, Biggs H, Hodgkin C, Addley H, et al. Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. *PLoS Med.* 2016;13(12):e1002198. Epub 2016/12/21.
200. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1715-22. Epub 2015/04/09.
201. Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D, Siauve N, Didelot A, Sarafan-Vasseur N, et al. Early Evaluation of Circulating Tumor DNA as Marker of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients (PLACOL Study). *Clin Cancer Res.* 2017;23(18):5416-25. Epub 2017/06/04.
202. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med.* 2017;9(403). Epub 2017/08/18.
203. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med.* 2015;7(302):302ra133. Epub 2015/08/28.
204. Pietrasz D, Pecuchet N, Garlan F, Didelot A, Dubreuil O, Doat S, et al. Plasma Circulating Tumor DNA in Pancreatic Cancer Patients Is a Prognostic Marker. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):116-23. Epub 2016/12/21.
205. Rustin GJ, van der Burg ME, Griffin CL, Guthrie D, Lamont A, Jayson GC, et al. Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial. *Lancet.* 2010;376(9747):1155-63. Epub 2010/10/05.

206. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(4):352-60. Epub 2017/06/06.
207. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen C. An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer. *JAMA*. 1993;270(8):943-7. Epub 1993/08/25.
208. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Lusa L, Battaglia L, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2008;263(2):170-81. Epub 2008/04/09.
209. Lindfors U, Zetterquist H, Papadogiannakis N, Olivecrona H. Persistence of *K-ras* mutations in plasma after colorectal tumor resection. *Anticancer Res*. 2005;25(1B):657-61. Epub 2005/04/09.
210. Reinert T, Scholer LV, Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut*. 2016;65(4):625-34. Epub 2015/02/07.
211. Scholer LV, Reinert T, Orntoft MW, Kassentoft CG, Arnadottir SS, Vang S, et al. Clinical Implications of Monitoring Circulating Tumor DNA in Patients with Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(18):5437-45. Epub 2017/06/11.
212. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016;8(346):346ra92. Epub 2016/07/08.
213. Diehn M, Alizadeh AA, Adams H-P, Lee JJ, Klassen S, Palma JF, et al. Early prediction of clinical outcomes in resected stage II and III colorectal cancer (CRC) through deep sequencing of circulating tumor DNA (ctDNA). *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):3591-.
214. Gonzalez-Vela MD, Curiel-Olmo S, Derdak S, Beltran S, Santibanez M, Martinez N, et al. Shared Oncogenic Pathways Implicated in Both Virus-Positive and UV-Induced Merkel Cell Carcinomas. *J Invest Dermatol*. 2017;137(1):197-206. Epub 2016/10/25.
215. Allenson K, Castillo J, San Lucas FA, Scelo G, Kim DU, Bernard V, et al. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Ann Oncol*. 2017;28(4):741-7. Epub 2017/01/21.
216. Perrone F, Lampis A, Bertan C, Verderio P, Ciniselli CM, Pizzamiglio S, et al. Circulating free DNA in a screening program for early colorectal cancer detection. *Tumori*. 2014;100(2):115-21. Epub 2014/05/24.
217. Mead R, Duku M, Bhandari P, Cree IA. Circulating tumour markers can define patients with normal colons, benign polyps, and cancers. *Br J Cancer*. 2011;105(2):239-45. Epub 2011/06/30.
218. Hao TB, Shi W, Shen XJ, Qi J, Wu XH, Wu Y, et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014;111(8):1482-9. Epub 2014/08/27.
219. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*. 2014;63(2):317-25. Epub 2013/02/15.
220. Sanz-Garcia E, Grasselli J, Argiles G, Elez ME, Tabernero J. Current and advancing treatments for metastatic colorectal cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2016;16(1):93-110. Epub 2015/11/10.
221. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, et al. 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;317(23):2392-401. Epub 2017/06/21.
222. Jeantet M, Tougeron D, Tachon G, Cortes U, Archambaut C, Fromont G, et al. High Intra- and Inter-Tumoral Heterogeneity of *RAS* Mutations in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12). Epub 2016/12/06.
223. Normanno N, Rachiglio AM, Lambiase M, Martinelli E, Fenizia F, Esposito C, et al. Heterogeneity of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1710-4. Epub 2015/04/09.
224. Schwartz LH, Litiere S, de Vries E, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S, et al. RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee. *Eur J Cancer*. 2016;62:132-7. Epub 2016/05/18.

225. Azuara D, Ginesta MM, Gausachs M, Rodriguez-Moranta F, Fabregat J, Busquets J, et al. Nanofluidic digital PCR for *KRAS* mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer. *Clin Chem*. 2012;58(9):1332-41.
226. Cécile Contal JOQ. An application of changepoint methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. *Comput Stat Data Anal*. 1999;30(3):253-70.
227. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74. Epub 1977/03/01.
228. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):177-93. Epub 2017/03/02.
229. Riihimaki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep*. 2016;6:29765. Epub 2016/07/16.
230. Qiu M, Hu J, Yang D, Cosgrove DP, Xu R. Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget*. 2015;6(36):38658-66. Epub 2015/10/21.
231. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz H-J, Innocenti F, Mahoney MR, O'Neil BH, et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5-FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with *KRAS* wild-type (wt) untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or re. ASCO Meeting Abstracts. 2014;32(15_suppl):LBA3-LBA.
232. Spindler KL, Pallisgaard N, Appelt AL, Andersen RF, Schou JV, Nielsen D, et al. Clinical utility of *KRAS* status in circulating plasma DNA compared to archival tumour tissue from patients with metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Eur J Cancer*. 2015;51(17):2678-85. Epub 2015/10/29.
233. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2016. Epub 2016/10/28.
234. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, et al. 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 trials. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1713-29. Epub 2017/04/14.
235. Cho M, Akiba C, Lau C, Smith D, Telatar M, Afkhami M, et al. Impact of *RAS* and *BRAF* mutations on carcinoembryonic antigen production and pattern of colorectal metastases. *World J Gastrointest Oncol*. 2016;8(1):128-35. Epub 2016/01/23.
236. Rahbari NN, Scholch S, Bork U, Kahlert C, Schneider M, Rahbari M, et al. Prognostic value of circulating endothelial cells in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(23):37491-501. Epub 2017/04/19.
237. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2011;17(24):7808-15. Epub 2011/10/07.
238. Goldberg SB, Narayan A, Kole AJ, Decker RH, Teysir J, Carriero NJ, et al. Early Assessment of Lung Cancer Immunotherapy Response via Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res*. 2018;24(8):1872-80. Epub 2018/01/14.
239. Yang X, Zhuo M, Ye X, Bai H, Wang Z, Sun Y, et al. Quantification of mutant alleles in circulating tumor DNA can predict survival in lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(15):20810-24. Epub 2016/03/19.
240. Martin P, Shiau CJ, Pasic M, Tsao M, Kamel-Reid S, Lin S, et al. Clinical impact of mutation fraction in epidermal growth factor receptor mutation positive NSCLC patients. *Br J Cancer*. 2016;114(6):616-22. Epub 2016/02/19.
241. Provencio M, Torrente M, Calvo V, Perez-Callejo D, Gutierrez L, Franco F, et al. Prognostic value of quantitative ctDNA levels in non small cell lung cancer patients. *Oncotarget*. 2018;9(1):488-94. Epub 2018/02/09.
242. Dienstmann R, Elez E, Argiles G, Matos I, Sanz-Garcia E, Ortiz C, et al. Analysis of mutant allele fractions in driver genes in colorectal cancer - biological and clinical insights. *Mol Oncol*. 2017;11(9):1263-72. Epub 2017/06/16.

11. Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Principales ensayos clínicos mCRC con antiangiogénicos. | 19 |
| Tabla 2. Principales estudios sobre el valor pronóstico de la mutación de <i>KRAS</i> en cáncer colorrectal. | 25 |
| Tabla 3. Principales estudios de anticuerpos anti-EGFR en cáncer colorrectal y su impacto en población <i>RAS</i> wild type y mutada. | 26 |
| Tabla 4. Principales características, ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de detección de cfDNA (150). | 31 |
| Tabla 5. Principales estudios de biopsia líquida en cáncer colorrectal y concordancia con tejido sólido (adaptada de (177)). | 35 |
| Tabla 6. Alteraciones moleculares detectadas mediante PCR en tiempo real en tejido sólido. | 51 |
| Tabla 7. Mutaciones detectadas por medio de BEAMing en plasma. | 54 |
| Tabla 8. Características generales de la población global de estudio. | 59 |
| Tabla 9. Determinación de <i>RAS</i> en tejido tumoral. | 61 |
| Tabla 10. Determinación de <i>RAS</i> en plasma. | 62 |
| Tabla 11. Correlación entre la determinación de <i>RAS</i> en tejido sólido y plasma. | 62 |
| Tabla 12. Correlación entre la correlación de <i>KRAS</i> y <i>NRAS</i> en tejido sólido y plasma. | 63 |
| Tabla 13. Casos discordantes entre biopsia líquida y sólida en determinación de <i>RAS</i> | 64 |
| Tabla 14. Principales características de la población homogénea a estudio con mutación de <i>RAS</i> en plasma. | 68 |
| Tabla 15. Distribución de la MAF en función de la línea de tratamiento. | 70 |
| Tabla 16. Análisis multivariante de Cox en primera línea para distintos factores pronósticos en PFS y OS. | 84 |

12. Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Algoritmo de tratamiento de cáncer colorrectal metastásico propuesto por ESMO (adaptado de la referencia 11)..... | 18 |
| Figura 2. Esquema de la vía de la MAPK y su relación con la vía de PI3KCA..... | 22 |
| Figura 3. Principios de la PCR Digital (adaptado). | 32 |
| Figura 4. Diagrama de flujo para la selección de la población homogénea de pacientes con mutación de <i>RAS</i> en plasma. | 48 |
| Figura 5. Resumen de la tecnología BEAMing (adaptado). | 52 |
| Figura 6. Supervivencia global de la población de estudio..... | 65 |
| Figura 7. Supervivencia global de la población en función de status de la mutación de <i>RAS</i> en plasma. | 65 |
| Figura 8. Supervivencia global de la población en función de status de la mutación de <i>RAS</i> en tejido sólido. | 66 |
| Figura 9. Distribución de la fracción mutante alélica por paciente..... | 69 |
| Figura 10. Distribución gráfica de la MAF de <i>RAS</i> por línea. | 70 |
| Figura 11. Distribución de la MAF de <i>RAS</i> por localización de tumor primario. ... | 71 |
| Figura 12. Distribución de la MAF de <i>RAS</i> por número de localizaciones metastásicas. | 72 |
| Figura 13. Distribución de la MAF de <i>RAS</i> por localización metastásica. | 73 |
| Figura 14. Correlación entre CEA 19.9 y CEA con la MAF (%). | 74 |
| Figura 15. Correlación de MAF con mejor respuesta al tratamiento. | 75 |
| Figura 16. Supervivencia libre de progresión en primera línea de acuerdo al corte óptimo de la MAF (5.8%). | 76 |
| Figura 17. Supervivencia global en primera línea en función del corte optimizado de MAF (5.8%). | 76 |
| Figura 18. Supervivencia libre de progresión en primera línea de acuerdo al corte del 1%. | 77 |
| Figura 19. Supervivencia global en primera línea de acuerdo al corte del 1%. | 78 |
| Figura 20. Supervivencia libre de progresión en primera línea de acuerdo al corte del 10%. | 79 |
| Figura 21. Supervivencia global en primera línea de acuerdo al corte del 10%. ... | 79 |

| | |
|--|----|
| Figura 22. Supervivencia libre de progresión en segunda línea de acuerdo al corte optimizado del 5.8%. | 80 |
| Figura 23. Supervivencia global en segunda línea de acuerdo al corte optimizado del 5.8%. | 81 |
| Figura 24. Supervivencia libre de progresión en segunda línea de acuerdo al corte del 1%. | 82 |
| Figura 25. Supervivencia global en segunda línea de acuerdo al corte del 1%. .. | 82 |
| Figura 26. Supervivencia libre de progresión en tercera línea de acuerdo al corte optimizado del 5.8%. | 83 |
| Figura 27. Supervivencia global en tercera línea de acuerdo al corte optimizado del 5.8%. | 84 |